

ISSN 0026-3656

Том 93, Номер 6

Ноябрь – Декабрь 2024



МИКРОБИОЛОГИЯ



НАУКА

— 1727 —

СОДЕРЖАНИЕ

Том 93, Номер 6, 2024

ОБЗОРЫ

- Геномная эволюция α -протеобактерий в системе симбиоза
Н. А. Проворов, Е. Е. Андронов 679

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- Methanosarcina baicalica* sp. nov. Новая метаногенная архея, выделенная из поверхностных придонных осадков озера Байкал
Т. Н. Жилина, А. Ю. Меркель, Т. В. Колганова, В. Э. Трубицын, В. А. Щербакова, Н. Е. Сузина, Н. В. Пименов 690
- Анализ генома и реконструкция метаболических путей деградации аминокислот и бетаина у галоалкалофильной бактерии *Anoxynatronum Sibiricum*
Е. Н. Деткова, Ю. В. Болтянская, Н. В. Пименов, А. В. Марданов, В. В. Кевбрин 702
- Структура биокристаллического нуклеоида и его роль в регуляции диссоциативной фенотипической гетерогенности микробных популяций
Г. И. Эль-Регистан, Н. Е. Сузина, Е. В. Дёмкина, Ю. А. Николаев 715
- Модуляция активности азитромицина в отношении моновидовых и бинарных биопленок *Staphylococcus aureus* и *Kytococcus schroeteri* гормоном норадреналином
Е. В. Дювенжи, И. Д. Соловьев, М. В. Сухачева, Е. Д. Неволина, М. А. Овчарова, Н. А. Логинова, А. М. Мосолова, С. В. Мартьянов, В. К. Плакунов, А. В. Ганнесен 732
- Анализ электрофизических профилей планктонных и биопленочных клеток на модели бактерий *Azospirillum baldaniorum*
А. В. Шелудько, С. С. Евстигнеева, Е. М. Телешева, Ю. А. Филипьевичева, Л. П. Петрова, Д. И. Мокеев, И. В. Волохина, И. В. Борисов, В. Д. Бунин, О. И. Гулий 745
- Изменения белковых профилей планктонных культур и биопленок *Staphylococcus epidermidis*, выращенных в анаэробных условиях в присутствии гормона CNP
А. В. Ганнесен, Р. Х. Зиганшин, М. А. Овчарова, А. М. Мосолова, Н. А. Логинова, Е. В. Дювенжи, Е. Д. Неволина, С. В. Мартьянов, В. К. Плакунов 757
- Биовыщелачивание медно-цинкового концентрата при разных температурных режимах
А. Г. Булаев, А. В. Артыкова, Ю. А. Елкина, А. В. Колосов, А. В. Нечаева, А. В. Белецкий, В. В. Кадников, В. С. Меламуд, А. В. Марданов 773
- Образование биологически активных соединений сибирскими штаммами *Cordyceps militaris*
Т. В. Антипова, В. П. Желифонова, Б. П. Баскунов, Ю. А. Литовка, М. М. Патрушева, В. Б. Кешелава, Е. С. Михайлов, И. Н. Чистяков, И. Н. Павлов 785
- Распространенность феномена продукции пептидных факторов антагонизма среди коагулазонегативных стафилококков
Т. В. Полюдова, Л. М. Лемкина, М. В. Антипова, А. Л. Есаев, В. П. Коробов 797

Структурное и генетическое родство О-антигенов типовых штаммов <i>Azospirillum agricola</i> СС-НІН038 и <i>Azospirillum doebereineriae</i> GSF71 Е. Н. Сигида, В. С. Гринёв, М. С. Кокоулин, С. А. Коннова, Ю. П. Федоненко	807
Алкалотермофильные железоредуцирующие бактерии горячинского месторождения термальных вод Д. Г. Заварзина, А. А. Ключина, А. Ю. Меркель, Т. А. Маслова, А. А. Маслов	818
Филогенетическая структура бактериопланктона водоемов бассейна Куйбышевского водохранилища в период массового развития цианобактерий М. В. Уманская, М. Ю. Горбунов	832
Бактериальные сообщества реки Селенги, ее притоков и Селенгинского мелководья в летний период 2021 года А. С. Захаренко, И. В. Томберг, С. В. Букин, В. В. Блинов, Т. И. Земская	849
Определение состава кишечной микробиоты рыжей вечерницы посредством бактериологического анализа и высокопроизводительного секвенирования 16S РРНК И. В. Попов, И. М. Донник, Т. А. Липилкина, И. С. Березинская, Е. В. Ткачева, Е. А. Лукбанова, А. В. Алешукина, Ю. А. Тихменева, Т. Н. Дерезина, А. П. Евсюков, Т. И. Твердохлебова, А. М. Ермаков	864
Новые штаммы <i>Bacillus thuringiensis subsp. israelensis</i> , высокотоксичные для <i>Aedes aegypti</i> и <i>Culex pipiens pipiens</i> В. П. Ходырев, О. В. Поленогова, А. С. Артемченко, А. В. Кривопапов, В. В. Глунов	870

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

Экспрессия гетерологичной феп-карбоксилазы в <i>Methylococcus capsulatus</i> MIR: влияние на ростовые характеристики и аминокислотный состав биомассы метанотрофа С. Ю. Бут, О. Н. Розова, С. В. Чистякова, Д. С. Потапова, В. Н. Хмеленина, И. И. Мустахимов	879
Индукция алкогольдегидрогеназы у дрожжей <i>Yarrowia lipolytica</i> в стрессовых условиях Е. Н. Бирюкова, А. Ю. Аринбасарова, А. Г. Меденцев	884

CONTENTS

Vol. 93, No. 6, 2024

REVIEWS

- Genomic Evolution of α -Proteobacteria in the Symbiotic System
N. A. Provorov and E. E. Andronov 679

EXPERIMENTAL ARTICLES

- Methanosarcina baikalica* sp. nov., a New Methanogenic Archaea Isolated from Surface Bottom Sediments of Lake Baikal
T. N. Zhilina, A. Yu. Merkel, T. V. Kolganova, V. E. Trubitsyn, V. A. Shcherbakova, N. E. Suzina, N. V. Pimenov 690
- Genome Analysis and Reconstruction of Metabolic Pathways of Amino Acids and Betaine Degradation in the Haloalkaliphilic Bacteria *Anoxynatronum sibiricum*
E. N. Detkova, Yu. V. Boltyanskaya, N. V. Pimenov, A. V. Mardanov, V. V. Kevbrin 702
- The Structure of the Biocrystalline Nucleoid and Its Role in the Regulation of Dissociative Phenotypic Heterogeneity of Microbial Populations
G. I. EP'-Registan, N. E. Suzina, E.V. Demkina, Yu. A. Nikolaev 715
- Modulation of Azithromycin Activity Against Monospecies and Binary Biofilms *Staphylococcus aureus* and *Kytococcus schroeteri* by Norepinephrine
E. V. Diuvenji, I. D. Soloviev, M. V. Sukhacheva, E. D. Nevolina, M. A. Ovcharova, N. A. Loginova, A. M. Mosolova, S. V. Mart'yanov, V. K. Plakunov, A. V. Gannesen 732
- Analysis of Electrophysical Profiles of Plankton and Biofilm Cells on the Model of *Azospirillum baldaniorum* Bacteria
A. V. Sheludko, S. S. Evstigneeva, E. M. Telesheva, Yu. A. Filip'cheva, L. P. Petrova, D. I. Mokeev, I. V. Volokhina, I. V. Borisov, V.D. Bunin, O. I. Guliy 745
- Changes in the Protein Profiles of Planktonic Cultures and Biofilms of *Staphylococcus epidermidis* under Anaerobic Conditions in the Presence of the Hormone CNP
A. V. Gannesen, R. H. Ziganshin, M. A. Ovcharova, A. M. Mosolova, N. A. Loginova, E. V. Diuvenji, E. D. Nevolina, S. V. Mart'yanov, V. K. Plakunov 757
- Bioleaching of Copper-Zinc Concentrate at Different Temperatures
A.G. Bulaev, A. V. Artykova, Yu. A. Elkina, A. V. Kolosov, A. V. Nechaeva, A. V. Beletski, V. V. Kadnikov, V. S. Melmaud, A. V. Mardanov 773
- Formation of Biologically Active Compounds by Siberian *Cordyceps militaris* (L.) Fr. Strains
T. V. Antipova, V. P. Zhelifonova, B. P. Baskunov, Y. A. Litovka, M. M. Patrusheva, V. B. Keshelava, E. S. Mikhaylov, I. N. Chistiakov, I. N. Pavlov 785
- Prevalence of the Phenomenon of Production of Peptide Factors of Antagonism Among Coagulase-Negative *Staphylococci*
T. V. Polyudova, L. M. Lemkina, M. V. Antipyeva, A. L. Yesaev, V. P. Korobov 797

Structural and Genetic Relationship of the O-Antigens of the Type Strains <i>Azospirillum agricola</i> CC-HIH038 and <i>Azospirillum doebereineriae</i> GSF71 <i>E. N. Sigida, V. S. Grinev, M. S. Kokoulin, S. A. Konnova, Y. P. Fedonenko</i>	807
Alkalo-Thermophilic Iron-Reducing Bacteria of the Goryachinskoe Thermal Water Deposit <i>D. G. Zavarzina, A. A. Klyukina, A. Yu. Merkel, T. A. Maslova, A. A. Maslov</i>	818
Phylogenetic Structure of Bacterioplankton in Water Bodies of the Kuibyshev Reservoir Basin During the Period of Mass Development of Cyanobacteria <i>M. V. Umanskaya, M. Yu. Gorbunov</i>	832
Bacterial Communities of the Selenga River, Its Tributaries and Selenginskoe Shallow Water in the Summer Period of 2021 <i>A. S. Zakharenko, I. V. Tomberg, S. V. Bukin, V. V. Blinov, T. I. Zemskaya</i>	849
Determination of the Gut Microbiota Composition of Common Noctule by Bacteriological Analysis and High-throughput Sequencing of 16s rRNA <i>I. V. Popov, I. M. Donnik, T. A. Lipilkina, I. S. Berezinskaia, E. V. Tkacheva, E. A. Lukbanova, A. V. Aleshukina, I. A. Tikhmeneva, T. N. Derezhina, A. P. Evsyukov, T. I. Tverdokhlebova, A. M. Ermakov</i>	864
New Strains of <i>Bacillus thuringiensis subsp. israelensis</i> Highly Toxic for <i>Aedes aegypti</i> and <i>Culex pipiens pipiens</i> <i>V. P. Khodyrev, O. V. Polenogova, A. S. Artemchenko, A. V. Krivopalov, V. V. Glupov</i>	870

SHORT COMMUNICATIONS

Expression of Heterologous PEP-Carboxylase in <i>Methylococcus capsulatus</i> MIR: the Influence on Growth Characteristics and Amino Acid Composition of Methanotrophic Biomass <i>S. Y. But, O. N. Rozova, S. V. Chistyakova, D. S. Potapova, V. N. Khmelenin, I. I. Mustakhimov</i>	879
Induction of Alcohol Dehydrogenase in <i>Yarrowia lipolytica</i> Yeast under Stress Conditions <i>E. N. Biryukova, A. Yu. Arinbasarova, A. G. Medentsev</i>	884

УДК 579.25:579.262

ГЕНОМНАЯ ЭВОЛЮЦИЯ α -ПРОТЕОБАКТЕРИЙ В СИСТЕМЕ СИМБИОЗА

© 2024 г. Н. А. Проворов^а, Е. Е. Андронов^{а, *}

^аВсероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии,
Санкт-Петербург, 196608, Россия

*e-mail: eeandr@gmail.com

Поступила в редакцию 24.06.2024 г.

После доработки 04.07.2024 г.

Принята к публикации 05.07.2024 г.

Одним из основных факторов эволюции бактерий, сопровождаемой глубокими изменениями их генетической организации, является образование симбиозов с эукариотами. Они предоставляют бактериям экологические ниши, находясь в которых симбионты выполняют полезные для хозяев трофические или защитные функции. Приобретение способности к симбиозу связано с формированием у бактерий систем специализированных генов (*sym*), которое обычно сопровождается изменением общей организации генома. У клубеньковых бактерий (ризобий) – азотфиксирующих симбионтов бобовых растений, большинство из которых относится к α -протеобактериям порядка *Hyphomicrobiales*, характер симбиогенных изменений генома зависит от таксономического положения. У эволюционно первичных ризобий сем. *Bradyrhizobiaceae*, возникших из свободноживущих N_2 -фиксаторов путем преобразования их собственных геномов, переход к симбиозу сопровождался существенным (в 1.5–2 раза) увеличением генома, однако он сохранил унитарную структуру: у большинства штаммов *Bradyrhizobium* более 95% генов находится в хромосоме. У вторичных ризобий сем. *Phyllobacteriaceae* (*Mesorhizobium*, *Phyllobacterium*), возникших путем переноса *sym*-генов в почвенные бактерии, выявляются различные стадии образования многокомпонентных геномов, содержащих значительную часть генов в составе внехромосомных элементов (ВХЭ) – плазмид и хромид. Наиболее характерна такая геномная структура для бактерий сем. *Rhizobiaceae* (*Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Neorhizobium*), у которых суммарный размер ВХЭ, содержащих *sym*-гены, может превышать размер хромосомы. У этих ризобий при переходе из тропиков в умеренные широты происходило сужение хозяйской специфичности, однако изменение структуры генома наблюдали только у *Sinorhizobium*: общий размер ВХЭ у этих бактерий достигает 51% генома. Усложнение генома характерно и для ризосферных азотфиксаторов *Azospirillum*: доля ВХЭ в их геномах достигает 60%. Формируемые ризобиями необратимо дифференцированные клеточные формы – бактериоиды, входящие в состав симбиосом, могут рассматриваться как предшественники азотфиксирующих органелл, которые выявлены у некоторых простейших и конструирование которых представляет собой перспективное направление клеточной инженерии растений.

Ключевые слова: клубеньковые бактерии (ризобии), фиксация N_2 , эволюция симбиоза, унитарные и многокомпонентные геномы, плазмиды и хромиды, горизонтальный перенос генов, бактериоиды и симбиосомы, клеточные органеллы, создание N_2 -фиксирующих растений

DOI: 10.31857/S0026365624060018

ВВЕДЕНИЕ

Изучение бактериальных геномов, которое началось более 30 лет назад (Koonin, Wolf, 2008), необходимо для выяснения генетических основ разнообразия прокариот, а также для раскрытия механизмов их прогрессивной и адаптивной эволюции (Bobay, Ochman, 2017). Эта эволюция базируется на процессах приобретения и утраты генов, соотношение которых ограничено размерами геномов свободноживущих бактерий, варьирующими от

1.3 млн. п.н. у морской α -протеобактерии *Pelagibacter ubique* (Giovannoni et al., 2005) до 13 млн. п.н. у почвенной δ -протеобактерии *Sorangium cellulosum* (Schneiker et al., 2007).

Изучение эволюции бактерий связано с анализом связи между их адаптивной стратегией и функциональным составом геномов, который активно проводится для патогенных бактерий, позволяя изучать распространение генов вирулентности и механизмы возникновения болезнетворных форм (Hacker, Kaper, 2000). Подробное изучение

геномной организации проведено для облигатных симбионтов насекомых, имеющих глубоко редуцированные геномы, которые сохранили лишь 10–20% предковых генов (Whittle et al., 2021). Их редукцию связывают с отказом симбионтов от функций автономного существования, а также с генетическим дрейфом, который обусловлен регулярным прохождением микробной популяции через “бутылочное горлышко” вертикальной передачи (Naito, Pawlowska, 2016). Еще более глубокой редукцией характеризуются клеточные органеллы, которые обладают рудиментарными геномами (сохраняется 1–5% предковых генов), а иногда полностью их лишены (Daley, Whelan, 2005).

Данные о влиянии на геномную организацию бактерий факультативного симбиоза ограничены. Показано, что при его образовании геномы бактерий могут как увеличиваться, так и уменьшаться в зависимости от их таксономического положения и от механизма взаимодействия партнеров. У многих бактерий при переходе к симбиозу сохраняются характерные для свободноживущих форм унитарные геномы “колийного” типа (свыше 95% генов находится в хромосоме), однако у некоторых бактерий геномы приобретают многокомпонентную форму (MacLean et al., 2007).

Наиболее разработанной моделью эволюционной геномики факультативных симбионтов являются клубеньковые бактерии (ризобии) – полифилетичные по происхождению N_2 -фиксирующие симбионты бобовых растений, включающие ряд представителей α -протеобактерий (10–12 семейств, входящих в порядок *Hyphomicrobiales* или *Rhizobiales*) и некоторые β -протеобактерии (сем. *Burkholderiaceae*) (Berrada, Fikri-Benbrahim, 2014). Показано, что у ризобий в ходе коэволюции с растениями возникают системы симбиотически специализированных (*sym*) генов, которые обычно обособлены от генов домашнего хозяйства и выявляются в составе плазмид, хромид или хромосомных островов. При этом *sym*-гены приобретают высокую мобильность и легко перемещаются в различные почвенные бактерии, что приводит к возникновению новых симбионтов растений. Однако молекулярные и экологические механизмы, определяющие геномную эволюцию ризобий, остаются малоизученными.

В связи с этим целью нашей работы стал анализ вопросов о том: 1) как приобретение способности к N_2 -фиксирующему симбиозу с растениями влияет на структуру генома в разных группах α -протеобактерий; 2) каковы молекулярные механизмы и экологические факторы симбиогенной эволюции их геномов; 3) как их организация связана с процессами видообразования и с изменениями симбиотических признаков бактерий – хозяйской специфичности и N_2 -фиксирующей активности.

ОРГАНИЗАЦИЯ ГЕНОМА

Для ризобий характерны два направления эволюции генома: увеличение его размера и переход к многокомпонентной структуре. Первое направление реализуется главным образом у первичных ризобий, возникших из свободноживущих N_2 -фиксаторов путем внутригеномных перестроек, которые привели к формированию системы *sym*-генов. Она включает гены N_2 -фиксации (*nif/fix*) и образования клубеньков (*nod*), представляя собой расширение базового генома за счет формирования нового генного функционала. Второе направление эволюции является качественным развитием первого направления и заключается в обособлении и повышении мобильности симбиотической системы, которое было реализовано при возникновении вторичных ризобий путем переноса *sym*-генов в различные почвенные и ассоциированные с растениями бактерии (Provorov et al., 2022).

Показано, что в ходе эволюции первичных ризобий рода *Bradyrhizobium* их геномы увеличились в 1.5–2 раза по сравнению с предковыми формами (*Rhodopseudomonas*). При этом произошло еще более значительное (в 3–4 раза) увеличение пангенома, в первую очередь его акцессорной части, определяющей экологическую пластичность бактерий (Oda et al., 2008; Mornico et al., 2012; Tian et al., 2012). В результате этого бактерии рода *Bradyrhizobium* сформировали наиболее крупные среди всех ризобий геномы, размеры которых достигают 11.7 млн. п.н. (в среднем 8.6 млн. п.н.). Некоторые штаммы брадиризобий содержат криптические плазмиды, однако они относительно невелики (до 300 т.п.н.) и обычно составляют лишь 2–3% генома, сохраняющего типичную для предков унитарную форму (Ormeño-Orrillo, Martínez-Romero, 2019).

Однако уже у первичных ризобий можно проследить начальные этапы перехода к многокомпонентной структуре генома, состоящего из двух или более сопоставимых по размеру репликонов (Hernández-Oaxaca et al., 2022). Так, при изучении 9 штаммов *Bradyrhizobium*, выделенных из клубеньков тропических бобовых растений, у 2 штаммов, для которых характерны наибольшие размеры хромосомы (9882–10272 т.п.н.), были выявлены крупномолекулярные плазмиды. Поскольку у этих штаммов, как и у большинства брадиризобий, *sym*-гены находятся в хромосомах, можно предположить, что непосредственной причиной образования многокомпонентного генома является увеличение его размера.

К настоящему времени описан лишь один штамм *Bradyrhizobium* (DOA9), для которого характерна внехромосомная локализация *sym*-генов (Wongdee et al., 2018). *Sym*-плазмида этого штамма, выделенного из бобового растения *Aeschynomene americana*, имеет размер 736 т.п.н. (9.4% генома) и содержит

гены, контролирующие образование клубеньков (*nod*), N_2 -фиксацию (*nif*, *fix*), а также систему секреции 3-го типа. Эта плазида характеризуется более низким содержанием ГЦ-пар (60.1%), чем хромосома (64.4%). Важно отметить, что в хромосоме штамма DOA9 выявлены 2 несцепленных локуса, один из которых содержит *nif*- и *fix*-гены, а другой *fix*-гены. По-видимому, *Sym*-плазида этого штамма возникла путем дупликаций симбиотически специализированных участков хромосомы. Анализ геномов различных штаммов *Bradyrhizobium* показал, что DOA9 может считаться переходной формой от фототрофов, лишенных *nod*-генов, к гетеротрофам, которые эти гены имеют (Okazaki et al., 2015).

Сравнительное изучение вторичных ризобий сем. *Phyllobacteriaceae* (*Mesorhizobium*, *Phyllobacterium*) позволило охарактеризовать последовательные этапы их эволюции (Wang et al., 2014): а) приобретение общим предком данного семейства кластера *sym*-генов, который сформировал хромосомный остров (ХО); б) диверсификацию этого ХО, которая привела к возникновению широкого спектра симбионтов, различающихся по хозяйской специфичности; в) выявленное у некоторых видов *Mesorhizobium* преобразование ХО в *Sym*-плазмиду. Широкое варьирование мезоризобий по хозяйской специфичности может быть связано с диверсификацией генов, контролирующих развитие клубеньков, а также образование систем секреции 3, 4 и 6 типов. У широко специфичных штаммов этих бактерий сигнальные Nod-факторы, кодируемые *nod*-генами, имели относительно простую структуру, которая усложнялась по мере симбиотической специализации ризобий (Laranjo et al., 2014).

Многокомпонентная геномная структура, связанная с наличием ВХЭ, сопоставимых по размеру с хромосомой, наиболее характерна для вторичных ризобий семейства *Rhizobiaceae* (Ormeño-Orrillo et al., 2015; Kuzmanović et al., 2022): у них мегаплазмиды и хромиды, в состав которых входят *sym*-гены, могут составлять более половины генома. Эволюция этого генома изучена у родов *Rhizobium* и *Sinorhizobium* (*Ensifer*), которые включают ancestrальные тропические виды и возникшие из них виды умеренных широт (табл. 1).

Наиболее глубокие изменения геномов, происходящие при переходе бактерий из тропиков в умеренные широты, выявлены в роде *Sinorhizobium*. Он включает симбиотически активные виды, обладающие либо широкой хозяйской специфичностью — способностью формировать N_2 -фиксирующие клубеньки у представителей разных подсемейств бобовых (тропические виды, из которых наиболее изучен *S. fredii*), либо узкой специфичностью (виды умеренных широт *S. meliloti* и *S. medicae* — N_2 -фиксирующие симбионты люцерны, донника и пажитника), а также свободноживущие виды — возможные

предшественники симбиотических видов (Fagorzi et al., 2020). На примере этого рода было показано, что репликоны, входящие в состав многокомпонентных геномов ризобий, имеют разные механизмы эволюции. Так, при анализе 190 штаммов *S. meliloti*, выделенных из клубеньков *Medicago truncatula* в различных регионах Южной Европы, выявлено сходство филогений хромид М1 (содержит *nod*-, *nif*- и *fix*-гены) и М2 (содержит важные для симбиоза гены, участвующие в синтезе экзополисахаридов и в усвоении углеводов), которые отличаются от филогении хромосомы (Riley et al., 2022). При этом эволюция хромосомы и М2 определяется главным образом перестройками собственных геномов, а эволюция М1 и криптических плазмид — путем горизонтального переноса генов (ГПГ).

Большой интерес для изучения эволюции *Sinorhizobium* представляют переходные формы, к числу которых относится штамм T173T, выделенный из клубеньков донника в Канаде и близкий к асимбиотическому виду *S. adhaerens* (Bromfield et al., 2023). Этот штамм образует нормальные по структуре, но не фиксирующие N_2 клубеньки у люцерны и донника. Его геном состоит из кольцевой хромосомы (4051 т.п.н.) и двух хромид (1914 и 947 т.п.н.), которые, как и хромосома, несут гены рРНК. В отличие от других симбионтов люцерны, штамм T173T содержит *sym*-гены (*nod*, *nif*, *fix*) на относительно небольшой (204 т.п.н.) плазмиде. Анализ этих генов показал, что они были приобретены путем горизонтального переноса генов (ГПГ) от *S. medicae*.

Сравнительный анализ широко- и узкоспецифичных видов *Sinorhizobium* позволяет предположить, что основным направлением их эволюции было увеличение внехромосомной части генома (табл. 1). Различные стадии этого процесса представлены широкоспецифичными штаммами *S. fredii*, у которых доля ВХЭ в геноме варьирует от 7.9 до 43.1% (Schmeisser et al., 2009; Schuldes et al., 2012; Vinardell et al., 2015). Гораздо менее изменчивы узкоспецифичные виды синоризобий *S. meliloti* и *S. medicae*, у которых ВХЭ составляют 45.5–50.7% генома.

Род *Rhizobium*, как и *Sinorhizobium*, включает широкоспецифичные тропические виды (*R. etli*) и узкоспецифичные виды умеренных широт (*R. leguminosarum*). Эти виды сходны по организации генома, который состоит из хромосомы (около 65% генома) и 2–6 ВХЭ, варьирующих по размеру от 100 до 1100 т.п.н. (Gonzalez et al., 2006; Reeve et al., 2010; Perry et al., 2020). Основное различие геномов *R. leguminosarum* и *R. etli* касается их рекомбинационной активности, определяемой ГПГ. У *R. leguminosarum* перенос *sym*-генов происходит свободно внутри вида, однако их перенос в бактерии других видов наблюдают редко. В то же время, для *R. etli* показан интенсивный обмен *sym*-генами с неродственными тропическими ризобиями, например, с *S. fredii* (Cervantes et al., 2011).

Таблица 1. Сравнительная характеристика видов ризобий сем. *Rhizobiaceae*, обитающих в тропических и умеренных широтах

Роды бактерий	<i>Sinorhizobium</i>		<i>Rhizobium</i>	
Распространение бактерий	Тропики	Умеренные широты	Тропики	Умеренные широты
Виды	<i>S. fredii</i> , <i>S. garamanticum</i> , <i>S. numidicum</i> , <i>S. saheli</i> , <i>S. terangaе</i>	<i>S. meliloti</i> , <i>S. medicae</i>	<i>R. etli</i>	<i>R. leguminosarum</i>
Биовары, различающиеся по спектру хозяев, с которыми образуются N ₂ -фиксирующие клубеньки	Не выявлены	Не выявлены	bv. <i>phaseoli</i> (<i>Phaseolus</i>), bv. <i>mimosae</i> (<i>Phaseolus</i> , <i>Mimosa</i> , <i>Leucaena</i>)	bv. <i>viciae</i> (<i>Lathyrus</i> , <i>Lens</i> , <i>Pisum</i> , <i>Vavilovia</i> , <i>Vicia</i>), bv. <i>trifolii</i> (<i>Trifolium</i>), bv. <i>phaseoli</i> (<i>Phaseolus</i>)
Хозяйственная специфичность отдельных штаммов (биоваров)	Широкая: разные подсемейства бобовых	Узкая: одна триба бобовых (<i>Trifolieae</i>)	Широкая: разные подсемейства бобовых	Узкая: одна триба бобовых (<i>Fabeae</i> , <i>Phaseoleae</i> или <i>Trifolieae</i>)
Размер генома, млн. п.н.	6.89–7.25	6.45–7.95	6.53	6.70–7.79
Доля хромосомы, %	57.0–91.2	49.3–54.5	67.1	63.0–68.4
Хромиды или мегаплазмиды (более 1000 т.п.н.)	Одна (у некоторых штаммов отсутствует)	Две	Одна или отсутствует	Одна или отсутствует
Локализация <i>gum</i> -генов	Плазмида (550–650 т.п.н.)	Меньшая из хромид (1000–1600 т.п.н.)	Плазмида (200–500 т.п.н.)	Плазмида (300–400 т.п.н.)

Важнейшим результатом эволюции генома ризобий является повышение его пластичности: оно выявляется уже у первичных симбионтов (*Bradyrhizobium*), для которых характерно накопление повторяющихся последовательностей ДНК (Sameshima et al., 2003). Определяемая ими рекомбинационная активность может быть столь велика, что приводит к неспособности поддерживать постоянную структуру генома, что показано для штамма NGR234 *S. fredii*, у которого повторяющиеся последовательности и мобильные элементы составляют около 20% генома (Broughton et al., 2000).

Многокомпонентные геномы выявлены и у α -протеобактерий рода *Azospirillum* – ассоциативных (ризосферных, эндофитных) N₂-фиксаторов, которые существенно превосходят по размерам унитарные геномы своих свободноживущих родичей и возможных предков – *Rhodospirillum* и *Magnetospirillum* (Wisniewski-Dyé et al., 2012). Важно отметить, что у азоспирилл, в отличие от имеющих многокомпонентные геномы ризобий сем. *Rhizobiaceae*, кодирующие нитрогеназу *nif*-гены находятся в хромосоме, которая у *Azospirillum* составляет лишь 40–45% генома. Ярко выраженный параллелизм

эволюции первичных ризобий (*Bradyrhizobium*) и азоспирилл (табл. 2) делает последних удобной моделью для изучения механизмов возникновения бобово-ризобияльного симбиоза. Так, заселение азоспириллами клубенек-подобных структур, развитие которых на корнях злаков (кукурузы, пшеницы) индуцировано аналогом ауксина 2.4-D, резко повышает нитрогеназную активность этих бактерий, превращая их из низкоактивных ризосферных N₂-фиксаторов в высокоактивных эндосимбионтов (Saikia et al., 2007).

ЭВОЛЮЦИЯ СИМБИОЗА И ВИДООБРАЗОВАНИЕ

Использование методов сравнительной и функциональной геномики позволяет охарактеризовать механизмы симбиогенной эволюции ризобий, которая основана на возникновении и последующей диверсификации *gum*-генов, тесно связанной с процессами видообразования. В этой эволюции задействованы два механизма – дупликация-дивергенция генов и ГПГ. Первый механизм преобладает

Таблица 2. Сравнительная характеристика первичных ризобий и азоспирилл

Показатели	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Azospirillum</i>
Способность к diazотрофному росту <i>ex planta</i>	Отсутствует (большинство штаммов проявляет низкую нитрогеназную активность)	Характерна
Растения-хозяева	Бобовые (у некоторых штаммов — также небобовое <i>Parasponia</i>)	Различные растения
Локализация в растениях	В корневых, реже в стеблевых клубеньках, обычно внутриклеточная	На поверхности или в тканях корней, внеклеточная
Инокуляция растений	Через корневые волоски, иногда через разрывы эпидермиса	Через межклеточные пространства
Действие синтезируемых бактериями гормонов на растения	Не выявлено	Стимуляция развития корней, повышение их ассимиляционной активности
Размер и тип генома	7300–10100 т.п.н., обычно унитарный (хромосома составляет более 95% генома)	6400–7600 т.п.н., многокомпонентный (хромосома составляет менее 40–45% генома)
Локализация генов N ₂ -фиксации	Обычно в хромосоме, иногда в плазмидах	В хромосоме
Возможные предки их типы питания их геномы	<i>Rhodopseudomonas</i> Фото-дiazотрофы Унитарные (5400–5600 т.п.н.)	<i>Rhodospirillum</i> , <i>Magnetospirillum</i> Фото-дiazотрофы Унитарные (4600–4900 т.п.н.)

у первичных ризобий, которые возникли из свободноживущих N₂-фиксаторов, второй механизм — у вторичных ризобий, возникших путем переноса *sym*-генов в различные почвенные бактерии (Provorov et al., 2022).

Одним из основных направлений эволюции *sym*-генов является их обособление от “несимбиотической” части бактериального генома (кластеризация *sym*-генов), после чего происходит повышение компактности *sym*-кластеров и их переход в состав мобильных генетических элементов (хромосомные острова, плазмиды, хромиды). Интенсивный перенос *sym*-генов сопряжен с усложнением популяционной структуры ризобий, определяемой балансом симбиотических и несимбиотических экотипов (Denison, Kiers, 2004). Последние наиболее приспособлены к автономному существованию и могут приобретать симбиотические свойства путем ГПГ. Такую популяционную структуру поддерживает дизруптивный отбор, который определяется циркуляцией ризобий между эндо-симбиотическими и почвенными нишами, способствуя поддержанию высоких темпов геномной эволюции (Проворов и соавт., 2017).

Данные направления эволюции наиболее изучены на примере видов *Rhizobium* и *Sinorhizobium*, обладающих многокомпонентными геномами и реализующих различные стратегии видообразования. Оно может приводить к появлению: а) политипических видов, которые состоят из биоваров, различающихся по хозяйской специфичности и по структуре контролирующих ее *sym*-генов, но близки

по коровым генам, определяющим функции домашнего хозяйства; б) видов-двойников, которые имеют сходную хозяйскую специфичность, но дивергировали по коровой части генома.

У *Rhizobium* и *Sinorhizobium* эта эволюция тесно связана с переходом от широкоспецифичных тропических форм к узкоспецифичным формам умеренных широт (табл. 1). Наиболее резким сужением хозяйской специфичности было у бактерий рода *Sinorhizobium*: некоторые штаммы тропического вида *S. fredii* (NGR234) вступают в симбиоз с растениями из более чем 100 родов, относящихся ко всем трем подсемействам бобовых, а также с *Parasponia* (сем. *Cannabaceae*). В то же время виды умеренных широт (*S. meliloti*, *S. medicae*) образуют симбиоз с представителями трех близкородственных родов (*Medicago*, *Melilotus* и *Trigonella*) из трибы *Trifolieae*. Различия этих видов ризобий касаются взаимодействия лишь с некоторыми диплоидными видами люцерны (*Medicago arabica*, *M. polymorpha*), которые образуют N₂-фиксирующие клубеньки с *S. medicae*, но не с *S. meliloti* (Rome et al., 1996).

У бактерий рода *Rhizobium* сужение хозяйской специфичности при переходе из тропиков в умеренные широты проявляется не столь резко, как у *Sinorhizobium*. Это различие может быть связано с тем, что у *Rhizobium* выявлена отсутствующая у *Sinorhizobium* политипическая структура видов: *R. leguminosarum* разделяется на три различающихся по хозяйской специфичности биовара, *R. etli* — на два биовара (табл. 1). Хотя каждый из биоваров *R. leguminosarum* образует N₂-фиксирующий

симбиоз с представителями лишь одной трибы бобовых, в рамках этого вида сохраняется способность к симбиозу с растениями из разных триб подсемейства мотыльковых, образующих контрастные типы клубеньков (bv. *viciae* и bv. *trifolii* — недетерминированные, bv. *phaseoli* — детерминированные клубеньки). Перекрестная инокуляция биоваров *R. leguminosarum* может приводить к образованию клубеньков, однако они лишены N_2 -фиксирующей активности и часто имеют опухолеподобную структуру (Онищук и соавт., 2023).

При изучении политипической структуры вида *R. etli* оказалось, что различия между его биоварами проявляются не столь контрастно, как между биоварами *R. leguminosarum*. Так, штаммы *R. etli*, относящиеся к биовару *mimosae*, способны формировать N_2 -фиксирующие клубеньки с бобовыми растениями из подсемейств мотыльковых (*Phaseolus* — образует детерминированные клубеньки) и мимозовых (*Mimosa*, *Leucaena* — образуют недетерминированные клубеньки), тогда как штаммы биовара *phaseoli* проявляют эту способность только с *Phaseolus* (Wang et al., 1999).

Особенностью вида *R. leguminosarum* является одновременно происходящая и в значительной степени независимая дивергенция симбиотически специализированной части генома (образование биоваров с различной хозяйской специфичностью) и его коровой части (образование хромосомных линий или сестринских видов, которые могут включать штаммы разных биоваров) (Kumar et al., 2015; Young et al., 2023). Данная таксономическая структура позволяет рассматривать *R. leguminosarum* как видовой комплекс (надвид), возникший в результате “двумерной” эволюции многокомпонентного генома. Это существенно отличает род *Rhizobium* от *Sinorhizobium*, у которого дивергенция коровой части генома привела к возникновению видов-двойников *S. meliloti* и *S. medicae*: их расхождение по *сут*-генам невелико и не сопровождается образованием биоваров с различной хозяйской специфичностью.

Важно отметить, что чрезвычайно широкая программа видообразования реализуется у *Rhizobium* несмотря на то, что диверсификация геномов (их разделение на хромосомы и хромиды) у этих ризобий менее выражена, чем у *Sinorhizobium*. Это различие, по-видимому, связано с повышенной восприимчивостью *Rhizobium* к интеграции новых *сут*-генов, приводящей к образованию рекомбинантов с резко измененными симбиотическими свойствами. К их числу может быть отнесен штамм Norway *R. leguminosarum* bv. *viciae*, который способен инфицировать “чужеродного” хозяина — лядвенец, однако на основном хозяине, горохе образует не фиксирующие N_2 клубеньки, либо вообще не образует клубеньков (Liang et al., 2018).

Одним из результатов сужения хозяйской специфичности, происходящей при переходе ризобий

сем. *Rhizobiaceae* из тропиков в умеренные широты, является возникновение “альтруистической” стратегии симбиоза (Provorov, 2021). Она связана с преобразованием бактерий в неспособные к размножению N_2 -фиксирующие бактериоиды, находящиеся во временных органеллах растительной клетки — симбиосомах, которые можно рассматривать как аналоги постоянных клеточных органелл (de la Pena et al., 2017). Эволюция симбиосом связана с их переходом от мультибактериальной к монобактериальной организации, который показан при сравнении альтернативных типов (детерминированных и недетерминированных) клубеньков, образуемых различными таксономическими группами бобовых (Sprent, 2001). Наиболее глубокая дифференцировка бактериоидов наблюдается в недетерминированных клубеньках, образуемых растениями галегоидного комплекса (трибы Fabaeae, Galegae, Trifolieae) с ризобиями сем. *Rhizobiaceae*. Ключевые этапы перехода этих растений к монобактериальной организации симбиосом зарегистрированы в группе перекрестной инокуляции, образуемой *R. leguminosarum* bv. *viciae* с растениями трибы Fabaeae. Оказалось, что анцестральные штаммы этих ризобий, выделенные из реликтового бобового *Vavilovia formosa*, образуют менее дифференцированные бактериоиды, сходные с клетками свободноживущих бактерий и выявляемые в мультибактериальных симбиосомах, чем эволюционно продвинутые симбионты гороха, которые образуют монобактериальные симбиосомы (Tsyganova et al., 2018).

Важно отметить, что дифференцировка бактериоидов контролируется обоими партнерами симбиоза. Со стороны бактерий в ней участвует ген *bacA* (кодирует поверхностный белок, вовлеченный в образование внутриклеточного симбиоза не только у ризобий, но и у родственных им патогенов животных — бруцелл; Parent et al., 2007; Kagunakaran et al., 2010). Со стороны растений в дифференцировке бактериоидов участвуют NCR-пептиды, сходные с защитными факторами дефензинами и блокирующие деление бактерий в симбиосомах. Поэтому их образование может быть представлено как результат коэволюции партнеров, основанной на действии в микробных популяциях специфичных для симбиоза селективных и стохастических факторов, индуцируемых растениями-хозяевами (Проворов и соавт., 2017).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Симбиоз с эукариотами — один из наиболее значимых факторов эволюции бактерий. Он повышает их изменчивость, связанную с геномными перестройками и с горизонтальным переносом генов, а также вызывает действие селективных факторов, которые придают эволюции микробного

Таблица 3. Изменение состава пангенома в эволюции первичных (*Bradyrhizobiaceae*) и вторичных (*Sinorhizobium*) ризобий

Гены	Доля различных групп генов (%) в пангеномах ризобий			
	Семейство <i>Bradyrhizobiaceae</i> *		Род <i>Sinorhizobium</i> **	
	Свободноживущие виды	Симбиотические виды	Свободноживущие виды	Симбиотические виды
Коровые	45.2–49.3	8.0–39.8	28.7	24.7
Акцессорные	50.4–54.2	40.2–92.0	71.3	75.3
Всего генов	менее 8000	12000–35000	12225	10820

Примечание. Данные *Oda et al., 2008; Mornico et al., 2012; Tian et al., 2012; **Fargozi et al., 2020.

генома направленный характер, определяемый его объединением с геномом хозяина в единую систему наследственности (Provoov, Tikhonovich, 2023).

Важнейшим результатом перехода свободноживущих N_2 -фиксаторов к факультативному симбиозу с растениями является усложнение микробного генома. Оно наиболее ярко проявляется у α -протеобактерий — одной из наиболее молодых и быстро эволюционирующих групп прокариот (Moreno, 1998). Изучение клубеньковых бактерий (ризобий) порядка *Hyphomicrobiales* (*Rhizobiales*) показало, что симбиотически обусловленные изменения генома по-разному проявляются в различающихся по происхождению группах этих бактерий.

У эволюционно первичных ризобий (*Bradyrhizobiaceae*), возникших из свободноживущих N_2 -фиксаторов, родственных *Rhodopseudomonas*, путем преобразования их собственных геномов, сохраняется их унитарная структура: у большинства штаммов *Bradyrhizobium* свыше 95% генов, включая *sum*-гены, находится в хромосоме. Различные стадии перехода к многокомпонентной структуре генома выявлены у вторичных ризобий сем. *Phyllobacteriaceae*, которые возникли путем переноса сформировавшихся ранее систем *sum*-генов в свободноживущие бактерии. У представителей этого семейства *sum*-гены находятся в мобильных хромосомных островах, а иногда и на плазмиде (Laranjo et al., 2014), что определяет высокую частоту переноса генов в популяциях и быструю эволюцию симбиоза. Наиболее высокая мобильность *sum*-генов у бактерий сем. *Rhizobiaceae*, которые характеризуются ярко выраженной многокомпонентной организацией генома. Эти бактерии содержат *sum*-гены в составе ВХЭ — плазмид или хромид, которые у некоторых штаммов *Sinorhizobium* составляют более половины генома.

Интересно отметить, что у бактерий сем. *Rhizobiaceae*, в отличие от *Bradyrhizobiaceae* и *Phyllobacteriaceae*, переход к симбиозу не сопровождается увеличением генома, а у *Sinorhizobium* даже приводит к его уменьшению (табл. 3). Оно может быть связано с утратой ряда генов, интерферирующих с развитием симбиоза — его негативных регуляторов,

которые выявлены у узкоспецифичных симбионтов бобовых растений галеогидного комплекса (Проворов и соавт., 2014). Важно подчеркнуть, что во всех группах ризобий приобретение способности к симбиозу сопровождается сходными изменениями пангеномов: их акцессорные части увеличиваются, а коровые части уменьшаются (табл. 3).

На примере *S. meliloti* показано, что репликоны, входящие в состав многокомпонентных геномов, эволюционируют посредством разных механизмов: хромосома и хромиды, представляющие в основном коровую часть генома — путем внутригеномных перестроек (дупликация-дивергенция и неофункционализация генов), а *Sym*-плазмиды и криптические плазмиды, представляющие акцессорную часть генома — путем ГПГ (Riley et al., 2022).

Большой интерес представляет связь между эволюцией многокомпонентных геномов и процессами видообразования, которые у *Rhizobium* и *Sinorhizobium* происходят при переходе от тропических форм, обладающих широкой хозяйской специфичностью (вступают в симбиоз с растениями из разных подсемейств бобовых, образующими как детерминированные, так и недетерминированные клубеньки), к узкоспецифичным формам умеренных широт (вступают в симбиоз с растениями определенной трибы или рода бобовых, образующими лишь один тип клубеньков). У *Sinorhizobium* этот переход связан с резким изменением организации генома и с сокращением разнообразия растений-хозяев от представителей всех трех подсемейств бобовых (*S. fredii*) до одной трибы бобовых (*S. meliloti*, *S. medicae*).

У *Rhizobium* переход в умеренные широты не вызывает изменений относительных размеров хромосомы и ВХЭ, а спектр растений-хозяев остается широким: у *R. leguminosarum* он включает представителей разных триб подсемейства мотыльковых. Важно отметить, что этот вид ризобий осуществляет два параллельных и относительно независимых направления эволюции, затрагивающих либо симбиотически специализированную часть генома (разделение на биовары, обладающие разными спектрами

хозяев), либо его коровую часть (разделение на хромосомные линии или геномные виды, которые включают представителей разных биоваров и могут стабильно сосуществовать в почвенной экосистеме; Young et al., 2023). Эта “двумерная” эволюция может быть связана с высокой частотой переноса генов в популяциях *R. leguminosarum*, которая определяется локализацией *sym*-генов в мобильных плаزمиде — наиболее активно эволюционирующих компонентах бактериальных геномов.

Важно отметить, что процессы образования многокомпонентных геномов, выявленные у протеобактерий α -группы, не характерны для β - и γ -групп, хотя они, как и α -протеобактерии, включают множество симбиотических форм, например, β -ризобии. Более того, β - и γ -протеобактерии имеют разнообразные системы для внутригеномных перестроек и ГПГ (конъюгативные плазмиды, трансдуцирующие фаги, транспозоны и IS-элементы), определяющих активную эволюцию генома. В этой связи важно подчеркнуть, что трансформация в клеточные органеллы произошла только у α -протеобактерий (близкими родичами митохондрий являются представители порядков *Rhizobiales* и *Rickettsiales*; Georgiades, Raoult, 2011) и не выявлена у β - и γ -протеобактерий.

Высокие темпы геномной эволюции ризобий создают предпосылки для повышения эффективности симбиотической N_2 -фиксации и определяемого ей влияния бактерий на продуктивность растений. Это повышение связано с переходом ризобий к “альтруистической” стратегии симбиоза, которая характеризуется образованием неспособных к размножению бактериоидов, активно фиксирующих N_2 в составе симбиозом — аналогов клеточных органелл (de la Pena et al., 2017). Их изучение имеет важное значение для разработки методов конструирования высокоэффективных микробно-растительных систем сельскохозяйственного назначения, одним из направлений которого может считаться создание N_2 -фиксирующих органелл, стабильно поддерживаемых клеткой-хозяином (Lopez-Torres et al., 2016). Эти органеллы, выявленные у некоторых одноклеточных эукариот (*Braarudosphaera bigelowii*), по своей генетической организации близки к митохондриям и пластидам (Coale et al., 2024). Поэтому перспективным направлением биотехнологии растений может считаться введение *nif*-генов в их постоянные клеточные органеллы, предшественники которых (α -протеобактерии и цианобактерии) были, по всей видимости, способны к фиксации молекулярного азота.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России в рамках Соглашения № 075-15-2021-1055 от 28 сентября 2021 г. о предоставлении гранта

в форме субсидии из федерального бюджета на реализацию проекта “Мобилизация генетических ресурсов микроорганизмов на базе Ведомственной коллекции полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения (ВКСМ) при ФГБНУ ВНИИСХМ с использованием сетевого принципа организации”.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Онищук О.П., Курчак О.Н., Кимеклис А.К., Аксенова Т.С., Андронов Е.Е., Проворов Н.А. Биоразнообразие симбиозов, образуемых клубеньковыми бактериями *Rhizobium leguminosarum* с бобовыми растениями галегоидного комплекса // Сельскохозяйственная биология. 2023. Т. 58. № 1. С. 87–99.
- Onishchuk O.P., Kurchak O.N., Kimeklis A.K., Aksenova T.S., Andronov E.E., Provorov N.A., Biodiversity of the symbiotic systems formed by nodule bacteria *Rhizobium leguminosarum* with the leguminous plants of galeoid complex // Agricultural Biology. 2023. V. 58. № 1. P. 77–85.
- Проворов Н.А., Андронов Е.Е., Онищук О.П. Формы естественного отбора, определяющего геномную эволюцию клубеньковых бактерий // Генетика. 2017. Т. 53. С. 401–410.
- Provorov N.A., Andronov E.E., Onishchuk O.P. Forms of natural selection controlling the genomic evolution in nodule bacteria // Rus. J. Genetics. 2017. V. 53. P. 411–418.
- Проворов Н.А., Онищук О.П., Юргель С.Н., Курчак О.Н., Чижевская Е.П., Воробьев Н.И., Затовская Т.В., Симаров Б.В. Конструирование высокоэффективных симбиотических штаммов бактерий: эволюционные модели и генетические подходы // Генетика. 2014. Т. 50. С. 1273–1285.
- Provorov N.A., Onishchuk O.P., Yurgel S.N., Kurchak O.N., Chizhevskaya E.P., Vorobyov N.I., Zatovskaya T.V., Simarov B.V. Construction of highly-effective symbiotic bacteria: evolutionary models and genetic approaches // Rus. J. Genetics. 2014. V. 50. P. 1125–1134.
- Berrada H., Fikri-Benbrahim K. Taxonomy of the rhizobia: current perspectives // British Microbiol. Res. J. 2014. V. 4. P. 616–639.

- Bobay L.M., Ochman H. The evolution of bacterial genome architecture // *Front. Genet.* 2017. V. 8. Art. 72.
- Bromfield E.S.P., Cloutier S., Hynes M.F. *Ensifer canadensis* sp. nov. strain T173T isolated from *Melilotus albus* (sweet clover) in Canada possesses recombinant plasmid pT173b harboring symbiosis and type IV secretion system genes apparently acquired from *Ensifer medicae* // *Front. Microbiol.* 2023. V. 14. Art. 1195755.
- Broughton W.J., Jabbouri S., Perret X. Keys to symbiotic harmony // *J. Bacteriol.* 2000. V. 182. P. 5641–5652.
- Cervantes L., Bustos P., Girard L., Santamaría R.I., Dávila G., Vinuesa P., Romero D., Brom S. The conjugative plasmid of a bean-nodulating *Sinorhizobium fredii* strain is assembled from sequences of two *Rhizobium* plasmids and the chromosome of a *Sinorhizobium* strain // *BMC Microbiol.* 2011. V. 11. Art. 149.
- Coale T.H., Loconte V., Turk-Kubo K.A., Vanslebrouck B., Mak W.K.E., Cheung S., Ekman A., Chen J.H., Hagino K., Takano Y., Nishimura T., Adachi M., Le Gros M., Larabell C., Zehr J.P. Nitrogen-fixing organelle in a marine alga // *Science*. 2024. V. 384. P. 217–222.
- Daley D.O., Whelan J. Why genes persist in organelle genomes? // *Genome Biol.* 2005. V. 6. Art. 110. <https://doi.org/10.1186/gb-2005-6-5-110>
- de la Peña T., Fedorova E., Pueyo J.J., Lucas M.M. The symbiosome: legume and rhizobia co-evolution toward a nitrogen-fixing organelle? // *Front. Plant Sci.* 2017. V. 8. Art. 2229.
- Denison R.F., Kiers E.T. Lifestyle alternatives for rhizobia: mutualism, parasitism, and forgoing symbiosis // *FEMS Microbiol. Lett.* 2004. V. 237. P. 187–193.
- Fagorzi C., Ilie A., Decorosi F., Cangiali L., Viti C., Mengoni A., diCenzo G.C. Symbiotic and nonsymbiotic members of the genus *Ensifer* (syn. *Sinorhizobium*) are separated into two clades based on comparative genomics and high-throughput phenotyping // *Genome Biol. Evol.* 2020. V. 12. P. 2521–2534.
- Georgiades K., Raoult D. The rhizome of *Reclinomonas americana*, *Homo sapiens*, *Pediculus humanus* and *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria // *Biology Direct*. 2011. V. 6. P. 55.
- Giovannoni S.J., Tripp H.J., Givan S., Podar M., Vergin K.L., Baptista D., Bibbs L., Eads J., Richardson T.H., Noordewier M., Rappé M.S., Short J.M., Carrington J.C., Mathur E.J. Genome streamlining in a cosmopolitan oceanic bacterium // *Science*. 2005. V. 309. P. 1242–1245.
- González V., Santamaría R.I., Bustos P., Hernández-González I., Medrano-Soto A., Moreno-Hagelsieb G., Janga S.C., Ramírez M.A., Jiménez-Jacinto V., Collado-Vides J., Dávila G. The partitioned *Rhizobium etli* genome: genetic and metabolic redundancy in seven interacting replicons // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006. V. 103. P. 3834–3839.
- Hacker J., Kaper J.B. Pathogenicity islands and the evolution of microbes // *Annu. Rev. Microbiol.* 2000. V. 54. P. 641–679.
- Hernández-Oaxaca D., Claro-Mendoza K.L., Rogel M.A., Rosenblueth M., Velasco-Trejo J.A., Alarcón-Gutiérrez E., García-Pérez J.A., Martínez-Romero J., James E.K., Martínez-Romero E. Genomic diversity of *Bradyrhizobium* from the tree legumes *Inga* and *Lytiloma* (Caesalpinioideae-Mimosoid clade) // *Diversity*. 2022. V. 14. Art. 518.
- Karunakaran R., Haag A.F., East A.K., Ramachandran V.K., Prell J., James E.K., Scocchi M., Ferguson G.P., Poole P.S. BacA is essential for bacteroid development in nodules of galeoid, but not phaseoloid legumes // *J. Bacteriol.* 2010. V. 192. P. 2920–2928.
- Koonin E.V., Wolf Y.I. Genomics of bacteria and archaea: the emerging dynamic view of the prokaryotic world // *Nucl. Acids Res.* 2008. V. 36. P. 6688–6719.
- Kumar N., Lad G., Giuntini E., Kaye M.E., Udomwong P., Shamsani N.J., Young J.P., Bailly X. Bacterial genospecies that are not ecologically coherent: population genomics of *Rhizobium leguminosarum* // *Open Biol.* 2015. V. 5. Art. 140133.
- Kuzmanović N., Fagorzi C., Mengoni A., Lassalle F., diCenzo G.C. Taxonomy of *Rhizobiaceae* revisited: proposal of a new framework for genus delimitation // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2022. V. 72. Art. 005243.
- Laranjo M., Alexandre A., Oliveira S. Legume growth-promoting rhizobia: an overview on the *Mesorhizobium* genus // *Microbiol. Res.* 2014. V. 169. P. 2–17.
- Liang J., Hoffrichter A., Brachmann A., Marín M. Complete genome of *Rhizobium leguminosarum* Norway, an ineffective *Lotus* microsymbiont // *Stand. Genomic Sci.* 2018. V. 13. Art. 36.
- López-Torrejón G., Jiménez-Vicente E., Buesa J.M., Hernandez J.A., Verma H.K., Rubio L.M. Expression of a functional oxygen-labile nitrogenase component in the mitochondrial matrix of aerobically grown yeast // *Nat. Commun.* 2016. V. 7. Art. 11426.
- MacLean A.M., Finan T.M., Sadowsky M.J. Genomes of the symbiotic nitrogen-fixing bacteria of legumes // *Plant Physiol.* 2007. V. 144. P. 615–622.
- Moreno E. Genome evolution within the alpha Proteobacteria: why do some bacteria not possess plasmids and others exhibit more than one different chromosome? // *FEMS Microbiol. Rev.* 1998. V. 22. P. 255–275.
- Mornico D., Miché L., Béna G., Nouwen N., Verméglia A., Vallenet D., Smith A.T., Giraud E., Médigue C., Moulain L. Comparative genomics of *Aeschynomene* symbionts: insights into the ecological lifestyle of nod-independent photosynthetic bradyrhizobia // *Genes*. 2012. V. 3. P. 35–61.
- Naito M., Pawlowska T.E. Defying Muller's ratchet: ancient heritable endobacteria escape extinction through retention of recombination and genome plasticity // *mBio*. 2016. V. 7. Art. e02057-15.
- Oda Y., Larimer F.W., Chain P.S., Malfatti S., Shin M.V., Vergez L.M., Hauser L., Land M.L., Braatsch S., Beaty J.T., Pelletier D.A., Schaefer A.L., Harwood C.S. Multiple genome sequences reveal adaptations of a phototrophic bacterium to sediment microenvironments // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008. V. 105. P. 18543–18548.
- Okazaki S., Noisangiam R., Okubo T., Kaneko T., Oshima K., Hattori M. Genome analysis of a novel *Bradyrhizobium*

- sp. DOA9 carrying a symbiotic plasmid // PLoS One. 2015. V. 10. Art. e0117392.
- Ormeño-Orrillo E., Martínez-Romero E. A genomotaxonomy view of the *Bradyrhizobium* genus // Front. Microbiol. 2019. V. 10. Art. 1334.
- Ormeño-Orrillo E., Servín-Garcidueñas L.E., Rogel M.A., González V., Peralta H., Mora J., Martínez-Romero J., Martínez-Romero E. Taxonomy of rhizobia and agrobacteria from the *Rhizobiaceae* family in light of genomics // Syst. Appl. Microbiol. 2015. V. 38. P. 287–291.
- Parent M.A., Goenka R., Murphy E., Levier K., Carreiro N., Golding B., Ferguson G., Roop R.M., Walker G.C., Baldwin C.L. *Brucella abortus* bacA mutant induces greater pro-inflammatory cytokines than the wild-type parent strain // Microbes Infect. 2007. V. 9. P. 55–62.
- Perry B.J., Sullivan J.T., Colombi E., Murphy R.J.T., Ramsay J.P., Ronson C.W. Symbiosis is-lands of Loteae-nodulating *Mesorhizobium* comprise three radiating lineages with concordant *nod* gene complements and nodulation host-range groupings // Microb. Genom. 2020. V. 6. Art. 81419.
- Provorov N.A. Genetic individuality and inter-species altruism: modelling of symbiogenesis using different types of symbiotic bacteria // Biol. Commun. 2021. V. 66. P. 65–71.
- Provorov N.A., Andronov E.E., Kimeklis A.K., Onishchuk O.P., Iolkina A.A., Karasev E.S. Microevolution, speciation and macroevolution in rhizobia: genomic mechanisms and selective patterns // Front. Plant Sci. 2022. V. 13. Art. 1026943.
- Provorov N.A., Tikhonovich I.A. The prospects for Symbiogenetics: emergence of superorganismal genomes and reconstruction of cellular evolution (mini-review) // Biol. Commun. 2023. V. 68. P. 49–55.
- Reeve W., O'Hara G., Chain P., Ardley J., Bräu L., Nandensena K., Tiwari R., Copeland A., Nolan M., Han C., Brettin T., Land M., Ovchinnikova G., Ivanova N., Mavrommatis K., KoMarkowitz V., Kyrpides N., Melino V., Denton M., Howieson J. Complete genome sequence of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* strain WSM1325, an effective microsymbiont of annual Mediterranean clovers // Stand. Genom. Sci. 2010. V. 2. P. 347–356.
- Rey F.E., Harwood C.S. FixK, a global regulator of microaerobic growth, controls photosynthesis in *Rhodospseudomonas palustris* // Mol. Microbiol. 2010. V. 75. P. 1007–1020.
- Riley A.B., Grillo M.A., Epstein B., Tiffin P., Katy D.H. Discordant population structure among *Rhizobium* divided genomes and their legume hosts // Mol. Ecol. 2022. V. 32. P. 2646–2659.
- Rome S., Fernandez M.P., Brunel B., Normand P., Cleyet-Marel J.C. *Sinorhizobium medicae* sp. nov. isolated from annual *Medicago* spp. // Int. J. Syst. Bacteriol. 1996. V. 46. P. 972–980.
- Saikia S.P., Jain V., Khetarpal S., Aravind S. Dinitrogen fixation activity of *Azospirillum brasilense* in maize (*Zea mays*) // Curr. Sci. 2007. V. 93. P. 1296–1300.
- Sameshima R., Isawa T., Sadowsky M.J., Hamada T., Kasai H., Shutsrirung A., Mitsui H., Minamisawa K. Phylogeny and distribution of extra-slow-growing *Bradyrhizobium japonicum* harboring high copy numbers of RS α , RS β and IS1631 // FEMS Microb. Ecol. 2003. V. 44. P. 191–202.
- Schmeisser C., Liesegang H., Kryciak D., Bakkou N., Le Quere A., Wollherr A., Heinemeyer I., Morgenstern B., Pommerening-Röser A., Flores M., Palacios R., Brenner S., Gottschalk G., Schmitz R.A., Broughton W.J., Perret X., Strittmatter A.W., Streit W.R. *Rhizobium* sp. strain NGR234 possesses a remarkable number of secretion systems // Appl. Environ. Microbiol. 2009. V. 75. P. 4035–4045.
- Schneiker S., Perlova O., Kaiser O., Gerth K., Alici A., Altmeyer M.O., Bartels D., Bekel T., Beyer S., Bode E., Bode H.B., Bolten C.J., Choudhuri J.V., Doss S., Elnakady Y.A., Frank B., Gaigalat L., Goesmann A., Groeger C., Gross F., Jelsbak L., Jelsbak L., Kalinowski J., Kogler C., Müller R. Complete genome sequence of the myxobacterium *Sorangium cellulosum* // Nat. Biotechnol. 2007. V. 27. P. 1281–1289.
- Schuldes J., Rodriguez-Orbegoso M., Schmeisser C., Krishnan H.B., Daniel R., Streit W.R. Complete genome sequence of the broad-host-range strain *Sinorhizobium fredii* USDA257 // J. Bacteriol. 2012. V. 194. P. 4483. <https://doi.org/10.1128/jb.00966-12>
- Sprent J.I. Nodulation in Legumes. London: Kew, Royal Botanic Gardens, 2001. 102 p.
- Tian C.F., Zhou Y.L., Zhang Y.M., Li Q.Q., Zhang Y.Z., Li D.F., Wang S., Wang J., Gilbert L.B., Li Y.L., Chen W.X. Comparative genomics of rhizobia nodulating soybeans suggests extensive recruitment of lineage-specific genes in adaptations // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2012. V. 109. P. 8629–8634.
- Tsyganova A.V., Seliverstova E.V., Onishchuk O.P., Kurchak O.N., Kimeklis A.K., Sazanova A.L., Kuznetsova I.G., Safronova V.I., Belimov A.A., Andronov E.E., Tsyganov V.E. Ultrastructural features of symbiotic nodules of relict legumes // Plants and microbes: the future of biotechnology / Ed. Tikhonovich I.A. Ufa: Acad. Initiative Center, 2018. P. 246.
- Vinardell J.M., Acosta-Jurado S., Zehner S., Göttfert M., Becker A., Baena I., Blom J., Crespo-Rivas J.C., Goesmann A., Jaenicke S., Krol E., McIntosh M., Margaret I., Pérez-Montaña F., Schneiker-Bekel S., Serranía J., Szczepanowski R., Buendía A.M., Lloret J., Bonilla I., Pühler A., Ruiz-Sainz J.E., Weidner S. The *Sinorhizobium fredii* HH103 genome: a comparative analysis with *S. fredii* strains differing in their symbiotic behavior with soybean // Mol. Plant-Microbe Interact. 2015. V. 28. P. 811–824.
- Wang E.T., Rogel M.A., García-de los Santos A., Martínez-Romero J., Cevallos M.A., Martínez-Romero E. *Rhizobium etli* bv. *mimosae*, a novel biovar isolated from *Mimosa affinis* // Int. J. Syst. Bacteriol. 1999. V. 49. P. 1479–1491.
- Wang S., Hao B., Li J., Gu H., Peng J., Xie F., Zhao X., Frech C., Chen N., Ma B., Li Y. Whole-genome

- sequencing of *Mesorhizobium huakuii* 7653R provides molecular insights into host specificity and symbiosis island dynamics // BMC Genomics. 2014. V. 15. Art. 440.
- Whittle M., Barreaux A.M.G., Bonsall M.B., Ponton F., English S. Insect-host control of obligate, intracellular symbiont density // Proc. Biol. Sci. 2021. V. 288. Art. 20211993.
- Wisniewski-Dyé F., Lozano L., Acosta-Cruz E., Borland S., Drogue B., Prigent-Combaret C., Rouy Z., Barbe V., Herrera A.M., González V., Mavingui P. Genome sequence of *Azospirillum brasilense* CBG497 and comparative analyses of *Azospirillum* core and accessory genomes provide insight into niche adaptation // Genes. 2012. V. 3. P. 576–602.
- Wongdee J., Boonkerd N., Teaumroong N., Tittabutr P., Giraud E. Regulation of nitrogen fixation in *Bradyrhizobium* sp. strain DOA9 involves two distinct NifA regulatory proteins that are functionally redundant during symbiosis but not during free-living growth // Front. Microbiol. 2018. V. 9. Art. 1644.
- Young J.P.W., Jorriin B., Moeskjær S., James E.K. *Rhizobium brockwellii* sp. nov., *Rhizobium johnstonii* sp. nov. and *Rhizobium beringeri* sp. nov., three genospecies within the *Rhizobium leguminosarum* species complex // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2023. V. 73. Art. 005979.

ОБЗОРЫ

Genomic Evolution of α -Proteobacteria in the Symbiotic SystemN. A. Provorov¹, E. E. Andronov^{1, *}¹All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, Saint-Petersburg, 196608, Russia

*e-mail: eeandr@gmail.ru

One of the major strategies for evolution of bacteria, accompanied by pronounced changes in their genetic organization, is the formation of symbioses with eukaryotes. They provide their micropartners with nutrients and ecological niches, in which bacteria implement trophic or protective functions used by their hosts. Acquisition of the ability for symbiosis is associated with formation of specialized *sym* gene systems, which is often accompanied by a modification in bacterial genome structure. In nodule bacteria (rhizobia) – N₂-fixing symbionts of leguminous plants, most of which belong to α -proteobacteria of order *Hyphomicrobiales*, the symbiogenic changes in genomes vary depending on the taxonomic position. In the evolutionarily primary rhizobia of family *Bradyrhizobiaceae*, which emerged directly from free-living N₂-fixers, transition to symbiosis is accompanied by a significant (1.5–2 times) increase in the genome size. However, their genomes retain a unitary structure: in the majority of *Bradyrhizobium* strains, more than 95% of genes are located in chromosomes. In the secondary rhizobia of family *Phyllobacteriaceae* (*Mesorhizobium*, *Phyllobacterium*), which emerged by transfer of *sym* genes into soil bacteria, various stages were revealed for formation of multipartite genome harboring a significant part of genes in extrachromosomal elements (ECE) – plasmids and chromids. The most pronounced multicomponent genome structure is found in the Rhizobiaceae family (*Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Neorhizobium*), in which the total size of ECEs containing *sym* genes can exceed the size of chromosome. In these bacteria, transfer from tropical to temperate ecosystems was accompanied by narrowing the host specificity, however, modification of genome structure was revealed only in *Sinorhizobium*, in which the proportion of ECE increases up to 51% of genome. Such genomes were also revealed in associative (rhizospheric, endophytic) N₂-fixers of genus *Azospirillum*, in which ECE comprise up to 60% of a genome. The irreversibly differentiated N₂-fixing cellular forms, bacteroids formed by rhizobia are included into the temporary organelles, symbiosomes considered as precursors of N₂-fixing organelles which are revealed in some protists and are probably may be constructed for the crop plants.

Keywords: nodule bacteria (rhizobia), N₂ fixation, evolution of symbiosis, unitary and multipartite genomes, plasmids and chromids, horizontal gene transfer, bacteroids and symbiosomes, cellular organelles, construction of N₂-fixing plants

УДК 57.083.18

METHANOSARCINA BAIKALICA SP. NOV., НОВАЯ МЕТАНОГЕННАЯ АРХЕЯ, ВЫДЕЛЕННАЯ ИЗ ПОВЕРХНОСТНЫХ ПРИДОННЫХ ОСАДКОВ ОЗЕРА БАЙКАЛ¹

© 2024 г. Т. Н. Жилина^{а, *}, А. Ю. Меркель^а, Т. В. Колганова^б, В. Э. Трубицын^{с, *},
В. А. Щербакова^с, Н. Е. Сузина^с, Н. В. Пименов^а

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

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

^сФИЦ Пушчинский научный центр биологических исследований РАН, Пушкино, 142290, Россия

*e-mail: lichoradkin43@gmail.com; Zhilina@mail.ru

Поступила в редакцию 05.05.2024 г.

После доработки 16.05.2024 г.

Принята к публикации 05.07.2024 г.

Из донных осадков пресноводного озера Байкал (Восточная Сибирь, Россия) выделена новая метано-бразующая архея штамм Z-7115^T. Морфологически штамм представляет неподвижные кокковидные клетки 0.5–3 мкм, собранные по 2–4 в пакеты и их небольшие агрегаты. В качестве энергетических субстратов для метаногенеза штамм использует метанол, моно-, ди-, триметиламин и ацетат. Клетки растут при температуре 15–35°C (оптимум 25°C), pH 6.3–7.5 (оптимум pH 7.3) и толерантны к концентрации NaCl < 0.1 М. Содержание Г + Ц геномной ДНК – 40.76 мол. %. По данным анализа гена 16S рРНК новый изолят принадлежит к роду *Methanosarcina*, имея с ближайшим к нему видом этого рода *M. sicilae* T4/M^T уровень сходства этого гена 98.51%. Среднее нуклеотидное сходство (ANI) между геномами штаммов Z-7115^T и *M. sicilae* T4/M^T составило 83.8%. Виртуальная оценка гибридизации геномов этих двух штаммов составила 23.3%. На основании данных филогенетического анализа и морфо-физиологических свойств предлагается отнести выделенный штамм Z-7115^T (=JCM 39438, =VKM B-3565) к новому виду *Methanosarcina baikalica* sp. nov.

Ключевые слова: *Methanosarcina baikalica* sp. nov., археи, метаногены, Байкал, осадки пресных озер

DOI: 10.31857/S0026365624060021

Озеро Байкал – самое древнее, глубокое и крупное по объему пресных вод озеро на Земле. Оно расположено в тектонически активной рифтовой зоне Восточной Сибири, что способствует созданию в нем своеобразных биотопов, развитие которых в значительной степени обусловлено наличием в тектонически ослабленных зонах дна озера метановых и нефтяных высачиваний разного генезиса. Вся многокилометровая толща донных отложений обитаема для микроорганизмов (Намсараев, Земская, 2000). Микробиологические исследования озера Байкал проводились с 20-х годов XX столетия, но в последние десятилетия с развитием молекулярных методов основное внимание было уделено изучению биоразнообразия разных групп микроорганизмов-деструкторов в составе микробных сообществ

донных осадков, в том числе анаэробных (Земская и соавт., 2021), а также оценке скоростей процессов деструкции органического вещества (Намсараев, Земская, 2000; Пименов и соавт., 2014). Было установлено, что из-за дефицита сульфата в воде озера Байкал процесс сульфатредукции, обнаруженный в осадках озера, имеет второстепенное значение (Пименов и соавт., 2014), а основным конечным продуктом микробного разложения органического вещества является метан (Намсараев и Земская, 2000; Дагурова и соавт., 2004).

В анаэробных сообществах донных отложений оз. Байкал, в том числе приуроченных к разгрузкам газо- и нефтенасыщенных флюидов, присутствие и разнообразие метаногенных архей было выявлено на основе иммунофлуоресцентного окрашивания

¹Дополнительные материалы размещены в электронном виде по DOI статьи: <https://doi.org/10.31857/S0026365624060021>

(Намсараев, Земская, 2000), получения накопительных культур с использованием основных субстратов метаногенеза (Павлова и соавт., 2014; Букин и соавт., 2018) и секвенирования генов 16S рРНК и *mcrA* (Шубенкова и соавт., 2005; Lomakina et al., 2014, 2018; Kadnikov et al., 2012; Черницына и соавт., 2016; Bukin et al., 2020). В донных осадках было выявлено присутствие метаногенов всех известных путей метаногенеза — гидрогенотрофного, ацетокластического, метилотрофного и водород-зависимого метилотрофного, с доминированием в глубоководных донных отложениях гидрогенотрофного метаногенеза (Земская и соавт., 2021). Примененные экологические и молекулярно-биологические методы для изучения скоростей процесса метаногенеза и разнообразия метаногенов донных осадков оз. Байкал не исключают выделения и изучения их чистых культур, необходимых как для прямого доказательства функционирования того или иного пути метаногенеза, осуществляемого метаногенными археями в анаэробном сообществе, так и для выявления их физиологических особенностей, связанных с местом обитания.

Ранее из зоны нефтепроявления центральной части Байкала были выделены первые представители метаногенных архей — использующий водород *Methanobacterium flexile* Z-7215 и *Methanosarcina* sp., штамм Z-7115^T (Жилина и соавт., 2017). В этой работе мы приводим полное филогенетическое и фенотипическое описание выделенного штамма *Methanosarcina* и на основании проведенных исследований предлагаем отнести его к новому виду — *Methanosarcina baikalica* sp. nov.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Источник выделения. Исходным материалом для накопления и выделения метаногенных архей служили пробы глубоководных донных осадков пресноводного оз. Байкал (Восточная Сибирь, Россия). Пробы были отобраны Н.В. Пименовым в Кукуйском каньоне с разных горизонтов над газогидратами (GR-1; GR-2) и зонами нефтепроявления (BC-6; GG-6 “черпак”) центральной части оз. Байкал (Горевой утес) с борта научного судна “Г.Ю. Верещагин” в июле 2013 г. Источником для выделения штамма Z-7115^T послужила проба BC-6 (E 105°23.4670, N 52°18.2656) восстановленного ила темно-серого цвета маслянистой консистенции с глубины 5–10 см от поверхности донных отложений.

Накопительные культуры и условия культивирования. Для выявления метаногенов в исследуемых пробах и получения накопительных культур была использована низкоминерализованная среда Пфеннига, которая содержала (г/л): NH_4Cl — 0.33; KH_2PO_4 — 0.33; $\text{MgCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ — 0.33; CaCl_2 —

$2\text{H}_2\text{O}$ — 0.33; KCl — 0.33; NaHCO_3 — 1; раствор микроэлементов — 1 мл/л; раствор витаминов по Волину — 10 мл/л; ацетат натрия — 2 мМ; цистеин-хлорид — 0.3; $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ — 0.4. После стерилизации среды ее pH составлял 6.8–7.0. В качестве субстратов были использованы следующие варианты: смесь H_2/CO_2 (80 : 20); ацетат 20 мМ; метанол 40 мМ + триметиламин (ТМА) 10 мМ; формиат натрия 40 мМ. Приготовление среды и культивирование проводили в строго анаэробных условиях в атмосфере N_2/CO_2 (80 : 20) в случае использования органических субстратов.

Для накопительных культур использовали герметически закрытые флаконы объемом 100 мл с 50 мл среды на органических субстратах и 20 мл среды с H_2/CO_2 в газовой фазе, в которые вносили 1 мл суспензии ила из исследуемых проб. Суспензия была приготовлена добавлением во флакон объемом 100 мл 5 г ила и 50 мл анаэробной минеральной среды со стеклянными шариками под током N_2/CO_2 (80 : 20).

Инкубацию проводили при 6 и 18°C. О развитии двух конкурирующих за водород и метильные соединения метаболических групп анаэробов — метаногенов и ацетогенов — судили по образованию метана или ацетата после 3-х и 12-ти месяцев инкубации.

Состав среды для выделения и пересевов исследуемого в работе штамма Z-7115^T в основном соответствовал составу среды для накопительных культур, но дополнительно содержал (г/л): дрожжевой экстракт Васто (“BD”) — 0.05 (вместо раствора витаминов); резазурин — 0.02; $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ — 0.5; метанол — 30 мМ.

Физиологические характеристики. Зависимости скорости метаногенеза от pH и температуры определяли на среде с метанолом как субстратом в пробирках Хангейта в двух повторностях. Зависимость роста микроорганизма от pH определяли при 25°C. Значения pH устанавливали добавлением растворов 6 н HCl или 6 н NaOH. Температурную зависимость роста штамма определяли в области от 5 до 40°C с шагом в 5°C.

Для определения спектра используемых субстратов для метаногенеза их вносили из стерильных концентрированных растворов в среду перед засе-вом в следующих конечных концентрациях (мМ): метанол — 30; ТМА, диметиламин (ДМА), монометиламин (ММА), ацетат, формиат, пируват, пропанол, изопропанол — 20; н-бутанол — 10; диметилсульфид (DMS) — 2. Использование молекулярного водорода тестировали в смеси H_2/CO_2 (80 : 20).

Аналитические методы. Метан, водород и ацетат определяли на газовом хроматографе Кристалл 5000.2 (“Хроматэк”, Россия). Разделение метана и водорода проводили на стеклянной колонке длиной 1 м, заполненной фазой CarboxenTM 1000 (“Supelco”, США) и присоединенной к детектору ДТП. Ацетат определяли на колонке,

заполненной фазой Carborpack C + 0.3% Carbowax 20M + 0.1% H₃PO₄ (“Supelco”).

Морфология. Живые клетки исследовали в фазово-контрастном микроскопе ZETOPAN (“Reichert”, Австрия). Для получения ультратонких срезов осадок клеток фиксировали в 1.5%-ом растворе глутаральдегида в 0.05 М какодилатном буфере (pH 7.2) при 4°C в течение 1 ч и дополнительно фиксировали в 1%-ом растворе OsO₄ в 0.05 М какодилатном буфере (pH 7.2) в течение 3 ч при 20°C. После обезвоживания в серии спиртов материал заключали в эпоксидную смолу Epon 812. Ультратонкие срезы просматривали в электронном микроскопе JEM-100B (“JEOL”, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ.

Выделение ДНК, секвенирование и анализ полногенома. Выделение ДНК проводили с помощью FastDNA Spin Kit (“MP Bio”), следуя протоколу производителя. Геном штамма Z-7115^T секвенировали, используя систему DNBSEQ-G400 (“MGI Tech”) прочтениями по 2 × 150 нуклеотидов. Сборку генома проводили с помощью ПО Unicycler 0.5.0 (Wick et al., 2017). Поиск генов и аннотацию проводили с использованием ПО PGAP (Tatusova et al., 2016). Полноту и контаминацию сборки оценивали с помощью ПО CheckM v1.2.2 (Parks et al., 2015).

Филогенетический анализ. Филогенетическую реконструкцию на основе 53 консервативных однокопийных маркерных генов проводили с помощью ПО GTDB-Tk 2.3.2 de_novo_wf (Chaumeil et al., 2022). Филогенетическую реконструкцию на основе гена 16S рРНК проводили с помощью ПО IQ-TREE 2.2.0.3 (Minh et al., 2020). Виртуальная оценка гибридизации геномов осуществлялась с помощью ПО GGDC 3.0 (Meier-Kolthoff et al., 2022) по алгоритму “identities / HSP length”. Для вычисления и построения матрицы распределения и тепловой карты bANI между геномами рода *Methanosarcina* использован набор инструментов GET_HOMOLOGUES v. 16092021 (Contreras-Moreira, Vinuesa, 2013).

Депонирование нуклеотидных последовательностей. Полногеномная последовательность штамма Z-7115^T депонирована в GenBank/EMBL под номером JAVKPK000000000. Нуклеотидная последовательность гена 16S рРНК штамма Z-7115^T депонирована в GenBank/EMBL под номером KY780617.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Накопительные культуры. При посеве проб на среды с вышеперечисленными субстратами метаногенеза и инкубации при температуре 6 или 18°C рост был детектирован только при 18°C. В накопительных культурах были выявлены метилотрофные и гидрогенотрофные метаногены и ацетогены. При 6°C после инкубации в течение года

роста микроорганизмов и метаногенеза не было выявлено. В пробах над газогидратами (GR-1, GR-2) водород использовался исключительно на ацетогенез. На метилированных соединениях рост был незначительным, и небольшое количество ацетата образовалось в обеих пробах, наряду с метаном в пробе GR-1. Ацетат и формиат либо не использовались (проба Gr-1), либо использовались крайне слабо (проба Gr-2), что не дало возможности получить устойчивые накопительные культуры метаногенов на этих субстратах. В пробах зоны нефтепроявления (BC-6, GG-6) метилированные соединения использовались исключительно метаногенами, но и на водороде шло их развитие, наряду с ацетогенами. Небольшое образование метана из ацетата было детектировано только в пробе BC-6. В пробе GG-6 формиат преимущественно использовался на метаногенез, а в пробе BC-6 на ацетогенез (рис. 1).

На метилированных соединениях метаногены были представлены кокковидными клетками — неподвижными и агрегированными в сарциноподобные пакеты, а на водороде и формиате — палочковидными формами или подвижными плоскими и угловатыми кокками. Ацетогены были представлены спорообразующими палочками разных морфотипов.

Для идентификации присутствующих метаногенных архей была проведена ПЦР-реакция с использованием универсальных архейных праймерных систем для амплификации генов 16S рРНК двух накопительных культур (BC-6; GG-6) на метилированных субстратах и одной (GG-6/2) на H₂/CO₂. В пробе BC-6 на метилированных субстратах была выявлена архея, имеющая 98.51% сходства с *Methanosarcina siciliae* T4/M^T и 98.4% с *Methanosarcina subterranea* HC-2^T. С водородом, как субстратом, были детектированы археи рода *Methanobacterium*, из них доминирующая была близка к *Methanobacterium flexile* с 99.9% сходства. Обе археи — *Methanosarcina* sp. Z-7115^T и гидрогенотрофная *M. flexile* Z-7215 были выделены в чистую культуру, и *Methanosarcina* sp. Z-7115^T была далее описана.

Выделение чистой культуры *Methanosarcina* sp. Рост метаносарцины в жидкой среде визуально определяли по появлению на дне флаконов желтоватого осадка, легко диспергируемого при перемешивании. На твердой среде с агаром (2%, “Bacto”) роста получено не было. Чистая культура метаносарцины, обозначенная как штамм Z-7115^T, была получена методом последовательных десятикратных разведений в жидкой среде с метанолом в присутствии смеси антибиотиков ампициллина и оксациллина (по 500 мг/л). Чистота культуры была подтверждена микроскопически, отсутствием роста на богатых органических средах с дрожжевым экстрактом и триптиказой (по 1 г/л) или глюкозой (3 г/л), а также результатом анализа гена 16S рРНК с использованием различных праймеров.

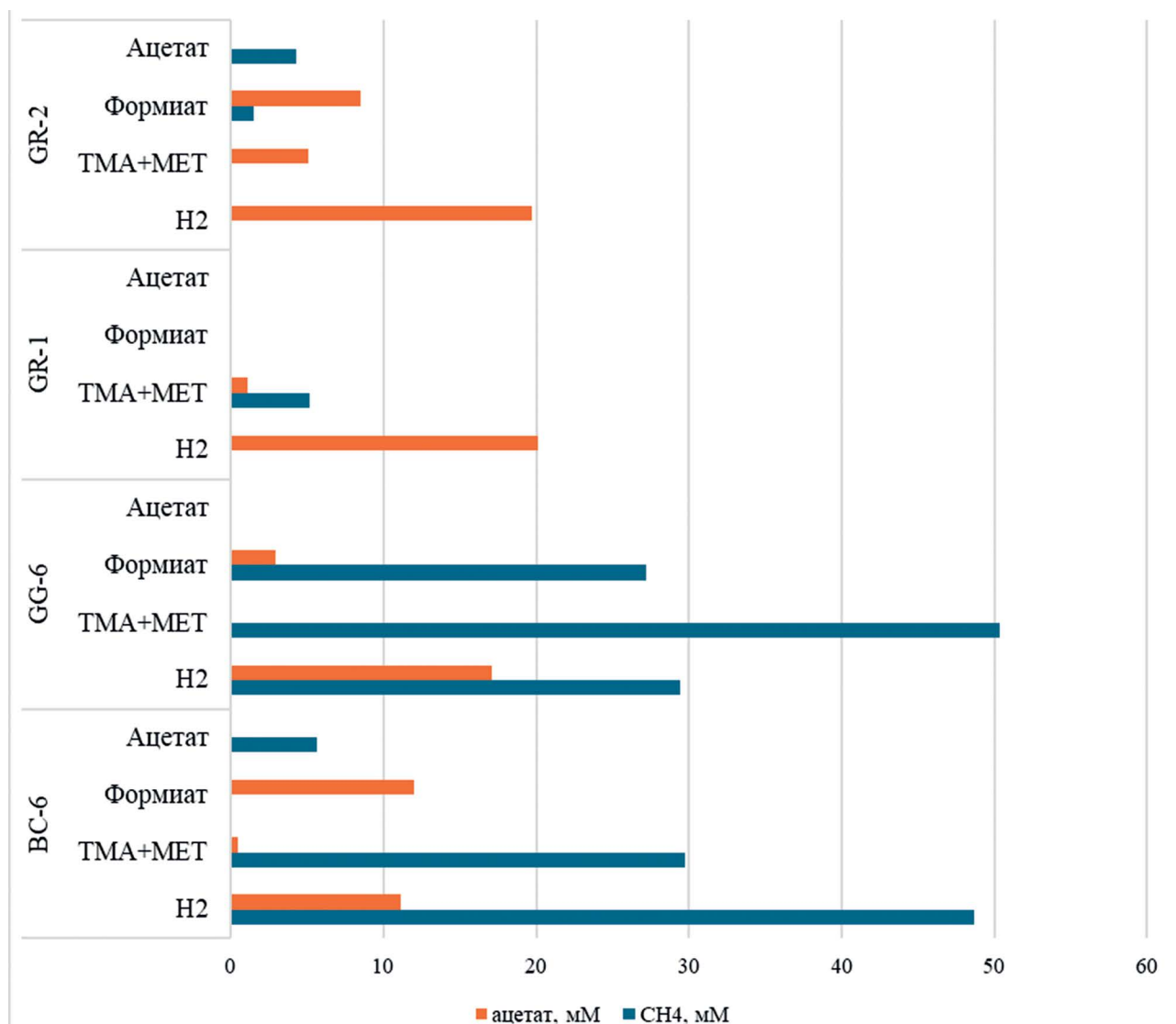


Рис. 1. Сравнение процессов метаногенеза (синие столбцы) и ацетогенеза (желтые столбцы) на разных субстратах метаногенеза в пробах озера Байкал над газогидратами (GR-1, GR-2) и зоны нефтепроявления (BC-6, GG-6).

Морфология. Клетки штамма Z-7115^T кокковидные, неподвижные, размером 0.2–3.0 мкм, объединены в сарциноподобные пакеты и их небольшие агрегаты-конгломераты размером 6–9 мкм, описанные ранее для метаносарцин (Жилина, 1976) как морфотип 2 (рис. 2а).

Варьирование в размере клеток определяется характерным способом деления метаносарцин – неравномерным и не всегда синхронным, с образованием клеточных сферических сегментов, видимых на срезах (Жилина, 1971) (рис. 2б). Они объединены капсулярным, не плотным для электронов слоем полисахаридной природы (рис. 2б). Цитоплазма содержит множество рибосом и нитей ДНК. В ней присутствуют скопления мелких хаотически ориентированных (иногда в виде цепочек)

гетерогенных электронно-плотных включений, подобных наблюдаемым ранее у *M. vacuolata* и определенных как гликоген (Жилина, 1971).

Рост и метаболические свойства. Штамм Z-7115^T – строгий анаэроб, развивающийся только в присутствии восстановителей, таких как сульфид или тиогликолат натрия. Штамм Z-7115^T использовал в качестве источника энергии только метанол, моно- ди-, триметиламины и ацетат. На ацетате рост слабый, медленный и не всегда воспроизводимый, хотя в случаях позитивного роста было установлено его потребление, сопровождающееся образованием метана. Рост и метаногенез отсутствовали на смеси H₂/CO₂ и формиате. Водород не потреблялся и в сочетании с метанолом, но и не угнетал рост и метаногенез на этом субстрате. Пируват,

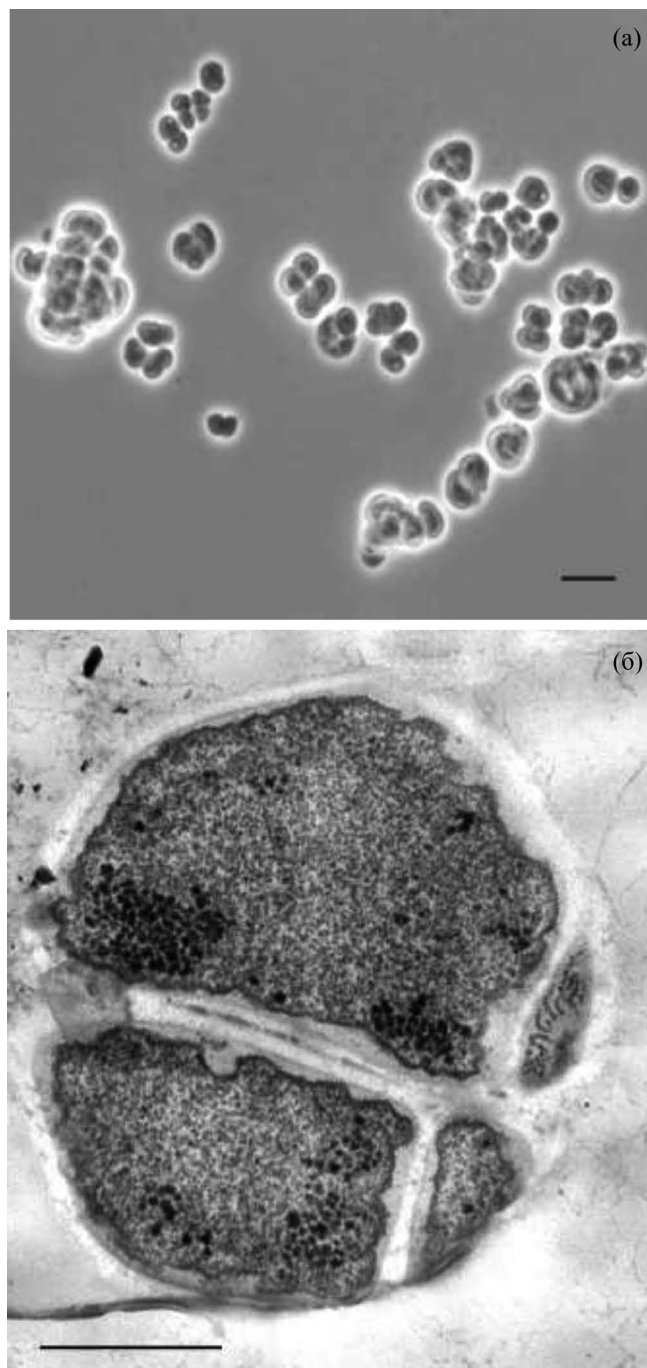


Рис. 2. Морфология клеток штамма Z-7115^T: а — световой микроскоп, фазовый контраст, масштабная метка — 5 мкм; б — электронный микроскоп, масштабная метка — 1 мкм.

н-пропанол, изопропанол, н-бутанол не использовались для роста и метаногенеза. Штамм Z-7115^T не нуждался в органических добавках. Небольшое количество дрожжевого экстракта в среде (50 мг/л) могло быть заменено раствором витаминов или

ацетатом натрия (2 мМ). Штамм Z-7115^T не нуждался в NaCl и был толерантен к его присутствию в среде без ухудшения роста до концентрации 0.05 М NaCl. Падение урожая клеток и метаногенеза в два раза наблюдалось при концентрации NaCl 0.1 М, в три раза — при 0.2 М NaCl по сравнению с контролем, где NaCl отсутствовал, и полным ингибированием при NaCl 0.3 М и выше. Штамм Z-7115^T — нейтрофил с областью роста при значениях pH 6.3–7.5 и оптимумом при pH 7.3 (дополнительные материалы, рис. S1a). Выше pH 7.7 и ниже pH 6.0 рост отсутствовал. По отношению к температуре культуру можно характеризовать как мезофильную, с областью развития при температуре 15–35°C и оптимумом роста при 25°C (рис. S1б).

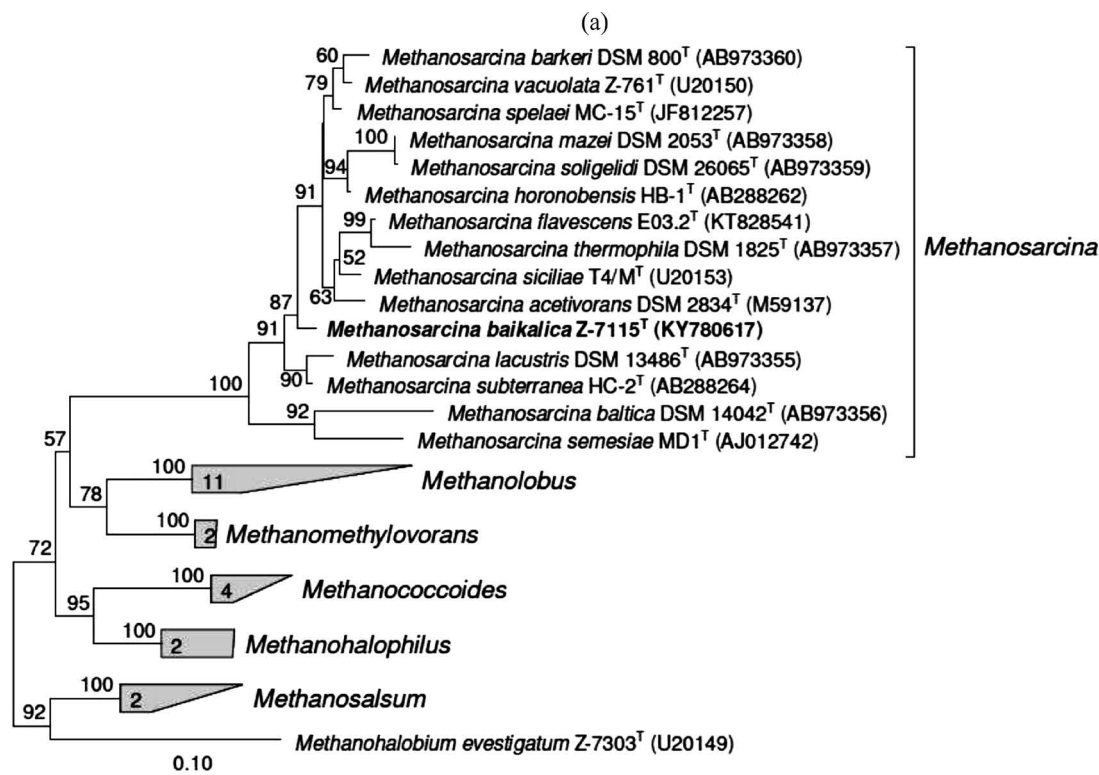
Филогенетическое положение. Филогенетический анализ полной последовательности гена 16S рРНК штамма Z-7115^T показал, что изолят представляет собой хорошо обособленную отдельную ветвь внутри рода *Methanosarcina* (рис. 3а), а его ближайшим валидно описанным родственником является штамм *M. sicilae* T4/M^T (Ni et al., 1994) с уровнем сходства по гену 16S рРНК 98.51%.

Виртуальная оценка гибридизации геномов этих двух штаммов составила 23.3%, а вероятность того, что гибридизация даст значение больше 70%, составила 0%. Филогенетический анализ на основе 53 консервативных однокопийных маркерных генов (Chaumeil et al., 2022) показал результат, схожий с результатом анализа гена 16S рРНК, но с более высокой статистической достоверностью (рис. 3б). ANI между геномами штамма Z-7115^T и типовыми штаммами видов рода *Methanosarcina* составило 83.2–85.7% (рис. 4).

Общие характеристики генома. Полученный геном штамма Z-7115^T состоял из 157 контигов с общей длиной 3742969 п.о., N50 = 48212. Полнота сборки составила 99.84%; уровень вероятной контаминации сборки — 0.327%. Содержание Г + Ц геномной ДНК составило 40.76%. Геном содержал 3302 генов, из которых 3151 кодирующий белок ген и 63 кодирующих РНК генов, 59 из которых кодируют тРНК. В геноме содержатся по одной копии генов 16S и 23S рРНК.

Гены, связанные с метаногенезом. В геноме штамма Z-7115^T присутствовали все основные гены белков гидрогенотрофного/метилотрофного метаногенного пути (формилметанофуран дегидрогеназа, *fwd*; формилметанофуран-тетрагидрометанооптерин N-формилтрансфераза, *flr*; метенилтетрагидрометанооптерин циклогидролаза, *mch*; метилентетрагидрометанооптерин дегидрогеназа, *mtd*; 5,10-метилентетрагидрометанооптерин редуктаза, *mer*; коэнзим F420-гидрогеназа, *frh*; тетрагидрометанооптерин S-метилтрансфераза, *mtr*; метил-коэнзим M редуктаза, *mcr*; гетеродисульфид редуктаза, *hdr*(ABCDE)).

В геноме отсутствуют гены F₄₂₀-восстанавливающей формилатдегидрогеназы *fdh*, что не позволяет штамму использовать в качестве субстрата



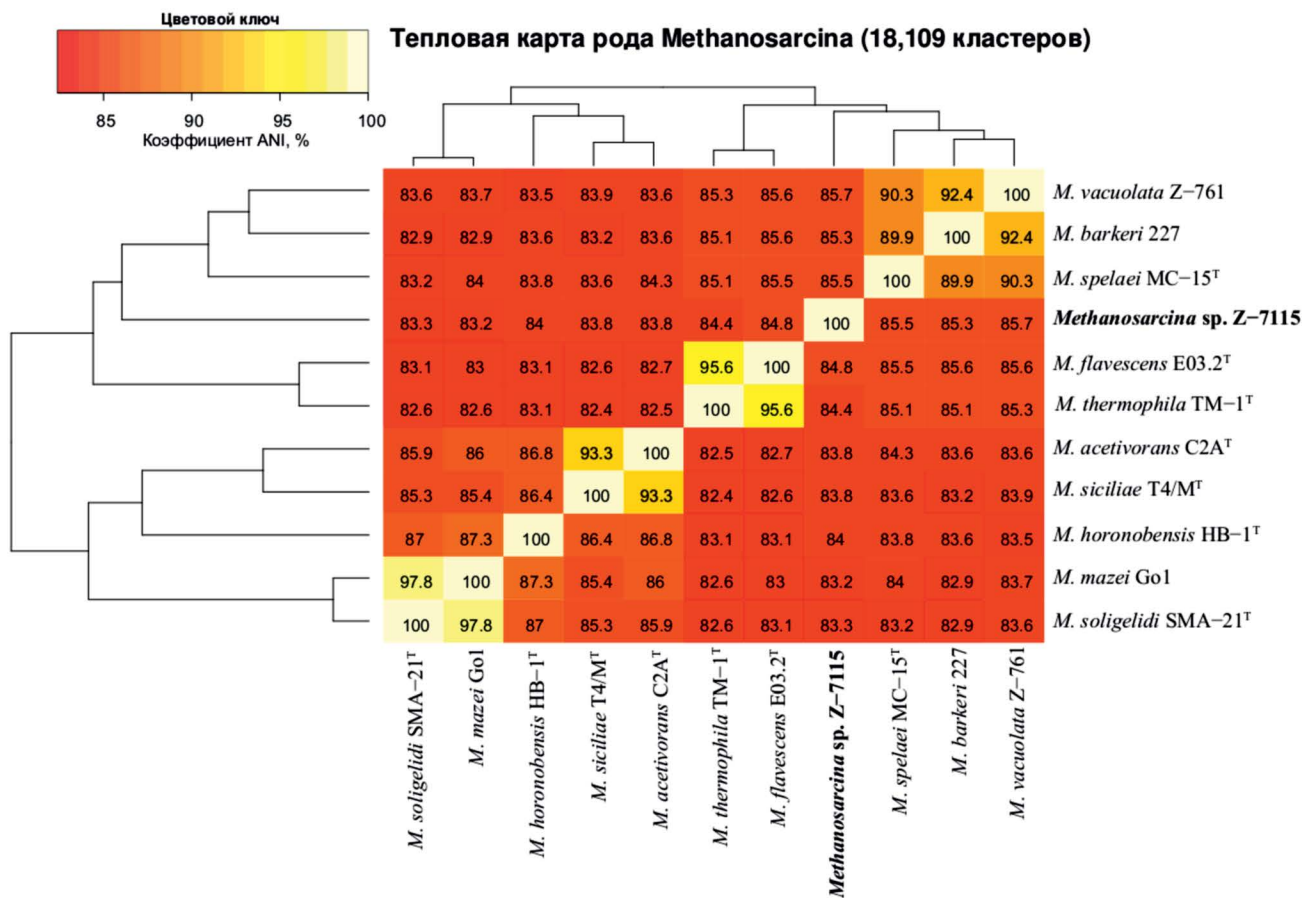


Рис. 4. Упорядоченная тепловая карта, построенная по матрице распределения коэффициентов ANI между геномами рода *Methanosarcina*.

формат. Присутствуют все гены для использования в качестве субстрата метанола (mtaABC), но часть генов для роста на моно-, ди- и триметиламинe либо имеет нарушенную рамку считывания (mttB, mtbB), либо отсутствует (mtmB). У штамма Z-7115^T обнаружены все гены комплекса ACDS (cdhA₁A₂A₃B₁B₂C₁C₂E₁E₂) для восстановительного пути Вуда–Льюнгдала и гены ферментов активации ацетата, универсальные для рода *Methanosarcina*: ацетаткиназы (ackA) и фосфоацетилтрансферазы (pta). Отсутствуют гены ацетил-КоА синтетазы (АДФ-зависимой, EC 6.2.1.1.3) acdA и acdB, что в целом необычно, поскольку этот фермент присутствует у большей части исследованных типовых штаммов рода, как использующих ацетат в качестве катаболического субстрата (*M. acetivorans* C2A^T (GCA_000007345.1), *M. horonobensis* HB-1^T (GCA_000970285.1), *M. thermophila* TM-1^T (GCA_000969885.1), *M. vacuolata* Z-761^T (GCA_000969905.1), *M. soligelidi* SMA-21^T (GCA_000744315.1), *M. flavescens* E03.2^T (GCA_001304615.2)), так и неспособных его использовать (*M. sicilae* T4/M^T (GCA_000970085.1)).

Ген acdA отсутствовал также у штамма *M. spelaei* MC-15^T (GCA_002287235.1), который мог использовать ацетат для роста. У штамма Z-7115^T обнаружены основные дегидрогеназы, связанные с генерацией трансмембранного потенциала и использованием молекулярного водорода у цитохром-содержащих метаногенов: frhABDГ, vhtACDГ, fpoABCDEFGHIJK, hdrDE, а также echABCDEF, которую в некоторых работах связывают со способностью метаносарцин к потреблению ацетата как единственного субстрата (Kulkarni et al., 2018). Дегидрогеназы rnfABCDEFГ и ионный транспортер mtrABCDEFGHIГ, необходимые для роста на ацетате, в частности, *M. acetivorans* C2A^T (Ferry, 2020), у исследуемого штамма не обнаружены.

ОБСУЖДЕНИЕ

Штамм Z-7115^T по типу обмена является строго анаэробным хемоорганотрофом. Диапазон предпочтительно используемых им субстратов

характеризует его, прежде всего, как метилотрофного метаногена. Лучшим из метилированных субстратов для роста является метанол, и все гены, необходимые для его использования, у организма присутствуют. Несмотря на то, что часть генов для роста на моно-, ди- и триметиламинах имеет нарушенную рамку считывания (*mttB*, *mtbB*), либо отсутствует (*mtmB*), штамм Z-7115^T стабильно растет на всех трех метиламинах с предпочтением ТМА.

Организм не способен к использованию формата, и в геноме отсутствуют соответствующие этой возможности гены. В геноме обнаружены основные дегидрогеназы, связанные с генерацией трансмембранного потенциала и использованием молекулярного водорода. Таким образом, штамм теоретически способен использовать водород как донор электронов, однако есть неопределенные причины, мешающие ему реализовать эту возможность, и с CO₂, как акцептором, и при метилредуцирующем метаногенезе на метаноле. Несмотря на имеющиеся гены белков восстановительного пути Вуда–Льюнгдала и гены ферментов активации ацетата, универсальные для рода *Methanosarcina*, ацетат используется штаммом Z-7115^T крайне слабо, и рост на нем нестабилен. Потенциально имеющиеся в геноме возможности для осуществления в анаэробном сообществе метаногенеза тремя известными путями, по сути, ограничены для исследуемого штамма метилотрофным путем.

Наиболее вероятным для него субстратом в анаэробном сообществе донных отложений оз. Байкал может быть метанол, образуемый в пресноводных водоемах при разложении пектина и лигноцеллюлозы клеточных стенок водорослей. Метиламины — специфичные субстраты метаногенеза для гиперсоленых мест обитания. Их появление обусловлено деградацией осмопротектора бетаина, и специализированные на использовании исключительно метиламинов экстремально галофильные метаногены были открыты вместе с ацетогеном, способным разлагать бетаин с образованием метиламинов (Zhilina, Zavarzin, 1990). В оз. Байкал детектированное присутствие метиламинов в верхних слоях осадков зон разгрузок, откуда был выделен штамм, объясняется их миграцией из глубинных осадков, что согласуется с изотопным составом растворенного биогенного метана, характерным для его образования преимущественно восстановлением метильных групп (Земская и соавт., 2021). Помимо способных к использованию метилированных соединений представителей семейства *Methanosarcinaceae* в оз. Байкал выявлены метил-редуцирующие археи порядка *Methanomassiliicoccales*, семейств *Methanomethyliaceae* и *Methanofastidiosaceae*, что дополнительно подтверждает возможность образования биогенного метана в донных осадках путем использования метилированных соединений, в том

числе метиламинов (Земская и соавт., 2021). Выделение нами чистой культуры метаногенной археи, использующей метанол и метиламины для метаногенеза, микробиологически обосновывает сделанные ранее предположения.

По своим физиологическим характеристикам (зависимости роста от pH, температуры, минерализации среды) штамм Z-7115^T соответствует занимаемой им экологической нише (таблица). Воды оз. Байкал классифицируются как гидрокарбонатные и отличаются низкой минерализацией. Общая минерализация поровых вод донных отложений выше водной толщи и достигает 120–400 мг/л (Намсараев, Земская, 2000). Штамм Z-7115^T может развиваться при такой низкой минерализации, поскольку способен расти на среде Пфеннига, разведенной в 2–3 раза, с общей минерализацией 500 мг/л. Не нуждаясь в хлориде натрия, новый изолят толерантен лишь к его крайне низким концентрациям <0.1 М, с полным ингибированием роста и метаногенеза уже при 0.3 М NaCl. Диапазон pH для роста штамма лежит в границах, установленных для донных отложений оз. Байкал (pH 6.7–8.0) (Намсараев, Земская, 2000). Температурный оптимум роста выделенного штамма (25°C) значительно ниже характерного для большинства мезофильных штаммов и сопоставим с таковым у психротолерантного вида *Methanosarcina lacustris* (Simankova et al., 2001). В тоже время новый изолят не рос при 10°C и ниже, и его нельзя отнести к психротолерантным видам.

Приведенное в таблице фенотипическое сравнение штамма Z-7115^T с филогенетически близкими видами рода *Methanosarcina* показывает, что толерантность к NaCl можно считать важным отличительным признаком в этой группе метаносарцин. Штамм Z-7115^T наиболее чувствителен к повышению солености и требует низкой минерализации среды, что отличает его от других пресноводных метаносарцин и филогенетически близким с ним морских видов — *M. sicilae* (Ni, Boone, 1991; Ni et al., 1994), *M. subterranea* (Shimizu et al., 2015) и *M. acetivorans* (Sowers et al., 1984; Ni et al., 1994). Близкие к штамму виды различаются также размерами и степенью агрегации клеток, составом клеточных стенок, что определяется действием на них детергентов, границами и оптимумом температуры роста, а также способностью использовать водород и/или ацетат (таблица). Штамм Z-7115^T способен использовать ацетат, имеет, как и другие пресноводные метаносарцины, полисахаридную, а не белковую клеточную стенку, иные границы и оптимум температуры роста, иное место обитания, что отличает его от близкородственного вида *M. sicilae* T4/M^T.

На основании совокупности морфофизиологических свойств и филогенетических данных можно утверждать, что выделенный метаноген представляет новый вид рода *Methanosarcina*, для которого

Таблица. Сравнительные признаки нового изолята с типовыми штаммами ближайших видов рода *Methanosarcina*

Свойства	Z-7115 [†]	<i>M. siciliae</i> T4/M ^{1,2}	<i>M. subterranea</i> HC-2 ³	<i>M. acetivorans</i> C2A ⁴	<i>M. vacuolata</i> Z-761 ^{5,6}	<i>M. lacustris</i> ZS ⁷	<i>M. barkeri</i> MS ^{8,6}
Клетки, мкм	0.2–3	0.5–3.0	0.9–1.4	1.9	1–2	1.5–3.5	1.5–2.0
Рост в жидкой среде	Морфотип 2	Морфотип 3, 2	Морфотип 3, 2	Морфотип 3 и цисты	Морфотип 2	Морфотип 1	Морфотип 2
Окраска по Грамму	Нд	–	–	–	+	+	+
Лизис 0.01% (w/v) SDS	–	+	+	+	–	Нд	–
Температура роста (°C): диапазон оптимум	15–35 25	25–45 40	10–40 35	15–42 35–40	18–45 37–40	1–35 25	20–45 40–42
pH роста: диапазон оптимум	6.5–7.5 7.3	6.0–7.7 6.5–6.8	5.9–7.4 6.6–6.8	5.0–7.0 6.0	6.0–8.0 7.5	4.5–8.5 7.0	5.0–8.0 6.0–7.0
Влияние NaCl (M): диапазон оптимум	0–0.2 0–<0.1	0–>1.7 0.4–0.6	0–0.6 0.1–0.2	0.1–1.0 0.1–0.6	0.1–0.5 0.1–0.125	Нд Нд	0.1–0.8 0.1–0.125
Субстраты: H ₂ /CO ₂ Метанол Триметиламин Диметиламин Монометиламин Диметилсульфид Ацетат	– + + + + – +/-	– + + Нд Нд + –	– + + + + + –	– + + + + + +	– + + Нд + Нд +	– + + + + – –	– + + Нд Нд Нд +
Стимуляция роста дрожжевым экстрактом	–	+	+	–	+	+	+
Г + Ц, мол. %	40.76 (геном)	41.5 (Т _m)	41.5 (геном)	41 ± 1 (Т _m)	51 ± 0.5 (Т _m)	43.4 (Т _m)	38.8–43.5
Источник выделения	Пресные донные осадки оз. Байкал, Россия	Морские осадки	Из глубоких недр в формации диатомовых сланцев Хоронобе, Япония	Морские осадки Scripps Canjon, La Jolla, California	Сброженный ил метангенк	Пресные озерные осадки, Швейцария	Сточные воды

Обозначения: “–” – нет роста; “+/-” – слабый, нестабильный; Нд – нет данных; Т_m – температура плавления. Морфотипы (Жилина, 1976): морфотип 1 – большие не разделяемые агрегаты псевдосарцин – зерна (псевдопаренхима); морфотип 2 – кокковидные клетки по 2–4 в пакетах (псевдосарцина) и небольшие агрегаты их; морфотип 3 – отдельные кокковидные клетки. Ссылки на источники: 1 – Ni & Boone, 1991; 2 – Ni et al., 1994; 3 – Shimizu et al., 2015; 4 – Sowers et al., 1984; 5 – Zhilina & Zavarzin, 1987; 6 – Maestrojuan & Boone, 1991; 7 – Simankova et al., 2001; 8 – Bryant & Boone, 1987.

мы предлагаем название *Methanosarcina baikalica* sp. nov. с типовым штаммом Z-7115^T.

Описание *Methanosarcina baikalica* sp. nov.

Methanosarcina baikalica (bai' ka.li.ca. L.n. baikalicum, the Baikal lake. N.L. fem.adj. по названию озера Байкал, из которого организм был выделен).

Клетки неподвижные, кокковидные, диаметром 0.2–3.0 мкм, в парах, тетрадах или небольших сарциноподобных агрегатах. В жидкой среде растет в виде легко диспергируемого желтоватого осадка. Строгий анаэроб. Субстратами для роста и метаногенеза служат метанол, моно-, ди-, триметиламины и ацетат. Не использует смеси $H_2 + CO_2$, $H_2 +$ метанол, формиат, пируват, н-пропанол, изопропанол, н-бутанол и диметилсульфид. Ацетат (0.2 г/л) требуется для роста в качестве источника углерода. Дрожжевой экстракт не стимулирует рост и может быть заменен раствором витаминов. Мезофил с областью роста при 15–35°C (оптимум 25°C); нейтрофил, растет при значениях pH 6.3–7.5 (оптимум pH 7.3). Развитие возможно в среде с низкой минерализацией (Σ 500 мг/л). Не нуждается в NaCl и толерантен к низким его концентрациям <0.1 М с ингибированием роста и метаногенеза при 0.3 М NaCl. Содержание Г + Ц в геноме типового штамма 40.76 мол. %.

Место обитания – донные осадки пресноводных водоемов. Типовой штамм Z-7115^T (=JCM 39438, =VKM B-3565) выделен из поверхностного слоя донных осадков озера Байкал (Восточная Сибирь, Россия).

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках госзадания № 122041100029-2 ФИЦ Биотехнологии РАН.

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

Букин С.В., Павлова О.Н., Калмычков Г.В., Иванов В.Г., Погодаева Т.В., Галачьянц Ю.П., Букин Ю.С.,

Хабуев А.В., Земская Т.И. Субстратная специфичность метаногенных сообществ из донных отложений оз. Байкал, ассоциированных с разгрузками углеводородных газов // Микробиология. 2018. Т. 87. С. 409–420.

Bukin S.V., Pavlova O.N., Kalmychikov G.V., Ivanov V.G., Pogodaeva T.V., Galachyants Yu.P., Bukin Yu.S., Khabuyev A.V., Zemskaya T.I. Substrate specificity of methanogenic communities from Lake Baikal bottom sediments associated with hydrocarbon gas discharge // Microbiology (Moscow). 2018. V. 87. P. 549–558.

<https://doi.org/10.1134/S0026261718040045>

Дагурова О.П., Намсараев Б.Б., Козырева Л.П., Земская Т.И., Дулов Л.Е. Бактериальные процессы цикла метана в донных осадках озера Байкал // Микробиология. 2004. Т. 74. С. 248–257.

Dagurova O.P., Namsaraev B.B., Kozyreva L.P., Zemskaya T.I., Dulov L.E. Bacterial processes of the methane cycle in bottom sediments of Lake Baikal // Microbiology (Moscow). 2004. V. 73. P. 202–210.

<https://doi.org/10.1023/B:MIC1.0000023990.71983.c1>

Жилина Т.Н. Тонкое строение метаносарцины // Микробиология. 1971. Т. 50. С. 674–679.

Жилина Т.Н. Биотипы метаносарцины // Микробиология. 1976. Т. 55. С. 481–489.

Жилина Т.Н., Груздев Д.С., Колганова Т.В., Пименов Н.В. Метаногены и ацетогены в анаэробных илах над газогидратами и в зонах нефтепроявления озера Байкал // Материалы 1-го Российского микробиологического конгресса / Под ред. Решетиловой Т.А. М.: ООО “ИД “Вода: химия и экология”, 2017. С. 44–45.

Земская Т.И., Букин С.В., Ломакина А.В., Павлова О.Н. Микроорганизмы донных отложений Байкала – самого глубокого и древнего озера мира // Микробиология. 2021. Т. 90. С. 286–303.

Zemskaya T.I., Bukin S.V., Lomakina A.V., Pavlova O.N. Microorganisms of bottom sediments of Lake Baikal – the deepest and oldest lake in the world // Microbiology (Moscow). 2021. V. 90. P. 298–313.

<https://doi.org/10.1134/S002626172103014>

Ломакина А.В., Погодаева Т.В., Морозов И.В., Земская Т.И. Микробные сообщества зоны разгрузки газонефте содержащих флюидов ультрапресного озера Байкал // Микробиология. 2014. Т. 83. С. 355–365.

Lomakina A.V., Pogodaeva T.V., Morozov I.V., Zemskaya T.I. Microbial communities of the discharge zone of oil- and gas-bearing fluids in low-mineral Lake Baikal // Microbiology (Moscow). 2014. Vol. 83, No. 3, pp. 355–365.

<https://doi.org/10.1134/S0026261714030126>

Намсараев Б.Б., Земская Т.И. Микробиологические процессы круговорота углерода в донных осадках озера Байкал // Новосибирск: Гео, 2000. 160 с.

Павлова О.Н., Букин С.В., Ломакина А.В., Калмычков Г.В., Иванов В.Г., Морозов И.В., Погодаева Т.В.,

- Пименов Н.В., Земская Т.И. Образование углеводородных газов микробным сообществом донных осадков оз. Байкал // Микробиология. 2014. Т. 83. С. 694–702.
- Pavlova O.N., Bukin S.V., Lomakina A.V., Kalmychkov G.V., Ivanov V.G., Morozov I.V., Pogodaeva T.V., Pimenov N.V., Zemskaya T.I. Production of gaseous hydrocarbons by microbial communities of Lake Baikal bottom sediments // Microbiology (Moscow). 2015. V. 83. P. 694–702.
<https://doi.org/10.1134/S0026261714060137>
- Пименов Н.В., Захарова Е.Е., Брюханов А.Л., Корнеева В.А., Кузнецов Б.Б., Турова Т.П., Погодаева Т.В., Калмычков Г.В., Земская Т.И. Активность и структура сообщества сульфатредуцирующих бактерий в осадках южной котловины оз. Байкал // Микробиология. 2014. Т. 83. С. 180–190.
- Pimenov N.V., Zakharova E.E., Bryukhanov A.L., Korneeva V.A., Kuznetsov B.B., Turova T.P., Pogodaeva T.V., Kalmychkov G.V., Zemskaya T.I. Activity and structure of the sulfate-reducing bacterial community in the sediments of the southern part of Lake Baikal // Microbiology (Moscow). 2014. V. 83. P. 47–55.
<https://doi.org/10.1134/S0026261714020167>
- Черницына С.М., Мамаева Е.В., Ломакина А.В., Погодаева Т.В., Галачянц Ю.П., Букин С.В., Пименов Н.В., Хлыстов О.М., Земская Т.И. Филогенетическое разнообразие микробных сообществ в донных отложениях Посольской банки, оз. Байкал // Микробиология. 2016. Т. 85. С. 652–662.
- Chernitsyna S.M., Mamaeva E.V., Lomakina A.V., Pogodaeva T.V., Galachyants Yu.P., Bukin S.V., Pimenov N.V., Khlystov O.M., Zemskaya T.I. Phylogenetic diversity of microbial communities of the Posolsk Bank bottom sediments, Lake Baikal // Microbiology (Moscow). 2016. V. 85. P. 672–680.
<https://doi.org/10.1134/S0026261716060060>
- Шубенкова О.В., Земская Т.И., Черницына С.М., Хлыстов О.М., Трибой Т.И. Первые результаты исследования филогенетического разнообразия микроорганизмов осадков Южного Байкала в районе приповерхностного залегания гидратов метана // Микробиология. 2005. Т. 74. С. 370–377.
- Shubenkova O.V., Zemskaya T.I., Chernitsyna S.M., Khlystov O.M., Tribay T.I. The first results of an investigation into the phylogenetic diversity of microorganisms in Southern Baikal sediments in the region of subsurface discharge of methane hydrates // Microbiology (Moscow). 2005. V. 74. P. 314–320.
<https://doi.org/10.1007/s11021-005-0069-9>
- Benson D.A., Cavanaugh M., Clark K., Karsch-Mizrachi I., Lipman D.J., Ostell J., Sayers E.W. GenBank // Nucl. Acids Res. 2017. V. 45. (D1). P. D37–D42.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkw1070>
- Bryant M.P., Boone D.R. Emended description of strain MST (DSM 800T), the type strain of *Methanosarcina barkeri* // Int. J. Syst. Bacteriol. 1987. V. 37. P. 169–170.
- Bukin S.V., Pavlova O.N., Kalmychkov G.V., Ivanov V.G., Zemskaya T.I. Methylo-trophic methanogens in bottom sediments of lake Baikal // Limnol. Freshwater Biol. 2020. V. 4. С. 973–975.
- Chaumeil P.A., Mussig A.J., Hugenholtz P., Parks D.H. GTDB-Tk v2: memory friendly classification with the genome taxonomy database // Bioinformatics (Oxford, England). 2022. V. 38. P. 5315–5316.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btac672>
- Contreras-Moreira B., Vinuesa P. GET_HOMOLOGUES, a versatile software package for scalable and robust microbial pangenome analysis // Appl. Environ. Microbiol. 2013. V. 79. P. 7696–7701.
<https://doi.org/10.1128/AEM.02411-13>
- Ferry J.G. *Methanosarcina acetivorans*: a model for mechanistic understanding of acetoclastic and reverse methanogenesis // Front. Microbiol. 2020. V. 11. Art. 1806.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01806>
- Kadnikov V.V., Mardanov A., Beletsky A.V., Shubenkova O.V., Pogodaeva T.N., Zemskaya T.I., Ravin N.V., Skryabin K.G. Microbial community structure in methane hydrate-bearing sediments of freshwater Lake Baikal // FEMS Microbiol. Ecol. 2012. V. 79. P. 348–358.
- Kulkarni G., Mand T.D., Metcalf W.W. Energy conservation via hydrogen cycling in the methanogenic archaeon *Methanosarcina barkeri* // Mbio. 2018. V. 9 (4).
<https://doi.org/10.1128/mbio.01256-18>
- Lomakina A.V., Mamaeva E.V., Galachyants Y.P. et al. Diversity of *Archaea* in bottom sediments of the discharge areas with oil- and gas-bearing fluids in Lake Baikal // Geomicrobiol. J. 2018. V. 35. P. 50–63.
<https://doi.org/10.1080/01490451.2017.1315195>
- Maestrojuan G.M., Boone D.R. Characterization of *Methanosarcina barkeri* MS^T and 227, *Methanosarcina mazei* S-6^T, and *Methanosarcina vacuolata* Z-761^T // Int. J. Syst. Bacteriol. 1991. V. 41. P. 267–274.
- Meier-Kolthoff J.P., Sardà Carbasse J., Peinado-Olarte R.L., Göker M. TYGS and LPSN: a database tandem for fast and reliable genome-based classification and nomenclature of prokaryotes // Nucleic Acid Res. 2022. V. 50. P. D801–D807.
- Minh B.Q., Schmidt H.A., Chernomor O., Schrempf D., Woodhams M.D., von Haeseler A., Lanfear R. 2020. IQ-TREE2: New models and efficient methods for phylogenetic inference in the genomic era // Mol. Biol. Evol. V. 37. P. 1530–1534.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msaa015>
- Ni S., Boone D.R. Isolation and characterization of a dimethylsulfide-degrading methanogen, *Methanobacillus* *siciliae* H1350, from an oil well, characterization of *M. siciliae* T4/MT, endemendation of *M. siciliae* // Int. J. Syst. Bacteriol. 1991. V. 41. Art. 410416.
- Ni S., Woese C.R., Aldrich H.C., Boone D.R. Transfer of *Methanobacillus siciliae* to the genus *Methanosarcina*, naming it *Methanosarcina siciliae*, and emendation of the genus *Methanosarcina* // Int. J. Syst. Bacteriol. 1994. V. 44. P. 357–359.
<https://doi.org/10.1099/00207713-44-2-357>

- 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.
<https://doi.org/10.1101/gr.186072.114>
- Shimizu S., Ueno A., Naganuma T., Kaneko K. *Methanosarcina subterranea* sp. nov., a methanogenic archaeon isolated from a deep subsurface diatomaceous shale formation // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2015. V. 65. P. 1167–1171.
- Simankova M.V., Parshina S.N., Tourova T.P., Kolganova T.V., Zehnder A.J.B., Nozhevnikova A.N. *Methanosarcina lacustris* sp. nov., a new psychrotolerant methanogenic archaeon from anoxic lake sediments // *Syst. Appl. Microbiol.* 2001. V. 24. P. 362–367.
- Sowers K.R., Baron S.F., Ferry J.G. *Methanosarcina acetivorans* sp. nov., an acetotrophic methane-producing bacterium isolated from marine sediments // *Appl. Environ. Microbiol.* 1984. V. 47. P. 971–978.
- 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.
- Wick R.R., Judd L.M., Gorrie C.L., Holt K.E. Unicycler: resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads // *PLoS Comput. Biol.* 2017. V. 13. Art. e1005595.
<https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005595>
- Zhilina T.N., Zavarzin G.A. *Methanosarcina vacuolata* sp. nov., a vacuolated methanosarcina // *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1987. V. 37. P. 281–283.
- Zhilina T.N., Zavarzin G.A. Extremely halophilic, methylotrophic, anaerobic bacteria // *FEMS Microbiol. Lett.* 1990. V. 87. P. 315–322.

EXPERIMENTAL ARTICLES

Methanosarcina baikalica sp. nov., a New Methanogenic Archaea Isolated from Surface Bottom Sediments of Lake Baikal

T. N. Zhilina^{1, *}, A. Yu. Merkel¹, T. V. Kolganova², V. E. Trubitsyn^{3, *},
V. A. Shcherbakova³, N. E. Suzina³, N. V. Pimenov¹

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

²Skryabin Institute of Bioengineering, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071, Russia

³Pushchino Research Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences, Pushchino, 142290, Russia

*e-mail: lichoradkin43@gmail.com; Zhilinat@mail.ru

A new methane-forming archaeon strain Z-7115^T was isolated from the bottom sediments of the freshwater Lake Baikal (Eastern Siberia, Russia). Morphologically, the strain is represented by non-motile coccoid cells 0.5–3 µm in size, collected in packets of 2–4 and their small aggregates. The strain uses methanol, mono-, di-, trimethylamine and acetate as energy substrates for methanogenesis. The cells grow at a temperature of 15–35°C (optimum 25°C), pH 6.3–7.5 (optimum pH 7.3) and are tolerant to NaCl concentrations < 0.1 M. The G + C content of genomic DNA is 40.76 mol. %. According to the 16S rRNA gene analysis, the new isolate belongs to the genus *Methanosarcina*, having a similarity level of 98.51% with the closest species of this genus *M. sicilae* T4/M^T. The average nucleotide similarity (ANI) between the genomes of strains Z-7115^T and *M. sicilae* T4/M^T was 83.8%. The virtual assessment of the hybridization of the genomes of these two strains was 23.3%. Based on the data of phylogenetic analysis and morpho-physiological properties, it is proposed to classify the isolated strain Z-7115^T (=JCM 39438, =VKM B-3565) as a new species *Methanosarcina baikalica* sp. nov.

Keywords: *Methanosarcina baikalica* sp. nov., archaea, methanogens, Baikal, sediments of fresh lakes

УДК 579.222

АНАЛИЗ ГЕНОМА И РЕКОНСТРУКЦИЯ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ПУТЕЙ ДЕГРАДАЦИИ АМИНОКИСЛОТ И БЕТАИНА У ГАЛОАЛКАЛОФИЛЬНОЙ БАКТЕРИИ *ANOXYNATRUM SIBIRICUM*¹

© 2024 г. Е. Н. Деткова^а, Ю. В. Болтянская^а, Н. В. Пименов^а,
А. В. Марданов^б, В. В. Кевбрин^{а, *}

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

^бИнститут биоинженерии им. К.Г. Скрябина, ФИЦ “Фундаментальные основы биотехнологии” РАН,
Москва, 119071, Россия

*e-mail: kevbryn@inmi.ru

Поступила в редакцию 27.05.2024 г.

После доработки 20.06.2024 г.

Принята к публикации 24.06.2024 г.

Проведен анализ генома галоалкалофильного анаэробного микроорганизма *Anoxynatronum sibiricum* Z-7981^Т, выделенного ранее из содового озера Нижнее Белое (Республика Бурятия, Россия). Выявлена способность организма к использованию бетаина в качестве акцептора электронов в реакции Стикланда. Внесение бетаина в среду не только оказывало стимулирующее действие на рост на аминокислотах, использующихся *A. sibiricum* индивидуально, но и позволило выявить дополнительные аминокислоты, рост на которых не был возможен без акцептора. На основании геномных характеристик и экспериментальных ростовых данных предложены метаболические схемы разложения аминокислот в присутствии и в отсутствие бетаина. Схемы для треонина, глутамата и лизина при их совместном использовании с бетаином составлены впервые. Для всех используемых аминокислот определены качественный и количественный состав продуктов обмена и получены стехиометрические соотношения субстрат/продукт. Составлены балансовые уравнения для выявленных вариантов реакции Стикланда, включая ранее не описанные в литературе.

Ключевые слова: бетаин, аминокислоты, реакция Стикланда, галоалкалофилы, содовые озера, бета-инредуктазный комплекс

DOI: 10.31857/S0026365624060038

Содовые озера широко распространены в природе и характеризуются тем, что, наряду с хлоридом, содержат в качестве доминирующего аниона карбонат, что приводит к повышенным значениям pH среды в таких экосистемах. Несмотря на экстремальные условия окружающей среды (высокие концентрации солей и pH), микрофлора в содовых водоемах весьма разнообразна и содержит представителей основных трофических групп микроорганизмов (Заварзин и соавт., 1999; Grant, Jones, 2016). Трофическая структура галоалкалофильного микробного сообщества содовых озер системно изучается в лаборатории реликтовых микробных сообществ ИНМИ РАН с начала 1990-х годов (Zhilina, Zavarzin, 1994),

причем наибольшее внимание уделяется анаэробным микроорганизмам-деструкторам. Деструкция органического вещества является важнейшим процессом, определяющим существование биологического круговорота элементов в природе и обеспечивающим устойчивость биоценозов. При отмирании живых организмов высвобождается большое количество разнообразных органических соединений, которые в дальнейшем могут служить субстратами для роста микроорганизмов. Среди таких соединений в содовых водоемах можно отдельно отметить бетаин — вещество, являющееся широко распространенным осморегулятором у ряда галофильных бактерий и архей. В зависимости от солености среды, концентрация

¹Дополнительные материалы размещены в электронном виде по DOI статьи: <https://doi.org/10.31857/S0026365624060038>

бетаина может достигать 16% от сухого веса клетки (Sorokin et al., 2008).

Исходя из литературных данных, а также из результатов собственных экспериментальных исследований, удалось установить, что в анаэробных условиях деградация бетаина происходит тремя различными способами:

1) Путем брожения. Среди микроорганизмов, осуществляющих этот процесс можно выделить экстремального галофила *Acetohalobium arabaticum* (Жилина, Заварзин, 1990), а также галоалкалофильные штаммы рода *Natroniella* spp. (Sorokin, 2021).

2) Использованием в качестве субстрата и донора электронов в окислительно-восстановительной реакции. К такой реакции способны, например, морские виды *Desulfobacterium* (Heijthuisen, Hansen, 1989). Среди галоалкалофилов известна архея *Halalkaliarchaeum* spp., которая осуществляет окисление бетаина с сульфатом как акцептором электронов (Sorokin, 2021).

3) Использованием в качестве акцептора электронов в паре с различными донорами: аминокислотами (реакция Стикланда) и олигопептидами, а также с формиатом, водородом и другими ключевыми для микробного сообщества метаболитами. Роль бетаина как акцептора электронов была впервые продемонстрирована для негалофильного анаэроба *Clostridium sporogenes* (Naumann et al., 1983), а позднее для галофилов *Haloanaerobacter salinarum* (Mouné et al., 1999) и *Halanaerobacter lacunarius* (ранее *Halobacteroides lacunaris*) (La Cono et al., 2015). В условиях высокой карбонатной щелочности реакция Стикланда с бетаином впервые была показана для галоалкалофила *Halonatronomonas betaini*, выделенного из содового озера Танатар III (Деткова и соавт., 2022). В качестве доноров электронов бактерия использовала олигопептиды — дрожжевой экстракт, триптон, пептон, сойтон, а также аминокислоты — лейцин, аланин, валин, изолейцин и серин. Данный процесс имеет значение с точки зрения не только понимания путей деградации бетаина, но и способов утилизации аминокислот в алкалофильном микробном сообществе, где свободные аминокислоты могут поступать в микроокружение в результате деструкции белков после отмирания и распада живых клеток.

Целью данной работы было оценить способность галоалкалофильных анаэробных микроорганизмов из коллекции лаборатории реликтовых микробных сообществ к деградации бетаина в реакции Стикланда в условиях повышенных солености и карбонатной щелочности, секвенировать и проанализировать геном выбранного модельного организма *Anoxynatronum sibiricum* и выявить возможные метаболические пути разложения аминокислот как в присутствии бетаина, так и без него, исходя из геномных характеристик и экспериментальных данных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Организмы и культивирование. Объектами предварительного исследования служили 23 галоалкалофильных микроорганизма из коллекции лаборатории. Для выращивания культур, отобранных по их способности к использованию бетаина (*Anoxynatronum sibiricum* Z-7981^T, *Alkaliphilus peptidifermentans* Z-7036^T и *Natronincola peptidivorans* Z-7031^T), использовали минеральную среду следующего состава (г/л): KH_2PO_4 — 0.2; $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ — 0.1; NH_4Cl — 0.5; KCl — 0.2; NaCl — 5.0; Na_2CO_3 — 3.0; NaHCO_3 — 12.0; $\text{Na}_2\text{S} \times 9\text{H}_2\text{O}$ — 0.5; дрожжевой экстракт — 0.2; раствор микроэлементов — 1 мл/л; раствор витаминов — 10 мл/л, pH 9.5. Раствор микроэлементов содержал (мг/л): $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 556; $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ — 119; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \times \text{NiSO}_4 \times 6\text{H}_2\text{O}$ — 197; $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ — 99; $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 144; H_3BO_3 — 31; $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \times 12\text{H}_2\text{O}$ — 237; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ — 24; $\text{Na}_2\text{WO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ — 33; Na_2SeO_3 — 17; $\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ — 17. Раствор витаминов имел следующий состав (мг/л): биотин — 10; фолиевая кислота — 10; тиоктовая кислота — 10; пиридоксин гидрохлорид — 10; тиамин гидрохлорид — 20; рибофлавин — 20; никотиновая кислота — 10; Ca-D-пантотенат — 20; цианокобаламин — 25; p-аминобензойная кислота — 10. Организмы культивировали строго анаэробно при 35–37°C в пробирках Хангейта или флаконах объемом 120 и 500 мл.

Концентрации дрожжевого экстракта и аминокислот в предварительных опытах составляли 1.5 г/л. Раствор бетаина, предварительно нейтрализованный 12M NaOH, вносили в среды до конечной концентрации 3 г/л. В опытах по изучению катаболизма аминокислот в отсутствие и в присутствии бетаина их концентрации задавали, исходя из теоретических стехиометрических соотношений, указанных в работе (Деткова и соавт., 2022).

Засев осуществляли из расчета 1–3% (об./об.). В зависимости от используемой аминокислоты культуры инкубировали 1–1.5 мес. до максимального истощения субстрата и накопления продуктов метаболизма. Каждый эксперимент проводили не менее чем в трех независимых повторностях, полученные результаты усредняли.

Определение роста. За ростом культур следили по потреблению субстрата или, в случае опытов в пробирках Хангейта, по увеличению оптической плотности при 600 нм на спектрофотометре Unico 2100 (США).

Аналитические методы. Аминокислоты, бетаин, летучие жирные кислоты и аммоний определяли, как описано ранее (Деткова и соавт., 2022). Формиат и нелетучие органические кислоты определяли методом ВЭЖХ на хроматографе Стайер (“Аквилон”, Россия). Разделение проводили на колонке Aminex HPL-87 (“BioRad”, США) при 50°C

с 5 мМ Н₂SO₄ в качестве элюента. Колонка была подсоединена к спектрофотометрическому детектору с установленной длиной волны 210 нм.

Секвенирование и аннотация генома. Геномную ДНК из свежей культуры выделяли с помощью наборов DNeasy PowerSoil kit (“Qiagen”, Германия) по протоколам фирмы-производителя. Для приготовления геномной библиотеки использовали наборы NEBNext Ultra II DNA Library Prep Kit (“New England Biolabs”, США). Полученную библиотеку секвенировали на MiSeq (“Illumina”, США) с использованием наборов MiSeq Regent Kit V3 (600 циклов). Всего было получено 2.2 млн. парных чтений, суммарная длина которых составляла 1.3 млрд. нуклеотидов. Парные пересекающиеся чтения были объединены с помощью программы FLASH v. 1.2.11 (Magoč, Salzberg, 2011), затем чтения с низким качеством были удалены с помощью программы Sickle v. 1.33 (<https://github.com/najoshi/sickle>). Сборку последовательностей осуществляли программой SPAdes v 3.15.4 (Vasilinets et al., 2015) с параметрами для изолятов. Поиск генов и аннотацию проводили с помощью вебсервиса NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP) (Tatusova et al., 2016). Поиск ферментов проводили с использованием вебсервиса BRENDA (Chang et al., 2021).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выбор объектов исследования

В результате скрининга коллекции не было обнаружено микроорганизмов, использующих бетаин в качестве единственного субстрата для роста и получения энергии (дополнительные материалы, табл. S1). Однако было выявлено три организма различных таксономических групп, рост которых на дрожжевом экстракте стимулировался бетаином. Количественные характеристики их роста в присутствии и в отсутствие бетаина показаны в табл. 1.

У всех этих штаммов среди продуктов был обнаружен триметиламин (данные не показаны), что доказывает использование бетаина как акцептора электронов. В качестве объекта дальнейших

исследований был выбран *A. sibiricum* Z-7981^T, выделенный из содового озера Нижнее Белое (Республика Бурятия, Россия) (Garnova et al., 2003), стимуляция для которого оказалась максимальной. Этот организм оказался единственным из трех вышеупомянутых, для которого до настоящего времени не было проведено полногеномного секвенирования.

Поскольку дрожжевой экстракт – сложный субстрат, включающий в себя смесь пептидов и индивидуальных аминокислот, и работа с ним не позволяет составлять балансовые уравнения и метаболические схемы, а также проводить некоторые аналитические определения, ключевыми модельными субстратами для наших целей стали аминокислоты. Так как необходимо различать сбраживание аминокислот и их окисление в паре с внешним акцептором электронов, необходимо было оценить способность к росту *A. sibiricum* на индивидуальных аминокислотах.

Основные характеристики генома *Anoxynatronum sibiricum* Z-7981^T

С использованием платформы фирмы Illumina мы получили драфт-геном *Anoxynatronum sibiricum* Z-7981^T. Микроорганизм имеет геном размером около 3.9 млн. нуклеотидных оснований. Содержание ГЦ пар в ДНК составляет 48.47%. В геноме содержится 10 оперонов рибосомных генов (16S–23S–5S), 3500 белок-кодирующих генов и 50 генов, кодирующих тРНК. Ближайшим доступным в GTDB геномом к рассматриваемому оказался геном *Anoxynatronum* sp. (*Clostridiaceae* bacterium, GCA_011390155.1) со средней идентичностью полного генома на нуклеотидном уровне (ANI) 91.73%, что соответствует отдельному виду. Геном *A. sibiricum* Z-7981^T депонирован в базе GenBank под номером JVCITM000000000.

Катаболическое использование аминокислот без бетаина

Ранее было показано, что *A. sibiricum* способен сбраживать глутамат и цистеин (Garnova et al., 2003). При тестировании всех 20 протеиногенных

Таблица 1. Влияние бетаина на рост культур

Микроорганизм	ΔОП ₆₀₀		Коэффициент стимуляции роста
	Дрожжевой экстракт	Дрожжевой экстракт + бетаин	
<i>Anoxynatronum sibiricum</i> Z-7981 ^T	0.07	0.23	3.3
<i>Alkaliphilus peptidifermentans</i> Z-7036 ^T	0.06	0.19	3.2
<i>Natronincola peptidivorans</i> Z-7031 ^T	0.05	0.15	3.0

Примечание. Символ Δ означает разницу между начальным и конечным значениями ОП. Коэффициент стимуляции роста рассчитан как частное от деления ΔОП в присутствии и в отсутствие бетаина.

Таблица 2. Сбраживание индивидуальных аминокислот *A. sibiricum* Z-7981^T

АК	Формиат	Ацетат	Пропионат	Бутират	ΔАК	Баланс по углероду, %	ΔNH ₃	ΔNH ₃ /ΔАК
Серин	3.9	9.7	0	0.8	9.7	92	11.7	1.2
Треонин	1.5	17.8	0.3	0	10.0	94	11.2	1.1
Аспартат	0.8	4.9	4.6	0	9.1	67	8.9	1.0
Глутамат	5.0	1.9	5.0	2.1	9.1	70	8.7	1.0
Лизин	1.6	9.2	0.4	3.4	6.5	89	12.2	1.9
Аргинин	1.7	11.8	2.0	1.5	7.6	81	14.5	1.9

Примечание. АК — аминокислота. Все концентрации даны в мМ.

аминокислот нами дополнительно был обнаружен рост на серине, треонине, лизине, аргинине и аспартате. Конечные продукты распада аминокислот, а также балансы по углероду показаны в табл. 2.

Основными продуктами сбраживания аминокислот являлись короткоцепочечные летучие жирные кислоты и аммиак. Рост на треонине сопровождался появлением в культуральной жидкости неидентифицированной нелетучей органической кислоты, отличной от лактата или сукцината. Состав летучих жирных кислот варьировал в зависимости от аминокислоты. В большинстве случаев основным продуктом был ацетат, в меньших количествах образовывались формиат, пропионат и бутират. Исключением оказался глутамат, при использовании которого преобладали формиат и пропионат. Кроме того, он оказался единственной аминокислотой, при сбраживании которой концентрация формиата превышала концентрацию ацетата. Заниженное значение углеродного баланса при росте на аспартате и глутамате было связано с образованием неучтенной углекислоты, количественное измерение которой невозможно в карбонатных средах. Баланс по углероду подтвержден тремя независимыми экспериментами.

Количества образовавшегося аммиака были пропорциональны количествам потребленной аминокислоты и соответствовали правилу — из одной аминокислоты образуется одна молекула аммиака. Таким образом, из одной молекулы серина, треонина, аспартата и глутамата образуется по одной молекуле аммиака, а из лизина — две. Исключением оказался аргинин, в случае которого из четырех атомов азота, входящих в состав молекулы, образовывалось только две молекулы аммиака. По-видимому, оставшиеся два атома азота переходят в мочевину, что согласуется с предполагаемой схемой катаболизма аргинина, построенной на основании геномных данных (см. ниже). Количественная оценка мочевины в карбонатных средах с высокими значениями рН невозможна из-за ее спонтанного образования из аммиака и углекислоты, поэтому из-за подвижного

химического равновесия разделить биогенную и абиогенную мочевину оказалось невозможным.

Нейтральные аминокислоты — треонин и серин. В геноме *A. sibiricum* Z-7981^T обнаружены гены, кодирующие ферменты всех четырех известных путей метаболизма треонина. Они включают треониндегидрогеназу, треонинальдолазу, треонинаммонийлиазу и треонинкиназу (рис. 1а).

Катаболическое разложение треонина у штамма инициируют треониндегидрогеназа и треонинальдолаза с образованием в качестве промежуточных продуктов, соответственно, только глицина (треониндегидрогеназный путь) или глицина в сочетании с ацетальдегидом (треонинальдолазный путь). Глицин трансформируется глицингидроксиметилтрансферазой в серин, который далее преобразуется через пируват в ацетат по известной схеме. Помимо классической L-серинаммонийлиазы, геном содержит также D-серинаммонийлиазу. При внесении D,L-серина функционируют оба вида лиазы, что подтверждается полным исчезновением аминокислоты-рацемата в конце роста. Превращение пирувата в ацетил-КоА является энергодающим и осуществляется посредством пируватсинтазы (*por*), сопряженной через ферредоксин с Rnf-комплексом, кодируемым опероном *rnfCDGEAB*. Геном штамма содержит Rnf-кластер второго типа, характерный для видов *Clostridium*, *Alkaliphilus*, *Thermanaerobacter* и *Ruminococcus* (Biegel et al., 2011). Похожим способом, возможно, протекает и окисление ацетальдегида до ацетата, так как геном содержит пять копий гена *aor*, кодирующего альдегид ферредоксин оксидоредуктазу.

Помимо ацетата среди продуктов брожения серина и треонина был обнаружен формиат, тогда как водород отсутствовал (табл. 2). Образование формиата вызывается, по-видимому, обратным действием формиатдегидрогеназы (ФДГ). В геноме штамма найдены гены, кодирующие три вида ФДГ — ферредоксин-связанную ФДГ (*fdhF2*, ЕС 1.17.1.11), ФДГ-О (*fdh-O*, ЕС 1.17.1.9) и F420-связанную ФДГ (ЕС 1.17.98.3). Подобно Rnf-комплексу, ферредоксин-связанная ФДГ относится к группе ферментных комплексов

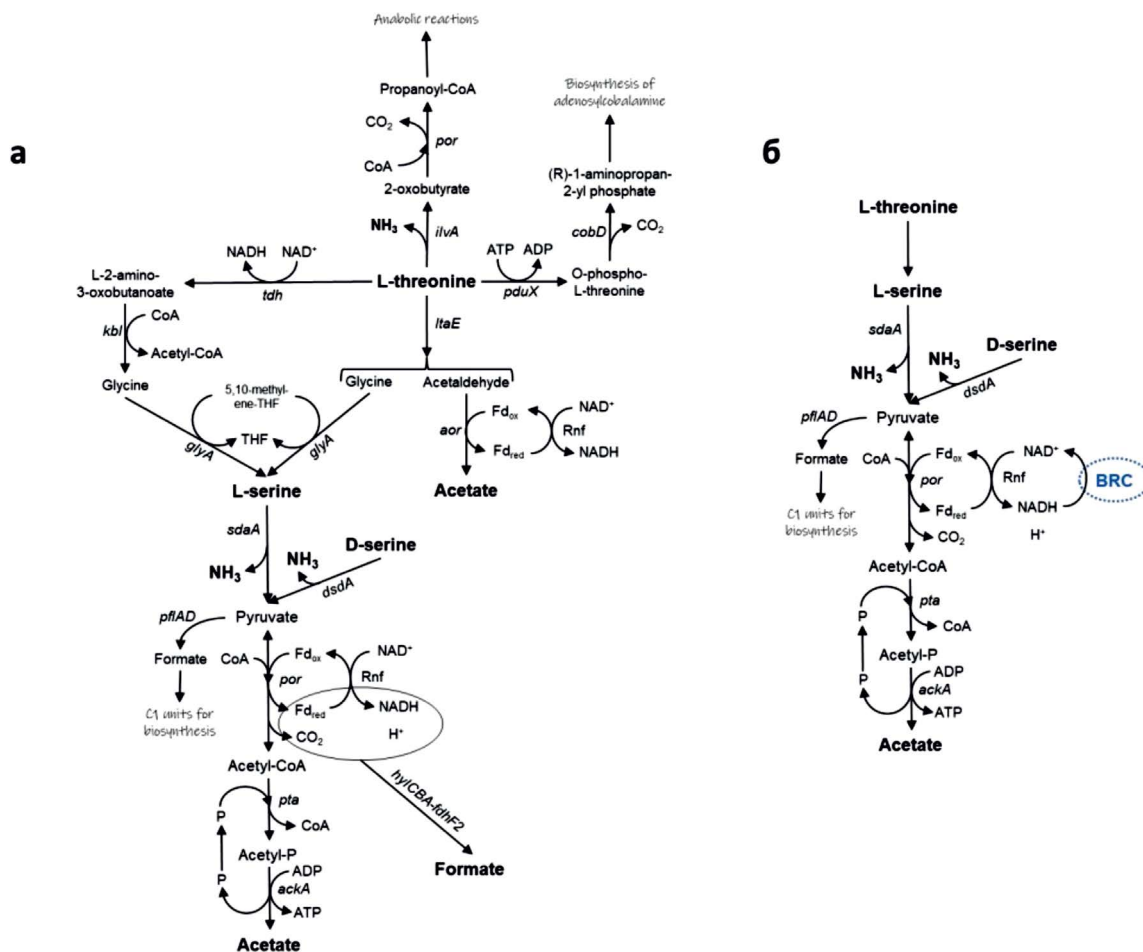


Рис. 1. Предлагаемая метаболическая схема разложения треонина и серина *A. sibiricum* Z-7981^T: а — без бетаина; б — с бетаином. BRC — бетаинредуктазный комплекс. Субстраты и продукты выделены жирным шрифтом. Обозначения генов и соответствующих ферментов даны в табл. S2 (дополнительные материалы).

с бифуркацией электронов, и, конкретно для ФДГ комплекса, отнесение его к этой группе было впервые показано у *Gottschalkia (Clostridium) acidurici*, где он кодируется генным кластером *hylCBA-fdhF2* (Wang et al., 2013). Из генов гидрогеназного комплекса, часто работающих в связке с ФДГ, в геноме имеется лишь *hndB*, возможно, поэтому *A. sibiricum* не образует водород. ФДГ-О работает как одна из ФДГ у *E. coli* и других аэробных и факультативно анаэробных организмов, где она отвечает за утилизацию формиата как донора электронов при анаэробном росте (Wang, Gunsalus, 2003). Сведения об участии ФДГ-О в образовании формиата в литературе отсутствуют. Анализ генома *A. sibiricum* не выявил ген, кодирующий коэнзим F420, однако на основе драфт-генома нельзя сделать однозначный вывод об отсутствии F420 и невозможности функционирования F420-связанной ФДГ.

A. sibiricum при росте на треонине образует только следовые количества пропионата (табл. 2).

При поиске генов, ответственных за превращение пропионил-КоА в пропионат (треонинаммонийлиазный путь), удалось выявить только ген *pct*, кодирующий пропионат-КоА-трансферазу (ЕС 2.8.3.1). Это характерный фермент акрилатного пути образования пропионата у некоторых пропионатобразующих клостридий (Hetzel et al., 2003), однако других ферментов этого пути у *A. sibiricum* не обнаружено. Значимые количества пропионата штамм Z-7981^T образует только при росте на аргинине, аспартате и глутамате (табл. 2). Механизмы такой регуляции неизвестны. Мы предполагаем, что при росте на треонине образующийся пропионил-КоА, возможно, идет на анаболические цели. Роль треонинкиназы, кодируемой *pduX*, также анаболическая. Показано ее участие в биосинтезе аденозилкобаламина (Fan, Bobik, 2008).

Кислые аминокислоты — глутамат и аспартат. Для разложения глутамата *A. sibiricum* Z-7981^T имеет

оба типа глутаматдегидрогеназ – NAD^+ - и NADP^+ -зависимые (рис. 2а).

Окисление образующегося 2-оксоглутарата до сукцинил-КоА, подобно пирувату, также сопряжено с Rnf-комплексом, но в данном случае найден четырехсубъединичный ферментный комплекс 2-оксоислоты ферредоксин оксидоредуктазы, кодируемый опероном *korDABC*. В геноме *A. sibiricum* Z-7981^T он представлен тремя копиями. Из пяти известных путей разложения глутамата (Buckel, 2001) геном штамма Z-7981^T имеет гены только 4-аминобутиратного пути, проходящего через сукцинил-КоА, сукцинат полуальдегид и далее до кротонил-КоА (рис. 2а), хотя и без вовлечения самого 4-аминобутирата. Все гены этого пути в геноме собраны в один кластер. Трансформация кротонил-КоА в бутирил-КоА осуществляется тетрамерным комплексом бутирил-КоА-дегидрогеназы с ФАД (EtfAB-Bcd), также сопряженной с Rnf-комплексом (Buckel, 2021). Совместная работа двух комплексов позволяет получить дополнительно по 0.5 моль АТФ на каждую молекулу затраченного кротонил-КоА. На конечной стадии из бутирил-КоА

образуется бутират по механизму, сходному с образованием ацетата из ацетил-КоА (рис. 1а). Бутиратный цикл (Buckel, 2021) у штамма Z-7981^T незамкнут, так как в геноме нет гена, кодирующего бутирил-КоА-трансферазу (ЕС 2.8.3.8). Остается неясным образование ацетата при росте на глутамате, поскольку часто встречающийся метиласпартатный путь образования ацетата у анаэробов, использующих глутамат (Buckel 2021), у штамма Z-7981^T отсутствует. Мы предполагаем, что часть образованного кротонил-КоА через ацетоацетил-КоА идет на образование ацетата в процессе, обратном образованию кротонил-КоА из пирувата у микроорганизмов, обладающих метиласпартатным путем. Однако это предположение нуждается в проверке. Часть сукцинил-КоА расходуется на образование пропионата. Трансформацию до пропионил-КоА осуществляет метилмалонил-КоА-декарбоксилазный мультиферментный комплекс, кодируемый генным кластером *mmdADCB*. Комплекс генерирует трансмембранный градиент натрия для запасаения энергии через Na^+ -зависимую АТФазу. Подобно действию EtfAB-Bcd комплекса, образование

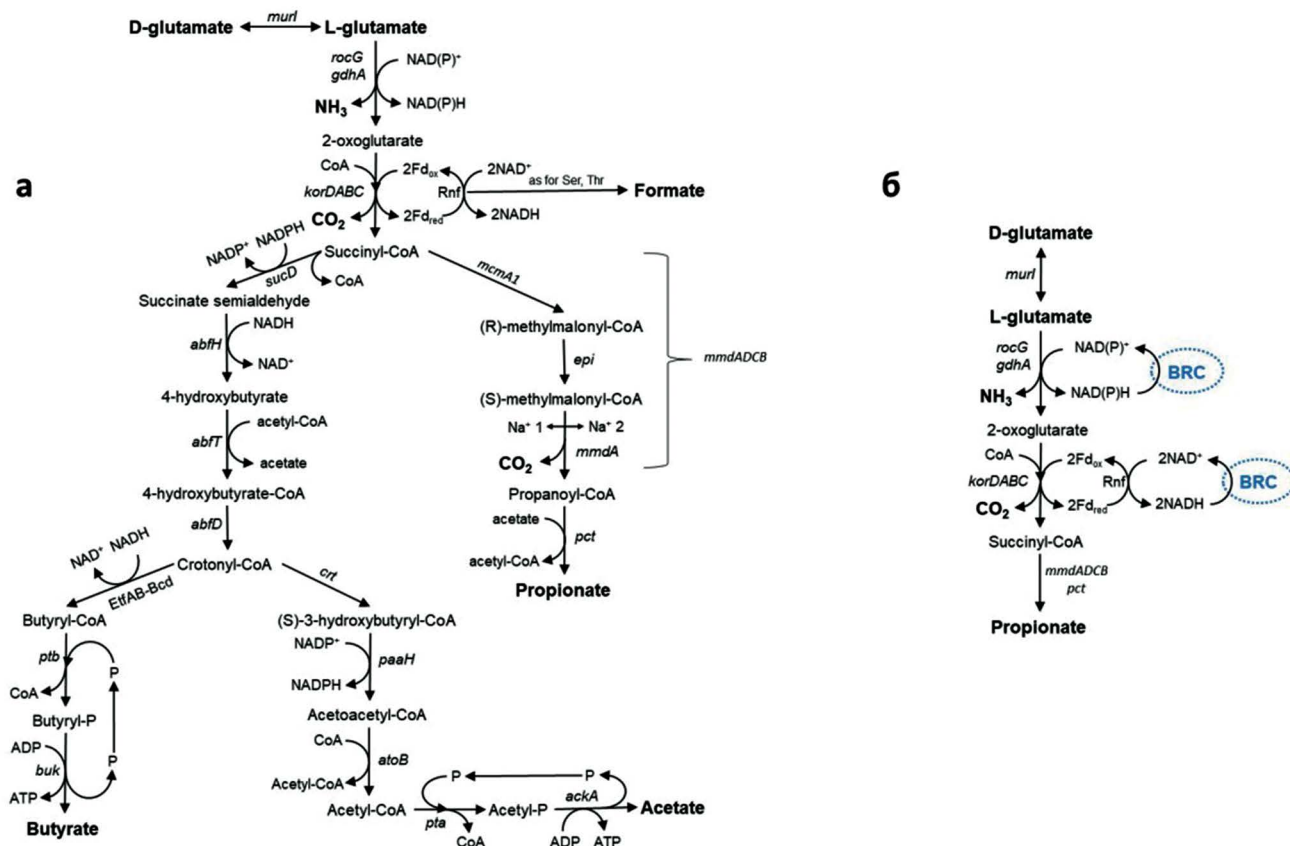


Рис. 2. Предлагаемая метаболическая схема разложения глутамата *A. sibiricum* Z-7981^T: а – без бетаина; б – с бетаином. Субстраты и продукты выделены жирным шрифтом. Обозначения генов и соответствующих ферментов даны в табл. S2 (дополнительные материалы).

пропионата также дает энергетический выход 0.5 моль АТФ на 1 моль субстрата (Buckel, 2021).

Анализ генов, кодирующих ферменты, которые участвуют в разложении аспартата, показал наличие у *A. sibiricum* цикла трикарбоновых кислот с небольшими вариациями ферментов цикла (рис. 3).

В частности, конверсия изоцитрата в 2-оксоглутарат осуществляется изоцитратдегидрогеназой (ЕС 1.1.1.41), характерной для эукариот. Превращение сукцинил-КоА в сукцинат проводит сукцинил-КоА: ацетат КоА-трансфераза, впервые найденная у *Acetobacter aceti* (Mullins et al., 2008). В геноме *A. sibiricum* обнаружены все три известных фермента включения аспартата в цикл: аспартатаммонийлиаза, аспартаттрансаминаза и L-аспартатоксидаза, а также, помимо них, аспартаткиназа (ЕС 2.7.2.4), ответственная за биосинтез некоторых аминокислот. Примечательно, что несмотря на присутствие в цикле сукцинил-КоА, при использовании аспартата образуется только пропионат, а не смесь пропионата и бутирата, как в случае с глутаматом (табл. 2, рис. 2а). Ацетат образуется из пирувата, как показано для серина и треонина (рис. 1а).

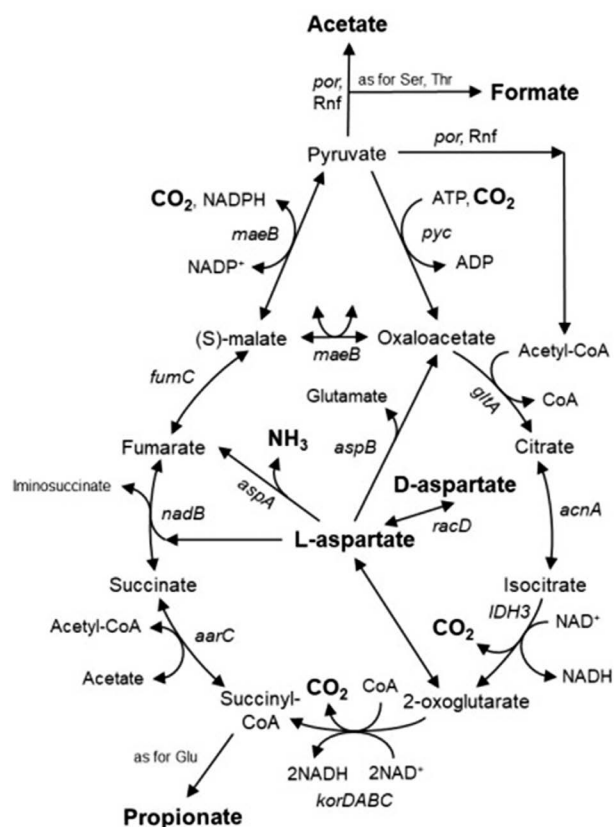


Рис. 3. Предлагаемая метаболическая схема разложения аспартата *A. sibiricum* Z-7981^T. Субстраты и продукты выделены жирным шрифтом. Обозначения генов и соответствующих ферментов даны в табл. S2 (дополнительные материалы).

Основные аминокислоты — лизин и аргинин.

Анализ генома *A. sibiricum* Z-7981^T обнаружил все гены, кодирующие ферменты известного пути деградации лизина (Kreimeier et al., 2007). Реконструированная схема представлена на рис. 4а.

Первые четыре гена (*kamA*, *kamD*, *kamE*, *kdd*), наряду с генами, кодирующими белки с неизвестными функциями, собраны в кластер, характерный для представителей *Fusobacterium*, *Thermoanaerobacter*, *Alkaliphilus* и *Clostridium* (Kreimeier et al., 2007). В результате последовательной работы соответствующих ферментов, кодируемых этим кластером, из лизина удаляется одна молекула аммиака, а сам он превращается в 5-амино-3-оксогексаноат. Далее фермент ЕС 2.3.1.247 (дополнительные материалы, табл. S2), характерный только для организмов, использующих лизин, расщепляет образовавшийся 5-амино-3-оксогексаноат на 3-аминобутирил-КоА и ацетоацетат. Процесс протекает с одновременным присоединением ацетил-КоА. 3-аминобутирил-КоА деаминируется в кротонил-КоА аммонийлиазой, кодируемой геном *kal*, а затем восстанавливается до бутирил-КоА посредством комплекса EtfAB-Bcd, как в случае глутамата. Однако, в отличие от глутамата, бутират здесь образуется за счет действия двухсубъединичной бутират-ацетоацетат-КоА-трансферазы.

При анализе путей метаболизма аргинина было обнаружено, что в геноме штамма Z-7981^T имеются все четыре гена, кодирующие ферменты цикла мочевины: *argH*, *rocF*, *OTC*, *argG* (рис. 5).

Катаболический распад аргинина происходит, скорее всего, по аргиназному пути с отщеплением мочевины и последующим образованием орнитина, так как генов, кодирующих другие пути распада аргинина (ADI, AST, аргининтрансаминазный и аргининдекарбоксилазный), не найдено (Cunin et al., 1986). Известно, что у некоторых анаэробов дальнейшая деградация орнитина протекает через внутреннюю реакцию Стикланда, где в конце окислительной ветви образуется аланин, а в конце восстановительной — 5-аминовалерат (Fonknechten et al., 2009), причем эти продукты выделяются в среду. Однако мы не обнаружили их в культуральной жидкости штамма Z-7981^T. Более того, в геноме отсутствовал ген *prfD*, кодирующий пролинрацемазу (ЕС 5.1.1.4), необходимую для работы D-пролинредуктазы — конечного фермента восстановительной ветви. Примечательно, что в геноме также отсутствовал и ген *ODC*, кодирующий орнитиндекарбоксилазу (ЕС 4.1.1.17) (декарбоксилазный путь), следовательно, организм разлагает орнитин по другому пути.

Совместное использование аминокислот и бетаина в реакции Стикланда

Задачей следующего эксперимента было определить, влияет ли внесение бетаина на рост *A. sibiricum* с каждой из 20 протеиногенных

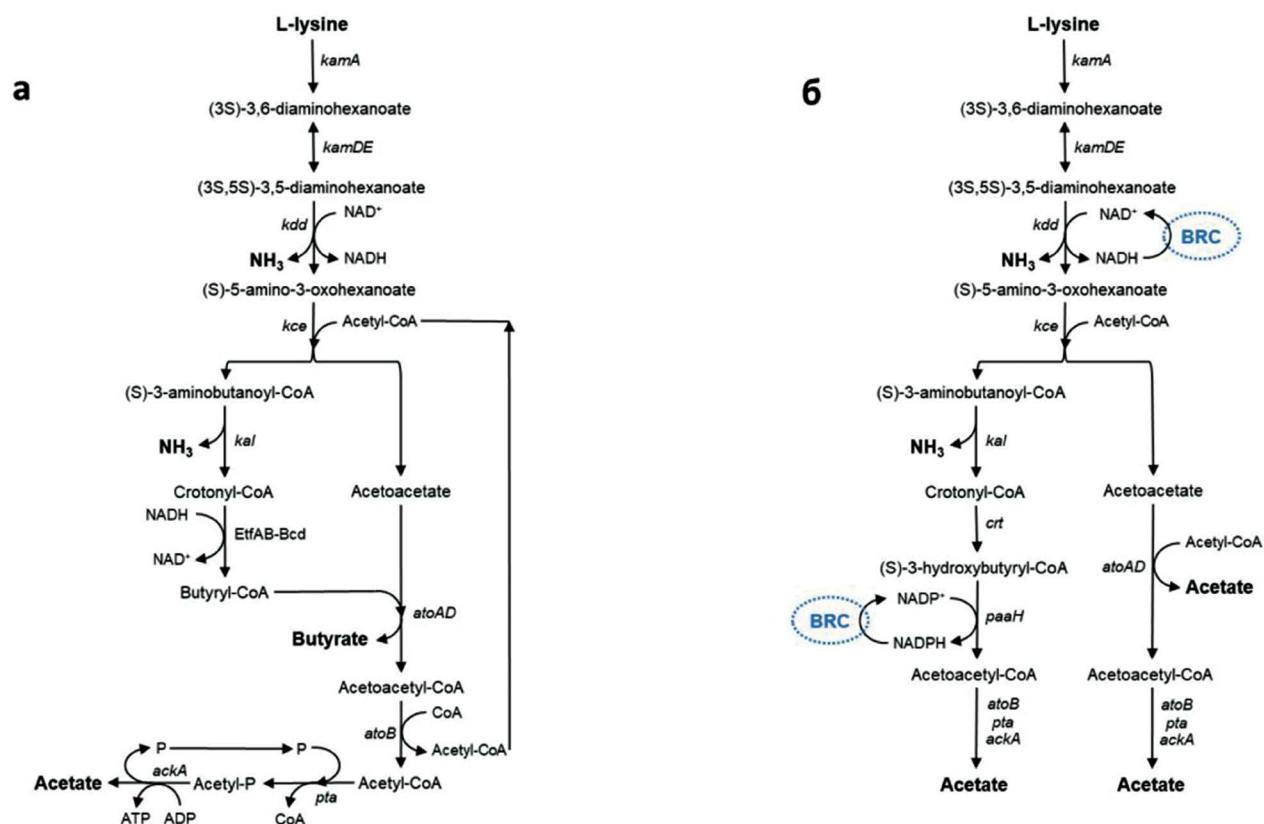


Рис. 4. Предлагаемая метаболическая схема разложения лизина *A. sibircum* Z-7981^T: а – без бетаина; б – с бетаином. Субстраты и продукты выделены жирным шрифтом. Обозначения генов и соответствующих ферментов даны в табл. S2 (дополнительные материалы).

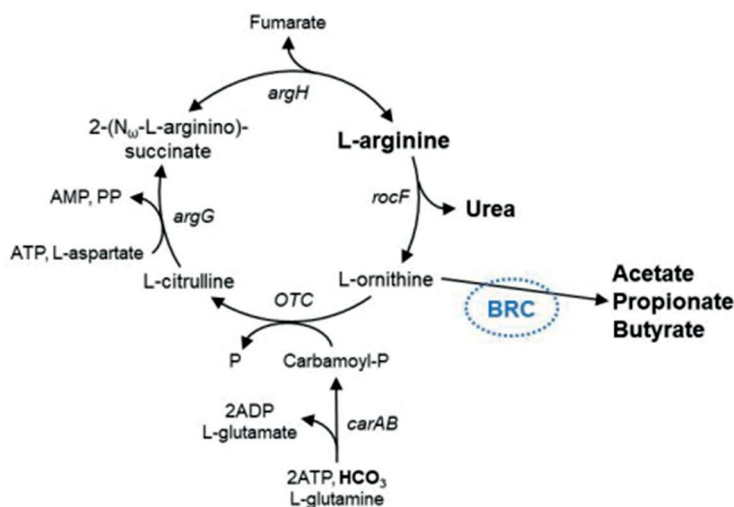


Рис. 5. Цикл мочевины при разложении аргинина *A. sibircum* Z-7981^T. Субстраты и продукты выделены жирным шрифтом. Обозначения генов и соответствующих ферментов даны в табл. S2 (дополнительные материалы).

аминокислот. Найдено, что на всех аминокислотах, рассмотренных в предыдущем разделе, наблюдалась стимуляция роста (табл. 3).

Кроме того, в паре с бетаином были выявлены и другие аминокислоты, рост на которых в его отсутствие обнаружен не был, а именно аланин,

Таблица 3. Стимуляция роста *A. sibiricum* Z-7981^T бетаином

Аминокислота	ΔОП ₆₀₀		Коэффициент стимуляции роста
	– бетаин	+ бетаин	
Серин	0.05	0.11	2.2
Треонин	0.14	0.18	1.3
Аспартат	0.07	0.12	1.7
Глутамат	0.09	0.14	1.6
Лизин	0.08	0.16	2.0
Аргинин	0.08	0.11	1.4

Таблица 4. Аминокислоты, бетаин и продукты, измеренные в конце роста *A. sibiricum* Z-7981^T, и количественные соотношения между ними

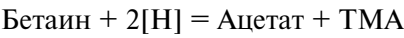
	ΔАК	ΔБет	ΔБет/ΔАК	ΔNH ₃	ΔNH ₃ /ΔАК	ТМА	ТМА/ΔБет	Ацетат	ДП	ДП/ΔАК
Ser+Бет	11.5	11.7	1.0	11.7	1.0	10.6	0.9	21.9	–	–
Thr+Бет	10.8	11.6	1.1	11.4	1.1	10.6	0.9	29.5	X	–
Glu+Бет	9.9	17.6	1.8	9.9	1.0	14.6	0.8	17.5	Пропионат 8.7	0.9
Asp+Бет	10.0	19.2	1.9	9.1	0.9	20.8	1.1	30.0	–	–
Lys+Бет	8.7	17.7	2.0	16.5	1.9	18.6	1.1	43.5	Следы бутирата	–
Arg+Бет	9.9	18.8	1.9	19.1	1.9	17.1	0.9	35.6	Следы пропионата	–
Ala+Бет	10.9	20.2	1.9	11.2	1.0	15.8	0.8	31.8	–	–
Leu+Бет	7.9	15.4	2.0	8.0	1.0	16.8	1.1	17.2	Изовалерат 7.5	1.0
Ile+Бет	4.9	10.6	2.1	4.4	0.9	10.8	1.0	12.0	2-Метилбутират 5.0	1.0
Val+Бет	5.4	11.4	2.1	4.7	0.9	10.8	1.0	13.2	Изобутират 4.7	0.9
Phe+Бет	7.4	15.5	2.1	8.0	1.1	14.5	0.9	17.1	Фенилацетат 7.3	1.0
Met+Бет	8.0	16.7	2.1	7.3	0.9	15.4	0.9	18.1	X	–

Примечание. X – неидентифицированный продукт.
Обозначения: Бет – бетаин; АК – аминокислота; ТМА – триметиламин; ДП – другой продукт, отличный от ТМА и ацетата. Все концентрации даны в мМ.

лейцин, изолейцин, валин, фенилаланин и метионин. Стехиометрические соотношения, полученные для каждой пары аминокислота + бетаин, и образующиеся из них продукты показаны в табл. 4.

Общими для всех аминокислот продуктами являлись аммиак и ацетат, а также триметиламин как продукт восстановления бетаина. Кроме того, отмечено образование продуктов деградации, специфичных для некоторых аминокислот: изовалерата из лейцина, 2-метилбутирата из изолейцина, изобутирата из валина, фенилацетата из фенилаланина, пропионата из глутамата. При росте на треонине и метионине обнаружены нелетучие органические кислоты, которые не удалось идентифицировать.

Анализ генома показал наличие у штамма Z-7981^T транспортной системы для бетаина (*oriD*), а также трехкомпонентного глицин/саркозин/бетаинредуктазного комплекса ABC, сопряженного с тиоредоксин восстановительной системой (Andreesen, 2004). Субстратная специфичность комплекса определяется двухсубъединичным компонентом В, при этом геном содержит гены, кодирующие только глицин – (*grdEB*, ЕС 1.21.4.2) и бетаин- (*grdIH*, ЕС 1.21.4.4) редуктазу. Совместно с ацетаткиназой комплекс расщепляет бетаин на ацетат и триметиламин (ТМА) в стехиометрическом отношении 1 : 1 (рис. 6):



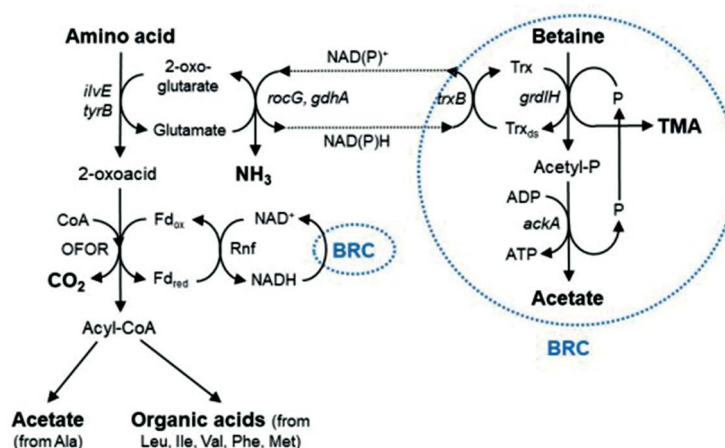


Рис. 6. Предлагаемая метаболическая схема разложения аланина, лейцина, изолейцина, валина, фенилаланина и метионина в присутствии бетаина для *A. sibiricum* Z-7981^T. Субстраты и продукты выделены жирным шрифтом. Обозначения генов и соответствующих ферментов даны в табл. S2 (дополнительные материалы).

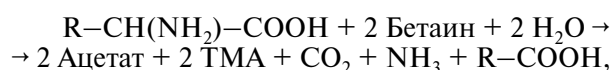
Восстановительные эквиваленты для этой реакции поступают на тиоредоксин из цепи окисления аминокислоты. Именно в местах их образования происходит сопряжение с бетаинредуктазным комплексом. Изменение потока электронов, связанное с включением бетаина в метаболизм, приводит к изменению состава продуктов (табл. 2). В частности, это проявилось в отсутствии формиата и бутирата (табл. 4).

Несмотря на то, что реакция Стикланда была открыта 90 лет назад (Stickland, 1934), подробные энзиматические исследования, касающиеся сопряжения окислительной и восстановительной ветвей реакции, выполнены лишь для некоторых аминокислот. Общая метаболическая схема распада аланина, лейцина, изолейцина, валина и фенилаланина в присутствии бетаина, построенная на основании литературных данных и подтвержденная анализом генома *A. sibiricum* Z-7981^T, показана на рис. 6.

Из схемы видно, что восстановительные эквиваленты поступают к бетаину из двух участков цепи окисления, а именно на этапе деаминации аминокислоты до 2-оксокислоты через глутаматдегидрогеназу и на этапе превращения 2-оксокислоты в соответствующий ацил-КоА через ферредоксин-зависимые оксидоредуктазы семейства OFOR (EC 1.2.7.-), гены которых найдены в геноме. В первом случае сопряжение производится посредством трансаминазы разветвленных аминокислот (EC 2.6.1.42), которая, несмотря на название, отличается широкой субстратной специфичностью и работает не только с разветвленными аминокислотами, но и, в частности, с метионином (Bezudnova et al., 2017). На втором участке сопряжения КоА-производные органических кислот подвергаются гидролизу с образованием соответствующих кислот, обозначенных в табл. 4 как

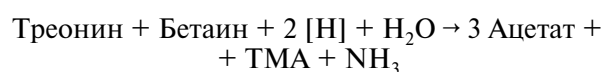
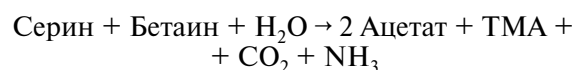
“другой продукт”. Мы предполагаем, что распад метионина также протекает в соответствии со схемой, показанной на рис. 6. В таком случае неидентифицированным продуктом роста *A. sibiricum* на метионине с бетаином может являться 3-(метилтио)пропионат. Образование сульфида и метантиола, характерных для альтернативных путей разложения метионина, не обнаружено.

Во всех указанных случаях на окисление одной молекулы аминокислоты расходуется две молекулы бетаина, что подтверждается нашими экспериментальными данными (табл. 4). Такая же стехиометрия была продемонстрирована и в самом первом сообщении об использовании бетаина как акцептора электронов в реакции Стикланда (Naumann et al., 1983):



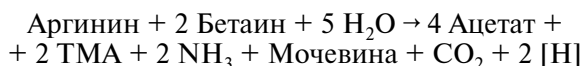
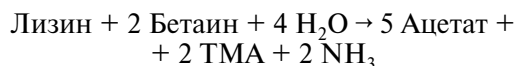
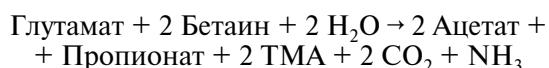
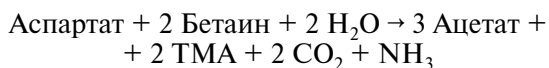
где R — CH₃ для аланина, а для лейцина, изолейцина, валина, фенилаланина — структуры, соответствующие каждой аминокислоте.

В катаболическом пути распада серина и треонина восстановительные эквиваленты образуются только на этапе превращения пирувата в ацетил-КоА (рис. 1а), поэтому для этих аминокислот молярное соотношение с бетаином должно быть 1 : 1 (табл. 4). Для серина это показано ранее на примере *H. salinarum* (Mouné et al., 1999), для треонина литературных данных нет.



В соответствии со схемой (рис. 16), восстановительные эквиваленты, которые в случае отсутствия внешнего акцептора электронов идут на образование формиата, при наличии бетаина поступают на его восстановление, что приводит к отсутствию формиата среди продуктов. Неидентифицированный продукт, образующийся при росте на треонине с бетаином, скорее всего, не связан с участками образования восстановительных эквивалентов, так как его концентрация не зависела от наличия или отсутствия бетаина. В связи с этим в уравнении реакции он не учитывается.

Для остальных аминокислот молярное соотношение с бетаином оказалось равным 1 : 2 (табл. 4):



Учитывая места сопряжения бетаинредуктазного комплекса для хорошо изученных разветвленных аминокислот (рис. 6), а также изменившийся состав продуктов, можно предложить схему сопряжения для глутамата (рис. 26) и лизина (рис. 46), сведения о которых в литературе практически отсутствуют. При росте с глутаматом этот комплекс присоединяется на двух окислительных этапах — деаминации глутамата до 2-оксоглутарата и декарбоксилирования 2-оксоглутарата посредством Rnf-комплекса до сукцинил-КоА. В случае лизина присоединение бетаинредуктазного комплекса также происходит на двух этапах — окислительного деаминации 3,5-диаминогексаноата до 5-амино-3-оксогексаноата и трансформации 3-гидроксибутирил-КоА в ацетоацетил-КоА. В схеме разложения аспартата (рис. 3) имеется несколько участков возможного сопряжения, к которым теоретически может присоединяться бетаинредуктазный комплекс, и какие два из них задействованы фактически, на основании наших данных сказать невозможно. Также остались неясными места сопряжения и для аргинина, поскольку в цикле мочевины отсутствуют места образования восстановительных эквивалентов, а дальнейший путь разложения орнитина в нашем случае неизвестен (рис. 5). Для этих аминокислот требуются углубленные энзиматические исследования.

Таким образом, на основании полученных данных мы предполагаем, что основным способом утилизации бетаина микроорганизмами

из содовых озер является его использование в качестве акцептора электронов в паре с органическими веществами-донорами, в частности, с аминокислотами. За счет этого становится возможным сопряжение различных путей деградации веществ. В данной работе продемонстрирована совместная утилизация бетаина, одного из важнейших осморегуляторов, с метаболитами протеолитического пути деструкции биополимеров клетки. Кроме того, образующийся при восстановлении бетаина триметиламин, включаясь далее в трофическую цепь, дает начало метилотрофному метаногенезу — одному из ключевых терминальных анаэробных процессов деградации органических веществ в содовых озерах.

Присутствие акцептора расширило метаболические возможности организма. У *A. sibiricum* рост без бетаина был возможен только на серине, треонине, аспартате, глутамате, лизине и аргинине, тогда как в его присутствии этот список дополнился аланином, лейцином, изолейцином, валином, фенилаланином и метионином, не использующимися индивидуально. Также обнаружено, что совместное использование аминокислоты с бетаином привело к изменению состава продуктов обмена *A. sibiricum*. Это связано с перенаправлением потока электронов при включении бетаина в биохимические цепи в местах образования восстановительных эквивалентов.

Данные полногеномного секвенирования позволили составить метаболические схемы разложения аминокислот в присутствии и в отсутствие бетаина. В большинстве случаев предложены места включения бетаинредуктазного комплекса в метаболизм аминокислот у *A. sibiricum*. Схемы, составленные с участием этого комплекса, подтверждены стехиометрическими параметрами, полученными из ростовых экспериментов, причем такие схемы и уравнения для треонина, глутамата и лизина в литературе отсутствуют и предложены нами впервые. Данная работа расширяет представления о трофических цепях с участием бетаина.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность д.б.н. Т.Н. Жилюной за предоставление культур микроорганизмов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено в рамках госзадания № 122041100029-2 ФИЦ Биотехнологии РАН. Секвенирование генома *A. sibiricum* Z-7981^T проведено в рамках выполнения работ по Соглашению № 075-15-2021-1051 с Министерством науки и высшего образования Российской Федерации.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Деткова Е.Н., Болтянская Ю.В., Кевбрин В.В. Дегградация глицинбетаина в реакции Стикланда галоалкалофильной бактерией *Halonatronomonas betaini*, выделенной из содового озера Танатар III // Микробиология. 2022. Т. 91. С. 720–725.
- Detkova E.N., Boltyanskaya Y.V., Kevbrin V.V. Glycine betaine degradation via the Stickland reaction by a haloalkaliphilic bacterium *Halonatronomonas betaini* isolated from the Tanatar III soda lake // Microbiology (Moscow). 2022. V. 91. P. 721–726.
- Жилина Т.Н., Заварзин Г.А. Новая экстремально галофильная гомоацетатная бактерия *Acetohalobium arabaticum* gen. nov., sp. nov. // Доклады АН СССР. 1990. Т. 311. С. 745–747.
- Zhilina T.N., Zavarzin G.A. A new extremely halophilic homoacetic bacterium *Acetohalobium arabaticum* gen. nov., sp. nov. // Dokl. Akad. Nauk USSR. 1990. V. 311. P. 745–747.
- Заварзин Г.А., Жилина Т.Н., Кевбрин В.В. Алкалофильное микробное сообщество и его функциональное разнообразие // Микробиология. 1999. Т. 68. С. 579–599.
- Zavarzin G.A., Zhilina T.N., Kevbrin V.V. The alkaliphilic microbial community and its functional diversity // Microbiology (Moscow). 1999. V. 68. P. 503–521.
- Andreesen J.R. Glycine reductase mechanism // Curr. Opin. Chem. Biol. 2004. V. 8. P. 454–461.
- Bezudnova E.Yu., Boyko K.M., Popov V.O. Properties of bacterial and archaeal branched-chain amino acid aminotransferases // Biochemistry (Moscow). 2017. V. 82. P. 1572–1591.
- Biegel E., Schmidt S., González J.M., Müller V. Biochemistry, evolution and physiological function of the Rnf complex, a novel ion-motive electron transport complex in prokaryotes // Cell. Mol. Life Sci. 2011. V. 68. P. 613–634.
- Buckel W. Energy conservation in fermentations of anaerobic bacteria // Front. Microbiol. 2021. V. 12. Art. 703525.
- Buckel W. Unusual enzymes involved in five pathways of glutamate fermentation // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2001. V. 57. P. 263–273.
- Chang A., Jeske L., Ulbrich S., Hofmann J., Koblit J., Schomburg I., Neumann-Schaal M., Jahn D., Schomburg D. BRENDA, the ELIXIR core data resource in 2021: new developments and updates // Nucleic Acids Res. 2021. V. 49. P. D498–D508.
- Cunin R., Glansdorff N., Piérard A., Stalon V. Biosynthesis and metabolism of arginine in bacteria // Microbiol. Rev. 1986. V. 50. P. 314–352.
- Fan C., Bobik T.A. The PduX enzyme of *Salmonella enterica* is an L-threonine kinase used for coenzyme B12 synthesis // J. Biol. Chem. 2008. V. 283. P. 11322–11329.
- Fonknechten N., Perret A., Perchat N., Tricot S., Lechaplais C., Vallenet D., Vergne C., Zaparucha A., Le Paslier D., Weissenbach J., Salanoubat M. A conserved gene cluster rules anaerobic oxidative degradation of L-ornithine // J. Bacteriol. 2009. V. 191. P. 3162–3167.
- Garnova E.S., Zhilina T.N., Tourova T.P., Lysenko A.M. *Anoxynatronum sibiricum* gen. nov., sp. nov. alkaliphilic saccharolytic anaerobe from cellulolytic community of Nizhnee Beloe (Transbaikal region) // Extremophiles. 2003. V. 7. P. 213–220.
- Grant W.D., Jones B.E. Bacteria, archaea and viruses of soda lakes // Soda lakes of East Africa / Ed. Schagerl M. Springer International Publishing, Switzerland, 2016. P. 97–147.
- Heijthuijsen J.H.F.G., Hansen T.A. Anaerobic degradation of betaine by marine *Desulfobacterium* strains // Arch. Microbiol. 1989. V. 152. P. 393–396.
- Hetzel M., Brock M., Selmer T., Pierik A.J., Golding B.T., Buckel W. Acryloyl-CoA reductase from *Clostridium propionicum*. An enzyme complex of propionyl-CoA dehydrogenase and electron-transferring flavoprotein // Eur. J. Biochem. 2003. V. 270. P. 902–910.
- Kreimeyer A., Perret A., Lechaplais C., Vallenet D., Médigue C., Salanoubat M., Weissenbach J. Identification of the last unknown genes in the fermentation pathway of lysine // J. Biol. Chem. 2007. V. 282. P. 7191–7197.
- La Cono V., Arcadi E., La Spada G., Barreca D., Laganà G., Bellocchio E., Catalfamo M., Smedile F., Messina E., Giuliano L., Yakimov M.M. A three-component microbial consortium from deep-sea salt-saturated anoxic Lake Thetis links anaerobic glycine betaine degradation with methanogenesis // Microorganisms. 2015. V. 3. P. 500–517.
- Magoč T., Salzberg S.L. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies // Bioinformatics. 2011. V. 27. P. 2957–2963.
- Mouné S., Manac'h N., Hirschler A., Caumette P., Willison J.C., Matheron R. *Haloanaerobacter salinarum* sp. nov., a novel halophilic fermentative bacterium that reduces glycine-betaine to trimethylamine with hydrogen or serine as electron donors; emendation of the genus *Haloanaerobacter* // Int. J. Syst. Bacteriol. 1999. V. 49. P. 103–112.
- Mullins E.A., Francois J.A., Kappock T.J. A specialized citric acid cycle requiring succinyl-coenzyme A (CoA):acetate CoA-transferase (AarC) confers acetic acid resistance on the acidophile *Acetobacter aceti* // J. Bacteriol. 2008. V. 190. P. 4933–4940.
- Müller E., Fahlbusch K., Walther R., Gottschalk G. Formation of N,N-dimethylglycine, acetic acid, and butyric

- acid from betaine by *Eubacterium limosum* // Appl. Environ. Microbiol. 1981. V. 42. P. 439–445.
- Naumann E., Hippe H., Gottschalk G. Betaine: New oxidant in the Stickland reaction and methanogenesis from betaine and L-alanine by a *Clostridium sporogenes*–*Methanosarcina barkeri* coculture // Appl. Environ. Microbiol. 1983. V. 45. P. 474–483.
- Sorokin D. Y., Tourova T. P., Henstra A. M., Stams A. J. M., Galinski E. A., Muyzer G. Sulfidogenesis under extremely haloalkaline conditions by *Desulfonatronospira thiodismutans* gen. nov., sp. nov., and *Desulfonatronospira delicata* sp. nov. a novel lineage of *Deltaproteobacteria* from hypersaline soda lakes // Microbiology (SGM). 2008. V. 154. P. 1444–1453.
- Sorokin D. Y. Microbial utilization of glycine betaine in hypersaline soda lakes // Microbiology (Moscow). 2021. V. 90. P. 569–577.
- Stickland L. H. Studies in the metabolism of the strict anaerobes (genus *Clostridium*): the chemical reactions by which *Cl. sporogenes* obtains its energy // Biochem. J. 1934. V. 28. P. 1746–1759.
- 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.
- Vasilinets I., Prjibelski A. D., Gurevich A., Korobeynikov A., Pevzner P. A. Assembling short reads from jumping libraries with large insert sizes // Bioinformatics. 2015. V. 31. P. 3262–3268.
- Wang H., Gunsalus R. P. Coordinate regulation of the *Escherichia coli* formate dehydrogenase *fdnGHI* and *fdhF* genes in response to nitrate, nitrite, and formate: roles for NarL and NarP // J. Bacteriol. 2003. V. 185. P. 5076–85.
- Wang S., Huang H., Kahnt J., Thauer R. K. *Clostridium acidurici* electron-bifurcating formate dehydrogenase // Appl. Environ. Microbiol. 2013. V. 79. P. 6176–6179.
- Zhilina T. N., Zavarzin G. A. Alkaliphilic anaerobic community at pH 10 // Curr. Microbiol. 1994. V. 29. P. 109–112.
- Zhilina T. N., Zavarzina D. G., Kolganova T. V., Lysenko A. M., Tourova T. P. *Alkaliphilus peptidofragmentans* sp. nov., a new alkaliphilic bacterial soda lake isolate capable of peptide fermentation and Fe(III) reduction // Microbiology (Moscow). 2009. V. 78. P. 445–454.

EXPERIMENTAL ARTICLES

Genome Analysis and Reconstruction of Metabolic Pathways of Amino Acids and Betaine Degradation in the Haloalkaliphilic Bacteria *Anoxynatronum sibiricum*

E. N. Detkova¹, Yu. V. Boltyanskaya¹, N. V. Pimenov¹, A. V. Mardanov², V. V. Kevbrin¹ *

¹S. N. Winogradsky Institute of Microbiology, FRC “Fundamentals of Biotechnology” of the RAS,
Moscow, 119071, Russia

²K. G. Skryabin Institute of Bioengineering, FRC “Fundamentals of Biotechnology” of the RAS,
Moscow, 119071, Russia

*e-mail: kevbrin@inmi.ru

The genome of the haloalkaliphilic anaerobic microorganism *Anoxynatronum sibiricum* Z-7981^T isolated earlier from the Nizhneye Beloye soda lake (Republic of Buryatia, Russia) was analyzed. The ability of the organism to use betaine as an electron acceptor in the Stickland reaction was revealed. The introduction of betaine into the medium not only stimulated growth on amino acids used by *A. sibiricum* individually, but also allowed identifying additional amino acids, growth on which was not possible without the acceptor. Based on the genomic characteristics and experimental growth data, metabolic schemes of amino acid degradation in the presence and absence of betaine were proposed. Schemes for threonine, glutamate and lysine when used together with betaine were compiled for the first time. For all amino acids used, the qualitative and quantitative composition of the metabolic products was determined and the stoichiometric substrate/product ratios were obtained. Balance equations for the identified variants of the Stickland reaction, including those previously not described in the literature, have been compiled.

Keywords: betaine, amino acids, Stickland reaction, haloalkaliphiles, soda lakes, betaine reductase complex

УДК 579.246

СТРУКТУРА БИОКРИСТАЛЛИЧЕСКОГО НУКЛЕОИДА И ЕГО РОЛЬ В РЕГУЛЯЦИИ ДИССОЦИАТИВНОЙ ФЕНОТИПИЧЕСКОЙ ГЕТЕРОГЕННОСТИ МИКРОБНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ¹

© 2024 г. Г. И. Эль-Регистан^а, Н. Е. Сузина^б, Е. В. Демкина^{а, *}, Ю. А. Николаев^а

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

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

*e-mail: elenademkina@mail.ru

Поступила в редакцию 17.06.2024 г.

После доработки 21.06.2024 г.

Принята к публикации 10.07.2024 г.

Выживание микробной популяции в неблагоприятных для роста условиях обеспечивается: (1) образованием клеток-персистеров (П), созревающих в аметаболические покоящиеся формы (ПФ); (2) защитой хромосомальной ДНК путем формирования биокристаллического нуклеоида (БН); (3) способностью ПФ прорасти в свежей среде смешанной популяцией фенотипически различающихся диссоциантов, один из которых будет к ней наиболее адаптивен. Настоящее исследование решало две задачи: выяснить (1) как структурно организован БН в ПФ прокариот и (2) как биокристаллизация нуклеоида связана с фенотипической гетерогенностью популяций, вырастающих из ПФ. В работе предложена новая модель декристаллизации/рекристаллизации БН при нагревании/охлаждении ПФ при сублетальных температурах в неростовой среде, что воспроизводит динамику формирования БН в модели организации нуклеоида как складчатой глобулы. Электронно-микроскопический анализ структурных изменений БН в прогретых/охлажденных ПФ, совокупно с определением диссоциативных спектров вырастающих из них популяций, позволил получить следующую новую информацию. Биокристаллизация нуклеоида происходит в следующей последовательности: (1) начинающаяся ко-кристаллизация ДНК-Dps сопровождается разделением объема нуклеоида с формированием из суперскладчатой ДНК компактизованного нуклеоида в центральной области клетки и отходящих от него петель линейной ДНК; (2) ко-кристаллизация петельной ДНК-Dps сопровождается ее различной геометрической укладкой – тороидальной, ламеллярной, др.; (3) кристаллизация Dps-Dps, повторяющая матричную укладку петельной ДНК-Dps, приводила к образованию кристаллического массива Dps-Dps, что завершает образование БН. Обнаружено, что нагревание ПФ (45–70°C, 15 мин), приводящее к декристаллизации петельной ДНК-Dps при сохранении структурированности компактизованного нуклеоида, не влияет на диссоциативный (колониально-морфологический) спектр популяции, вырастающей из ПФ. На изменение ее диссоциативного спектра влияет процесс рекристаллизации ДНК-Dps, при котором, по-видимому, происходит связывание Dps не только с прежними, но и с другими сайтами ДНК, также афинными для Dps, что влияет на изменение топологии ДНК и ее транскрипцию.

Ключевые слова: покоящиеся формы бактерий (ПФ), ультраструктура, биокристаллический нуклеоид, нагревание/охлаждение ПФ, де/рекристаллизация ДНК-Dps, фенотипическая гетерогенность популяций

DOI: 10.31857/S0026365624060045

ПРИНЯТЫЕ СОКРАЩЕНИЯ

КН – компактизованный нуклеоид; ЦПМ – цитоплазматическая мембрана; КС – клеточная

стенка; ВМ – внешняя мембрана; ТС – тороидальная структура; ЛМ – ламеллярные структуры; МО – многослойная оболочка ПФ II типа; ПМУ – примембранная укладка ДНК-Dps; ПУ – плотная

¹Дополнительные материалы размещены в электронном виде по DOI статьи: <https://doi.org/10.31857/S0026365624060045>

упаковка ДНК-Dps; МПС — мембраноподобная структура; ПП — периплазматическое пространство; Н — нить ДНК-Dps; Dps — электронная плотность Dps-Dps (Krupyanskii et al., 2018).

Организация хромосомальной ДНК в клетке осуществляется за счет ее взаимодействия с нуклеоид-ассоциированными белками (**N**ucleoid **A**ssociated **P**roteins, NAs), которые контролируют структурное топологическое состояние бактериальной ДНК и действуют как глобальные транскрипционные регуляторы (Azam et al., 1999).

В условиях, неблагоприятных для роста, при переходе микробных культур в стационарную фазу основным NAs является Dps (**D**NA-binding **p**rotein from **s**tarved cells), принадлежащий семейству ферритинов (Azam et al., 1999; Frenkel-Krispin et al., 2004; Orban et al., 2022). Его экспрессия также включена в клеточные ответы на различные стрессорные воздействия (Karas et al., 2015). Синтезируясь в виде мономеров ($M = 19$ кДа), Dps самосборкой организуется в додекамеры (Grant et al., 1998), в форме которых он проявляет свою полифункциональную активность, обусловленную их способностью к: (1) образованию комплексов с ДНК, так называемой ко-кристаллизации ДНК-Dps, что обуславливает компактизацию ДНК и обратимую супрессию транскрипционной активности и (2) самосборке Dps-Dps в упорядоченную кристаллическую структуру. Совокупно это приводит к образованию биокристаллического нуклеоида (БН) (Frenkel-Krispin et al., 2004). На микрофотографиях БН визуализируется как тороидальная или ламеллярная укладка ко-кристаллизованной ДНК-Dps и как тонко пакетированные слои Dps-Dps, собранные в единую кристаллическую структуру. Модели укладки ДНК в кристаллической решетке Dps дискутируются в статье (Dadinova et al., 2019).

Ферроксидазная активность, обусловленная способностью Dps связывать и окислять ионы Fe^{2+} в межсубъединичном центре додекамера, обеспечивает антиоксидантную защиту ДНК от гидроксильных радикалов. Накопление в полости сферы додекамера окисленного железа (не менее 50% от возможного), стабилизирует структуру додекамера (Antipov et al., 2017). В клетках культур стационарной фазы концентрация ионов железа меньше, чем в экспоненциальных, тогда как число молекул Dps в 15–30 раз больше. Поэтому додекамерная организация Dps относительно нестабильна, что обеспечивает обратимость как самосборки додекамеров, так и их связывания с ДНК и, следовательно, возможность декристаллизации Dps-ДНК и реверсии ДНК к транскрипционной активности.

Аффинность ДНК для Dps в значительной степени зависит от буферных условий. Концентрация бивалентных ионов, действующая как триггер для образования комплексов ДНК-Dps, обуславливает

обратимость процесса. При этом, как показано *in vitro*, связывание ДНК с Dps характеризуется ее резким коллапсом — компактизацией, с последующей реверсией от напряженного сжатого состояния к исходному (Vtyurina et al., 2016). Это явление гистерезиса, по-видимому, имеет место *in cellulo* в клетках бактерий. При достижении критических значений концентраций Dps, Fe^{2+} и Mg^{2+} , что на модели *E. coli* соответствует 48–72 ч стационарной фазы, в клетке завершается процесс ко-кристаллизации Dps-ДНК и Dps-Dps в единый БН с сохранением способности хромосомальной ДНК вернуться в исходное структурное и функциональное состояние, когда бактериальные клетки вновь окажутся в условиях, благоприятствующих росту, что предложено рассматривать как длительно живущий кооперативный гистерезис (Abbon dan Zeieri et al., 2014; Karas et al., 2015).

Таким образом, образование БН обеспечивает: (1) защиту нуклеоида от действия внутриклеточных гидралаз в условиях снижения метаболической активности клетки; (2) антиоксидантную и стрессопротекторную защиту нуклеоида за счет ферроксидазной активности Dps; (3) уникальное эпигенетическое состояние ДНК, приводящее к обратимому ингибированию ее транскрипционной активности.

Отметим, что при переходе периодических культур бактерий в стационарную фазу роста в клетках малочисленной субпопуляции (около 1%) происходит еще одно молекулярно-генетическое событие — цитодифференцировка, в результате которой обычные клетки приобретают свойства персистеров (П): (1) выживающих в присутствии летальных доз антибиотиков — антибиотикотолерантных; (2) устойчивых к автолизу, (3) медленно или не делящихся, (4) с резко сниженной метаболической активностью (дормантных); (5) при пересеве в свежую среду воспроизводящих родительскую популяцию (Van den Bergh, 2016; Balaban et al., 2019). В фазе отмирания стареющей культуры обычные клетки автолизуются, а устойчивые к автолизу П, согласно нашей гипотезе, созревают в цистоподобные покоящиеся клетки (ЦПК) (Лойко и соавт., 2015; Мулюкин и соавт., 2015; Николаев и соавт., 2020), что было подтверждено при анализе транскриптов вегетативных клеток и ПФ *E. coli* (Николаев и соавт., 2023).

Важной характеристикой ЦПК является существенное расширение диссоциативного спектра вырастающих из них популяций по колонияльно-морфологическим и физиолого-биохимическим признакам (Эль-Регистан и соавт., 2006; Кряжевских и соавт., 2013; Мулюкин и соавт., 2014, 2015), тогда как персистеры, как предшественники цистоподобных ПФ, прорастают в свежей среде как популяция доминантного родительского фенотипа, что показано в многочисленных исследованиях (Van den Bergh et al., 2016; Balaban et al., 2019). Наиболее вероятным объяснением этого свойства ЦПК могут быть различия в ко-кристаллизации

ДНК-Dps в разных ПФ в процессе их созревания, что будет влиять на транскрипционный профиль ДНК в прорастающих ПФ. В этом случае искусственно вызванные локальные изменения в структуре БН в ПФ приведут к изменениям в фенотипическом профиле вырастающей из ПФ популяции, что может быть вызвано, например, нагреванием/охлаждением, обеспечивающим декристаллизацию/рекристаллизацию БН. Напомним, что нагревание ПФ бацилл (эндоспор) широко известно в спорологии как прием их активации перед прорастанием. Этап активации обратим: если в среде отсутствуют источники питания, активированные споры возвращаются в анабиотическое состояние с сохранением потенции к прорастанию.

Целью настоящего исследования было: с использованием модели нагревания/охлаждения ПФ, воспроизводящей декристаллизацию/рекристаллизацию биокристаллического нуклеоида (БН), определить (1) структуру и этапность образования БН и (2) связь между этапностью образования БН и изменением диссоциативного фенотипического спектра популяций, вырастающих из ПФ.

Отметим, что реализация диссоциативной фенотипической гетерогенности микробной популяции отражает ее чрезвычайно высокий адаптивный потенциал, а у патогенных бактерий — связана с реализацией их вирулентности и патогенности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования. В работе использовали бактерии *Escherichia coli* K-12 (ВКМ РАН, РФ), *Rhodococcus erythropolis* 3C-3^a и *Pseudomonas extrem australis* F 2 (коллекция углеводородокисляющих бактерий ИНМИ РАН). ПФ получали при культивировании бактерий в жидкой среде LB в колбах объемом 750 мл с 300 мл среды при перемешивании на орбитальной качалке (120 об./мин) при температуре 28°C в течение 5 сут с последующим инкубированием в статическом режиме в течение 1–3 мес. при температуре 20–22°C.

Численность жизнеспособных клеток в культурах бактерий определяли путем посева аликвот их десятичных разведений на плотную среду LB (1.5% агара). Чашки инкубировали в течение 3 сут при 28°C, определяли число КОЕ/мл.

Диссоциативный спектр популяций, вырастающих из ПФ на плотных средах, определяли по удельной доле (%) колоний доминантного типа и колоний минорных альтернативных фенотипов (суммарно) на основании их колониально-морфологических признаков.

Термообработка ПФ бактерий осуществлялась прогреванием аликвоты (1.5 мл) суспензии ПФ в эпепендорфах (2 мл) в 10 повторностях на термошейкере

(TS 100, “Biosan”, Латвия) в течение 15 мин при температурах 50–70°C с последующим: (а) резким охлаждением, помещая образцы в колотый лед на 5–7 мин; (б) медленным охлаждением при комнатной температуре в течение 25–30 мин или (в) без охлаждения, сразу фиксируя прогретые клетки глутаральдегидом (1.5%). В образцах определяли численность жизнеспособных ПФ (КОЕ/мл) и ультраструктурную организацию ПФ электронно-микроскопически.

Электронно-микроскопические исследования. Суспензии ПФ центрифугировали (5000 g, 15 мин). Осажденные клетки фиксировали в 1.5% растворе глутарового альдегида в 0.05 М какодильном буфере (pH 7.2) при 4°C в течение 1 ч, трижды отмывали в том же буфере и дофиксировали в 1% растворе OsO₄ в 0.05 М какодильном буфере (pH 7.2) в течение 3 ч при 20°C. После обезвоживания в серии спиртов и ацетоне материал заключали в эпоксидную смолу Epon 812. Ультратонкие срезы (Микротом LKB-III, “LKB”, Швеция) монтировали на опорные сеточки, контрастировали в течение 30 мин 3% раствором уранилацетата в 70% спирте и дополнительно контрастировали цитратом свинца по Рейнольдсу. Срезы просматривали в электронном микроскопе JEM-100B (“JEOL”, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ (с использованием оборудования ЦКП “Коллекция UNIQEM” ФИЦ Биотехнологии РАН).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Основным объектом электронно-микроскопических исследований были ПФ бактерии *E. coli* K-12 (хранение 3 мес.), как принятая модель изучения биокристаллического нуклеоида. Выявленные закономерности верифицировали на ПФ бактерий *P. extrem australis* и *R. erythropolis* (хранение 3 мес.).

Структурная организация биокристаллического нуклеоида в покоящихся формах бактерий. Покоящиеся формы *E. coli* были представлены двумя морфотипами, различающимися толщиной клеточной оболочки: утолщенной (I тип) (рис. 1а) и толстой многослойной (II тип) (рис. 1б; рис. 1Са, 1Сб), что было отмечено ранее для ПФ других неспорообразующих бактерий (Suzina et al., 2006). На фоне электронно-плотного массива Dps-Dps хорошо выявлялись области упорядоченной укладки кристаллизованной ДНК-Dps или повторяющей ее укладку Dps-Dps тороидального (рис. 1в, 1г) или ламеллярного (рис. 1б; рис. 1Са, 1Сб) типов, многократно описанные ранее, а также центрально расположенная зона низкой электронной плотности с компактизованным нуклеотидом (КН), образованном жидкокристаллической ДНК (рис. 1а, 1б).

Покоящиеся формы *P. extrem australis* (3 мес.) двух морфотипов (I и II), различались толщиной клеточной оболочки (рис. 2а, 2б). Выявляются:

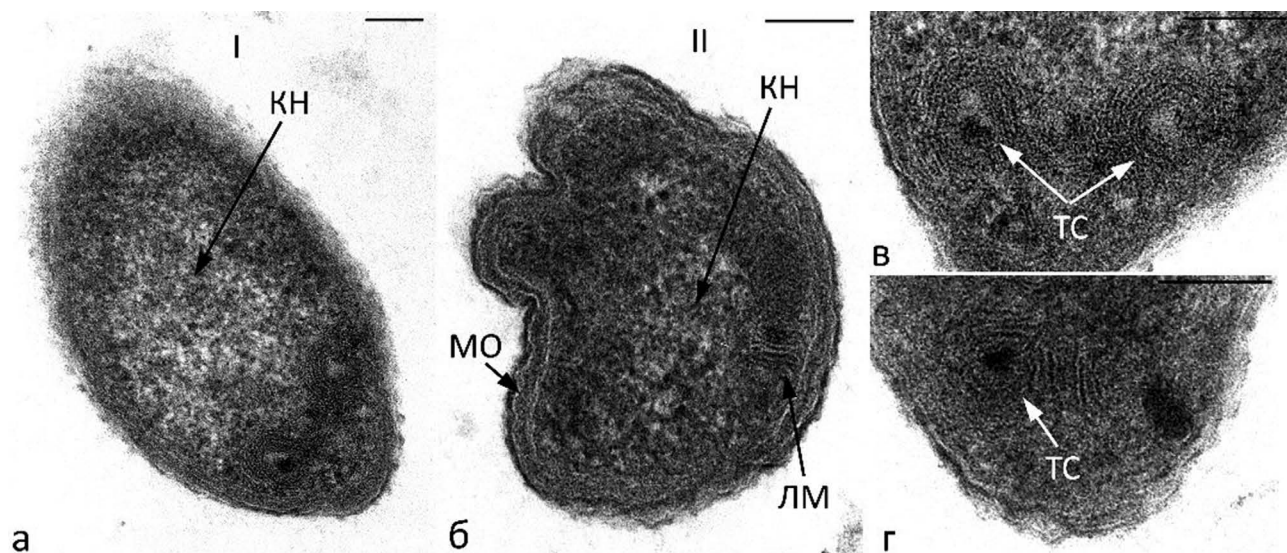


Рис. 1. Тонкие срезы интактных ПФ *E. coli* (3 мес.): а – ПФ I типа тонкостенная; б – ПФ II типа многослойная. Видны: область компактизованного нуклеоида (а, б, е); многослойная оболочка ПФ II типа (б); ламеллярная укладка ДНК-Dps и/или Dps-Dps (г); тороидальная укладка ДНК-Dps и/или Dps-Dps (в). Масштабная метка – 0.2 мкм.

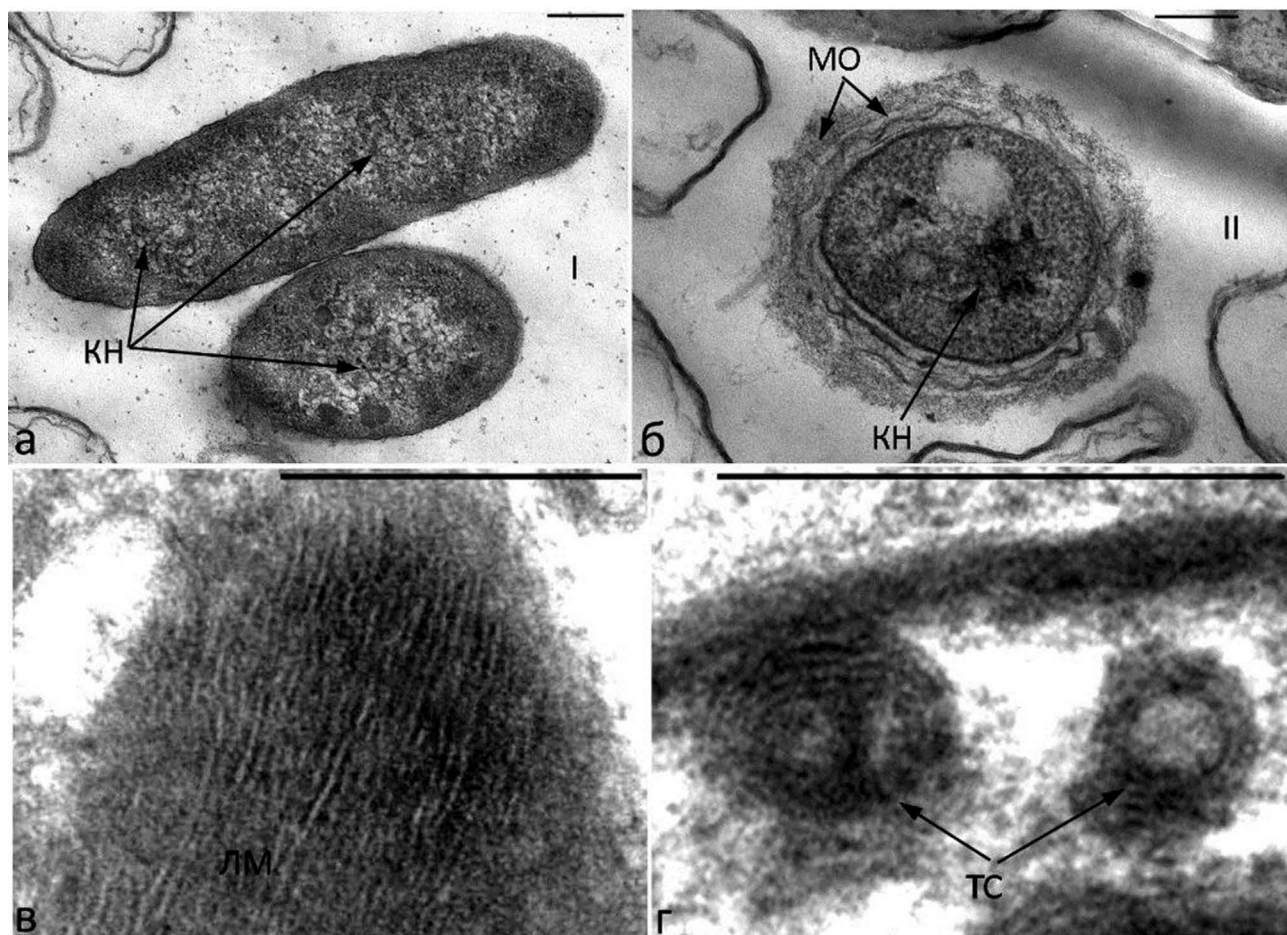


Рис. 2. Тонкие срезы интактных ПФ *P. extremaustralis* (3 мес.): а – ПФ I типа; б – ПФ II типа. Видны: ламеллярная укладка ДНК-Dps и/или Dps-Dps (в, г); тороидальная укладка ДНК-Dps (г). Масштабная метка – 0.2 мкм.

области укладки ко-кристаллизованной ДНК-Dps тороидального (рис. 2г; 2Св) или ламеллярного (рис. 2в; рис. 2Са–2Св); тонко-пакетированная укладка, характерная для Dps-Dps (рис. 2в). Масштабная метка – 0.2 мкм.

Покоящиеся формы *R. erythropolis* (3 мес.) также различались толщиной клеточной оболочки: I типа (рис. 3а, 3б, 3г) и II типа (рис. 3в, 3г). Виден КН, представленный жидкокристаллическими структурами изотропного (рис. 3а, 3б; рис. 3Са, 3Сб), нити

линейной ДНК-Dps, образующие многослойную укладку и петлю (рис. 3в), а также тороидальные структуры (рис. 3г). В ПФ родококка были выявлены ранее не обнаруживаемые мембраноподобные линейные структуры (рис. 3б, 3в). Встречаемость таких структур во многих ПФ не позволяет считать их артефактом.

Структура биокристаллического нуклеоида при нагревании покоящихся форм бактерий. Нагревание ПФ *E. coli* при 50, 55, 65°C в течение 15 мин

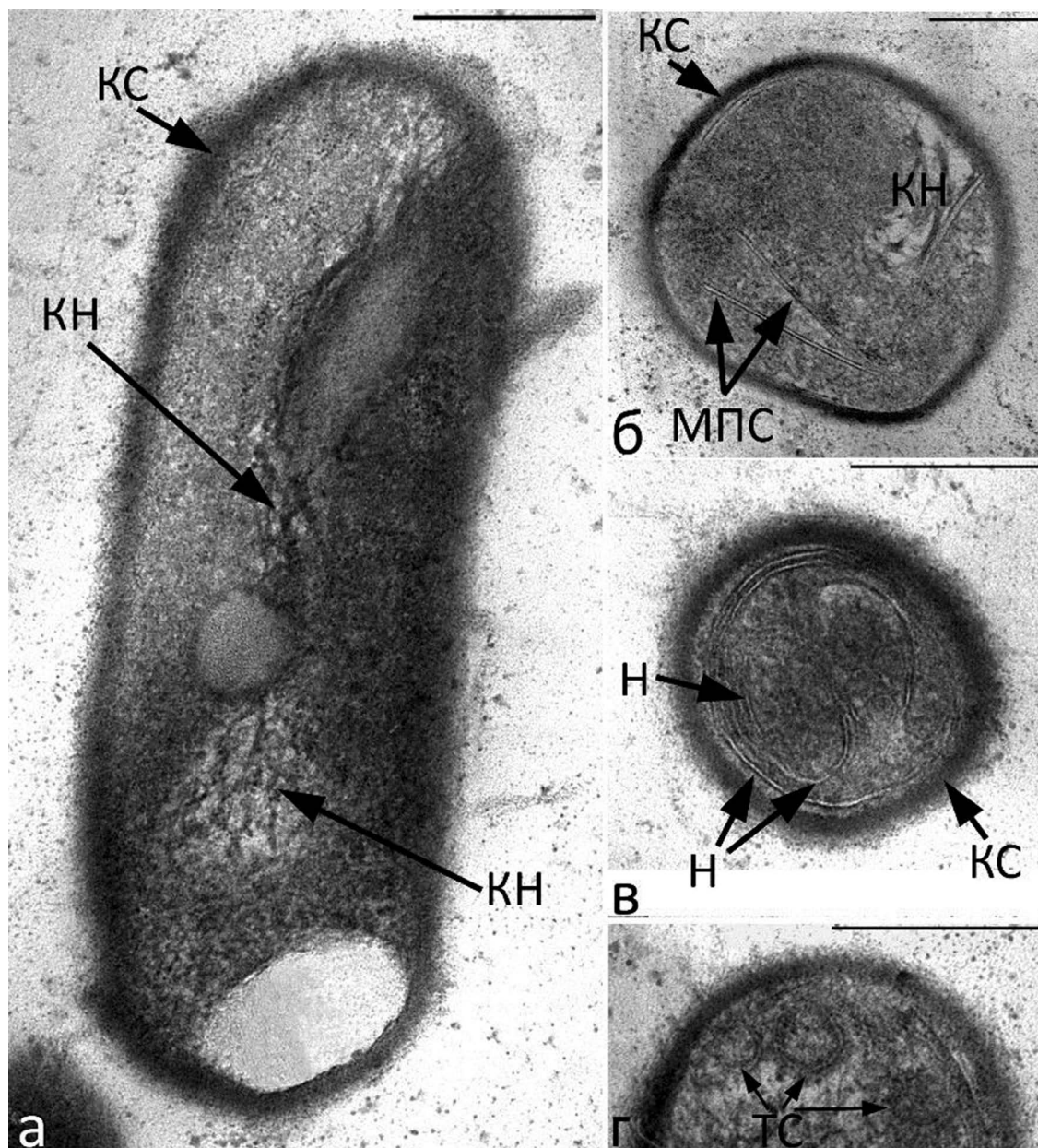


Рис. 3. Тонкие срезы intactных ПФ *R. erythropolis* (3 мес.): а, б – ПФ I типа; в – ПФ II типа. Видны: компактизованный нуклеоид (а, б); жидкокристаллическая структура ДНК компактизованного нуклеоида изотропного типа (б); мембраноподобные линейные структуры (б); многослойная укладка и петля линейной ДНК-Dps (в). Масштабная метка – 0.2 мкм.

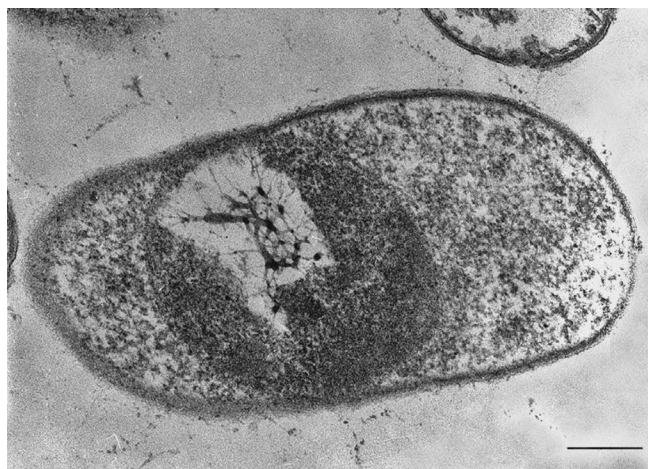


Рис. 4. Тонкие срезы ПФ *E. coli*, нагретых до 50°C, моментальная фиксация. Видны: расплав биокристаллического нуклеоида (БН); жидкокристаллическая структура компактизованного нуклеоида изотропного типа. Масштабная метка — 0.2 мкм.

с моментальной фиксацией (внесением глутаральдегида) (рис. 4–6) демонстрирует картину неравномерного плавления БН.

Видны области остаточной кристаллической укладки ДНК-Dps и/или Dps-Dps (рис. 4а; рис. 4Са; рис. 5Са, 5Сб; рис. 6б; рис. 6Са); сохраняющий свою структуру компактизованный нуклеоид (рис. 4а); обломки кристаллитов Dps-Dps (рис. 4Са; рис. 6Са). Хорошо сохраняющиеся области тороидальной укладки ДНК-Dps с отходящими от тороида нитями ДНК-Dps, что визуализируется впервые (рис. 5а, 5б).

Нагревание ПФ *E. coli* при 55 и 65°C в течение 15 мин с последующим резким охлаждением (лед) (рис. 7, 8; рис. 7С, 8С) выявило интересный феномен увеличения периплазматического пространства (рис. 7а; рис. 8Сб, 8Св), характерный для плазмолиза, как известно, имеющего место при дегидратации клетки, но в данном случае являющегося признаком ее витрификации.

Сжатие протопласта наблюдалось в большей степени на одном из полюсов, несимметрично (рис. 7а; рис. 8Сб, 8Св). Очень хорошо визуализируется жидкокристаллическая структура компактизованного нуклеоида, располагающегося в центре клетки и окруженного сохранившимися участками кокристаллизованной ДНК-Dps и Dps-Dps (рис. 7 в; рис. 7С а, б).

Нагревание ПФ *E. coli* при 55°C с последующим медленным охлаждением при комнатной температуре демонстрирует в большей степени восстановление структурированности БН: образование тороидальных структур (рис. 9а, 9б, рис. 9Сб); увеличение зон плотной укладки структурных элементов БН (рис. 9а, рис. 9Са).

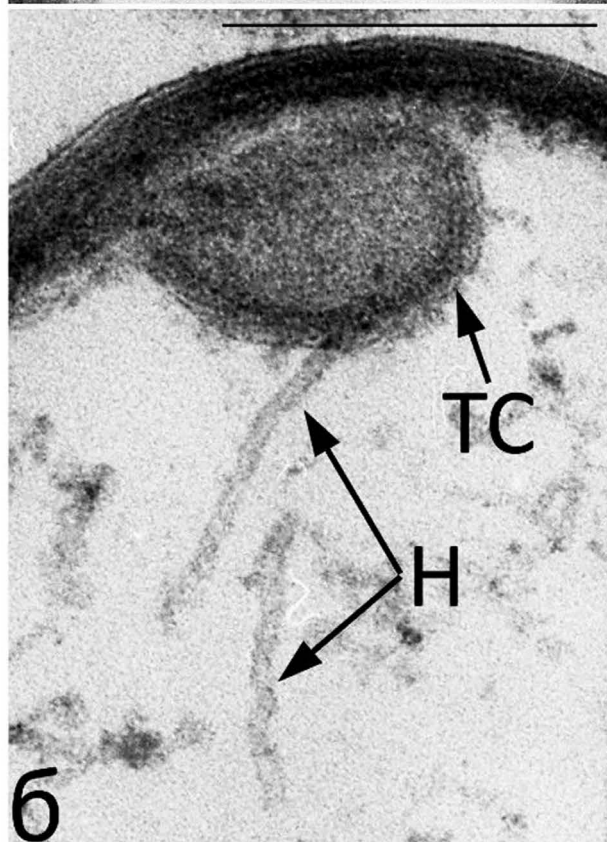
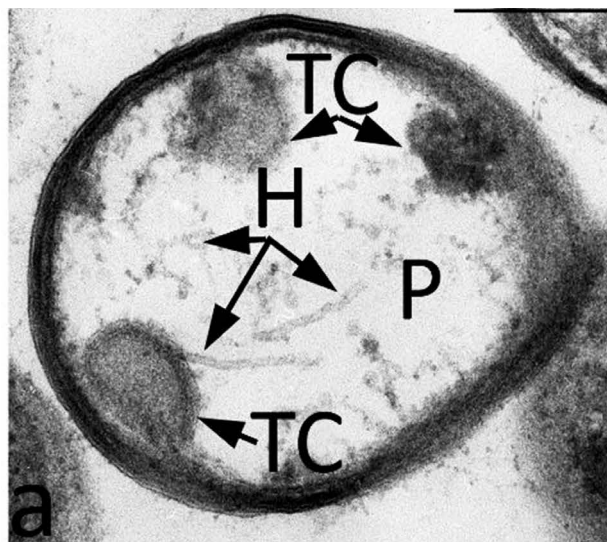


Рис. 5. Тонкие срезы ПФ *E. coli*, нагретых до 55°C, моментальная фиксация: плавление тороидальной структуры в ПФ I типа. Видны: сохранившие биокристаллическую структуру тороиды и нити ДНК-Dps. Увеличение — отходящая от тороида нить ДНК-Dps (б). Масштабная метка — 0.2 мкм.

Нагревание ПФ *R. erythropolis* при 60 и 70°C с последующим резким охлаждением (рис. 10, рис. 11) выявило такие же, как и для ПФ *E. coli*

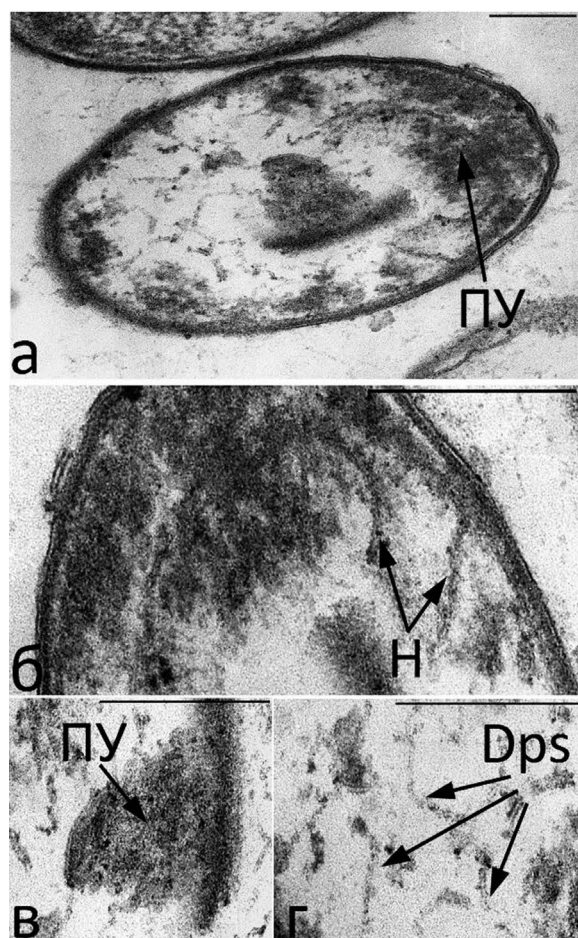


Рис. 6. Тонкие срезы ПФ *E. coli*, нагретых до 65°C, моментальная фиксация: клетка с расплавленным БН. Видны отдельные островки плотной укладки БН (а, б, в); нити ДНК-Dps (б); фрагменты расплавлена БН Dps-Dps (б, в, г). Масштабная метка – 0.2 мкм.

закономерности восстановления структуры расплавленного БН: рекристаллизацию нитей ДНК-Dps (рис. 10а, 10б); жидкокристаллическую структуру компактизованного нуклеоида изотропного (рис. 10б, 10в; рис. 11а) и холестерического типа (рис. 10г; рис. 10Sб). По-видимому, при кристаллизации суперскладчатой ДНК компактизованного нуклеоида сохраняется свойственная ей спиралевидная, тороидальная плектонемическая укладка тяжей ДНК (Willenbrock et al., 2004).

Нагревание ПФ *R. erythropolis* при 60 и 70°C с последующим медленным охлаждением (рис. 12, рис. 13) более наглядно демонстрирует процесс восстановления кристаллической структуры БН, сформированной участками ДНК-Dps с тороидальной (рис. 12а) или петлеобразной укладкой нитей ДНК-Dps (рис. 12б; 13а). Выявляются отмеченные ранее мембраноподобные структуры (рис. 12Sв).

Нагревание ПФ *P. extremaustralis* при 60°C с последующим быстрым или медленным охлаждением выявило их низкую термостойкость. Встречаются интактные ПФ I (рис. 14б) и II типов (рис. 14а) у этого штамма. Плавление БН приводило к визуализации тяжей компактизованного нуклеоида (рис. 14в; рис. 14Sб) вследствие плавления ДНК-Dps и Dps-Dps, сплетения, клубки из сохранившихся нитей ДНК-Dps (рис. 14г, 14д; рис. 14Sв, 14Sд, 14Se), в том числе “омембранные” нитями ДНК-Dps (рис. 14г, 14д), что свидетельствует о такой важной стрессопротекторной функции Dps, как защита ДНК от деструкции внутриклеточными нуклеазами.

Таким образом, при нагревании ПФ бактерий и плавлении БН наиболее долго сохраняются компактизованный нуклеоид, образованный неравномерно толстыми тяжями жидкокристаллической

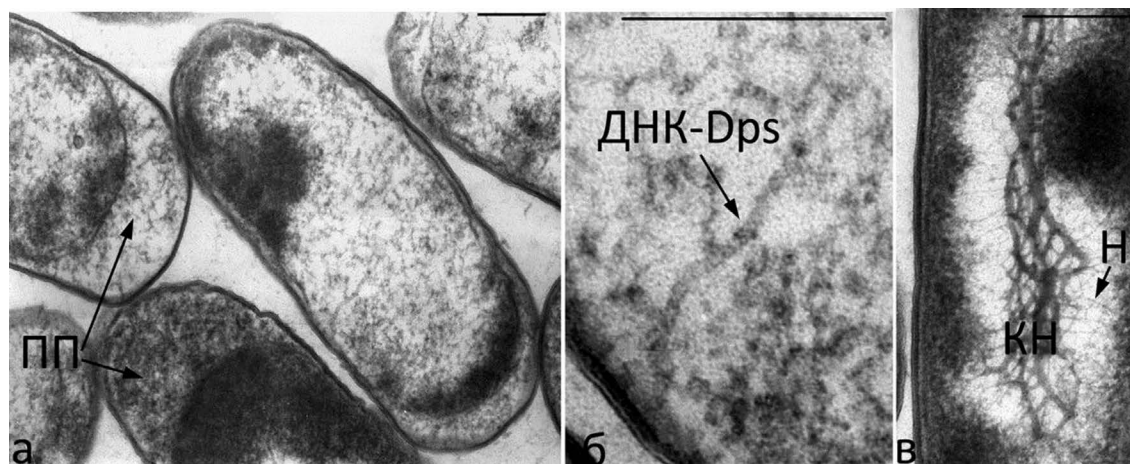


Рис. 7. Тонкие срезы ПФ *E. coli*, нагретых до 55°C, быстрое охлаждение. Видны: расширенное периплазматическое пространство в прогретых ПФ (а); нить линейной ДНК-Dps (б); жидкокристаллическая структура ДНК биокристаллического нуклеоида холестерического типа. Масштабная метка – 0.2 мкм.

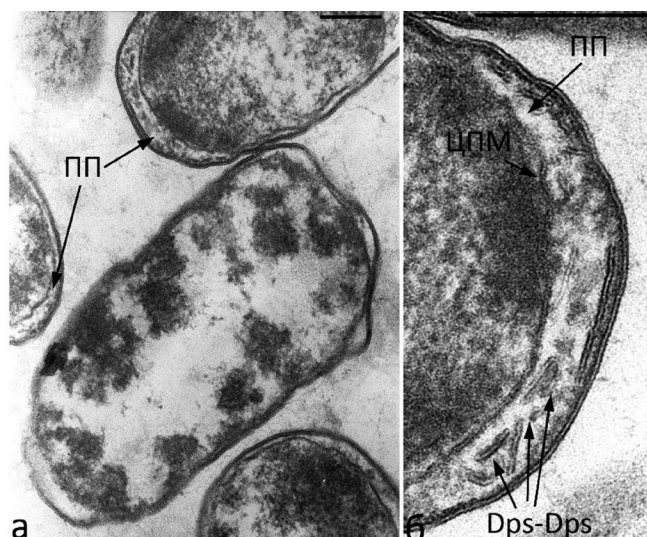


Рис. 8. Тонкие срезы ПФ *E. coli*, нагретых до 65°C, быстрое охлаждение: а–е — плазмолиз протопласта и плавление БН. Видно: увеличение периплазматического пространства (а, б); обрывки укладки Dps-Dps в периплазматическом пространстве (б); остатки плотной укладки биокристалла (а). Масштабная метка — 0.2 мкм.

суперскладчатой ДНК и располагающийся в центральной области клетки с низкой электронной плотностью, а также неравномерно расположенные зоны сохранившейся кристаллической укладки БН, что свидетельствует о гетерогенности структуры БН. Наименее устойчив к нагреванию кристаллический массив Dps-Dps. При всех режимах нагревания фиксируется гетерогенность популяций ПФ по их отклику на нагревание, что отражает гетерогенность терморезистентности субпопуляции ПФ.

Изменения диссоциативной фенотипической гетерогенности популяций, вырастающих из прогретых/охлажденных покоящихся форм *E. coli*. Фенотипическую гетерогенность вырастающих на плотной среде из ПФ популяций оценивали по колониально-морфологическим признакам. В 1 сут культуре *E. coli*, перешедшей в стационарную фазу роста (3×10^9 КОЕ/мл), все клетки, в том числе и персистеры (П), проросли на свежей среде как доминантный фенотип, что соответствует литературным данным (Balaban et al., 2019). Через 2 мес. инкубации жизнеспособность сохраняли около 1–3% клеток П, из которых в виде альтернативных фенотипов вырастали уже более 40%. При посеве ПФ (2 мес.) сразу после их прогревания (50–70°C, 15 мин) без последующего остывания численность выросших КОЕ снижалась при возрастании температуры прогрева, что свидетельствует о гетерогенности популяций ПФ по признаку терморезистентности и/или глубине покоя. При этом диссоциативный спектр вырастающих

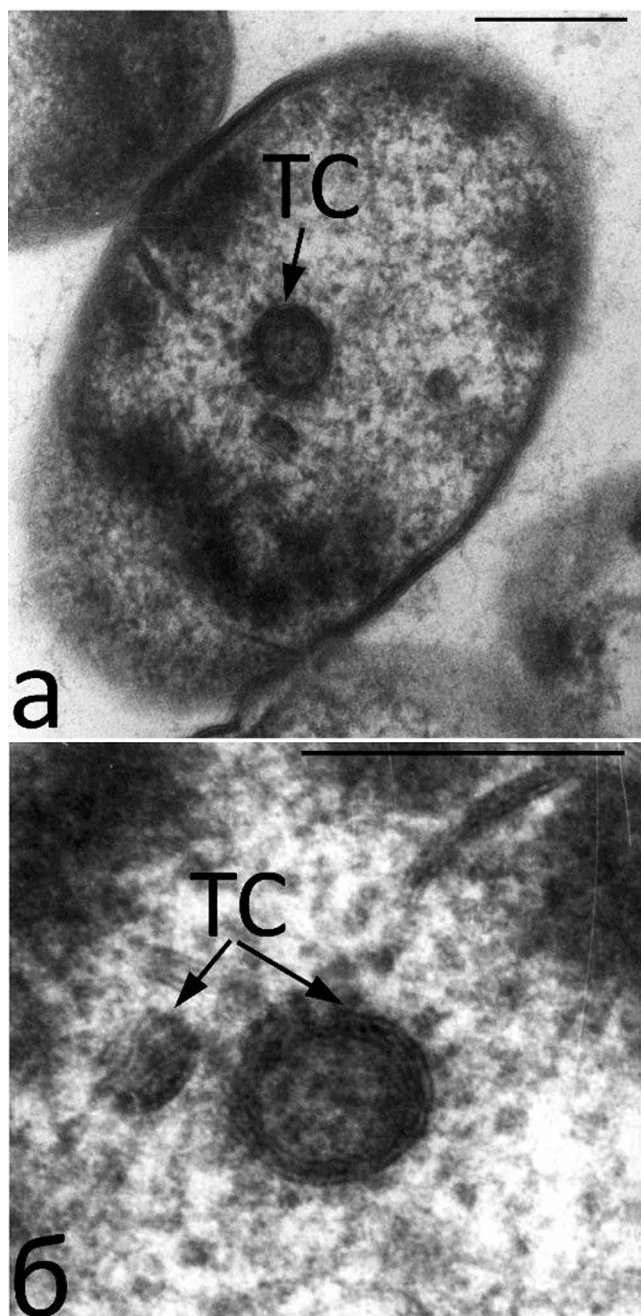


Рис. 9. Нагрев ПФ *E. coli*, нагретых до 55°C, медленное охлаждение: а, б — плазмолиз, начало рекристаллизации БН. В охлажденных ПФ видны: уплотненные участки БН (а); образование тороидов (а, б). Масштабная метка — 0.2 мкм.

популяций незначительно менялся относительно контроля (табл. 1), то есть декристаллизация ДНК-Dps не влияла на фенотип прорастающих ПФ.

В отличие от этого, при посеве ПФ, прогретых и затем резко или постепенно охлажденных (табл. 2, 3), соотношение диссоциантов доминантного и альтернативных фенотипов достоверно изменялось,

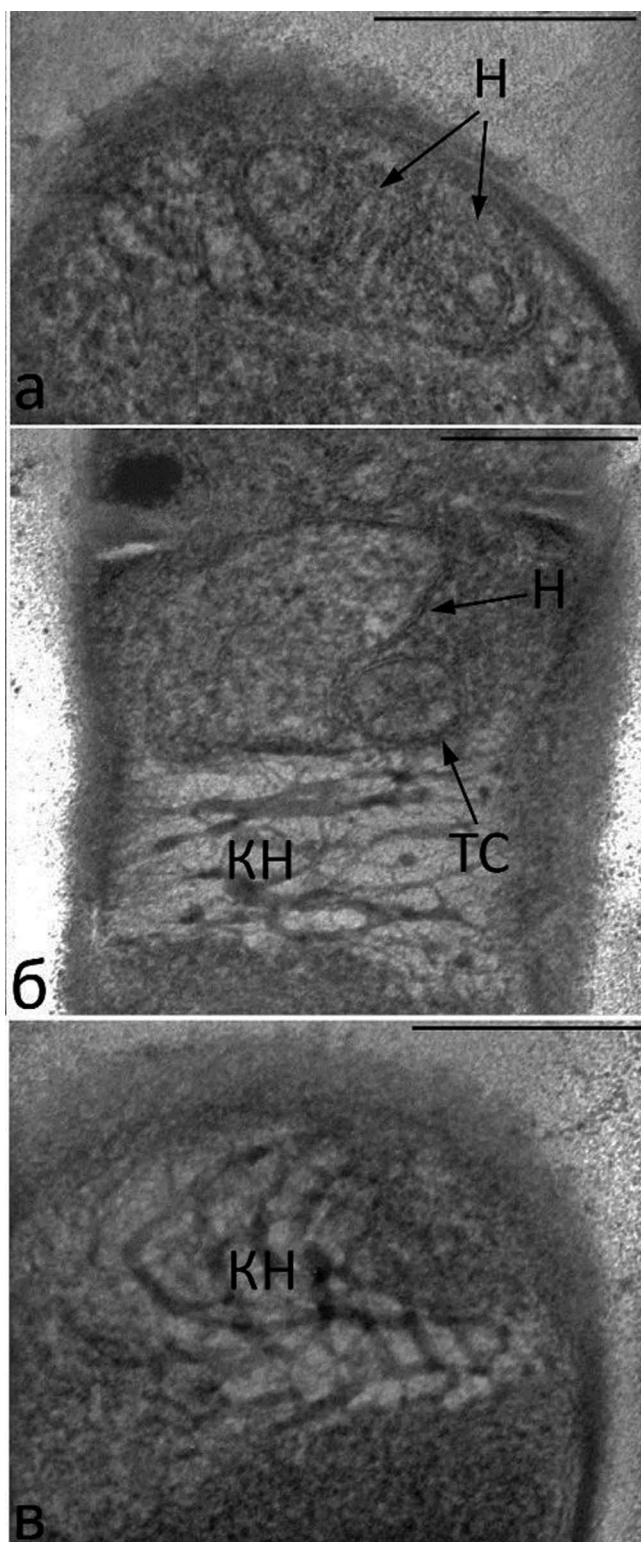


Рис. 10. Тонкие срезы ПФ *R. erythropolis*, нагретых до 60°C, быстрое охлаждение: а–г – компактизованный нуклеоид. Видны: области сохранившей структуру жидкокристаллической ДНК холестерического (в, г) и изотропного типа компактизованного нуклеоида (б); укладка нитей ДНК-Dps (а, б), в том числе тороидального типа (б). Масштабная метка – 0.2 мкм.

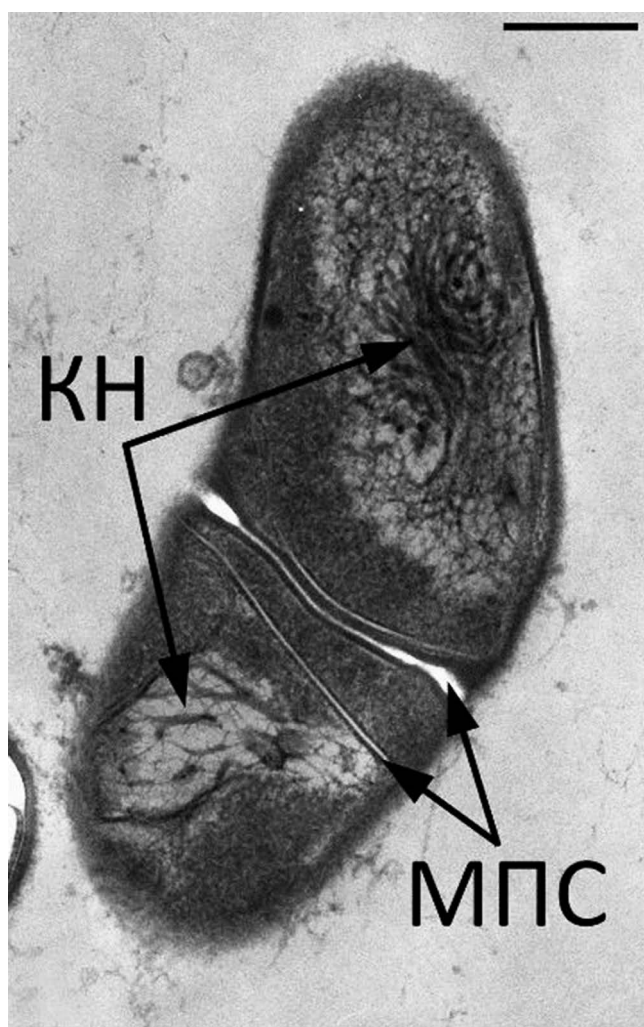


Рис. 11. Тонкие срезы ПФ *R. erythropolis*, нагретых до 50°C, быстрое охлаждение: а – клетка с достаточно хорошо сохранившимся БН. Видны: жидкокристаллическая ДНК сохранившего структуру компактизованного нуклеоида. Масштабная метка – 0.2 мкм.

особенно при резком охлаждении (табл. 2), что можно объяснить изменением сайтов взаимодействия ДНК с Dps, и следовательно, топологии ДНК (и затем РНК) при рекристаллизации ДНК-Dps в процессе остывания прогретых ПФ. Приведенные результаты были подтверждены в экспериментах с нагреванием-охлаждением ПФ родококка и псевдомонады (данные не приводятся).

ОБСУЖДЕНИЕ

Какими свойствами обладают нуклеоид и цитоплазма бактериальной клетки? Анализ литературы в области биофизики цитоплазмы бактериальной клетки и организации нуклеоида совокупно

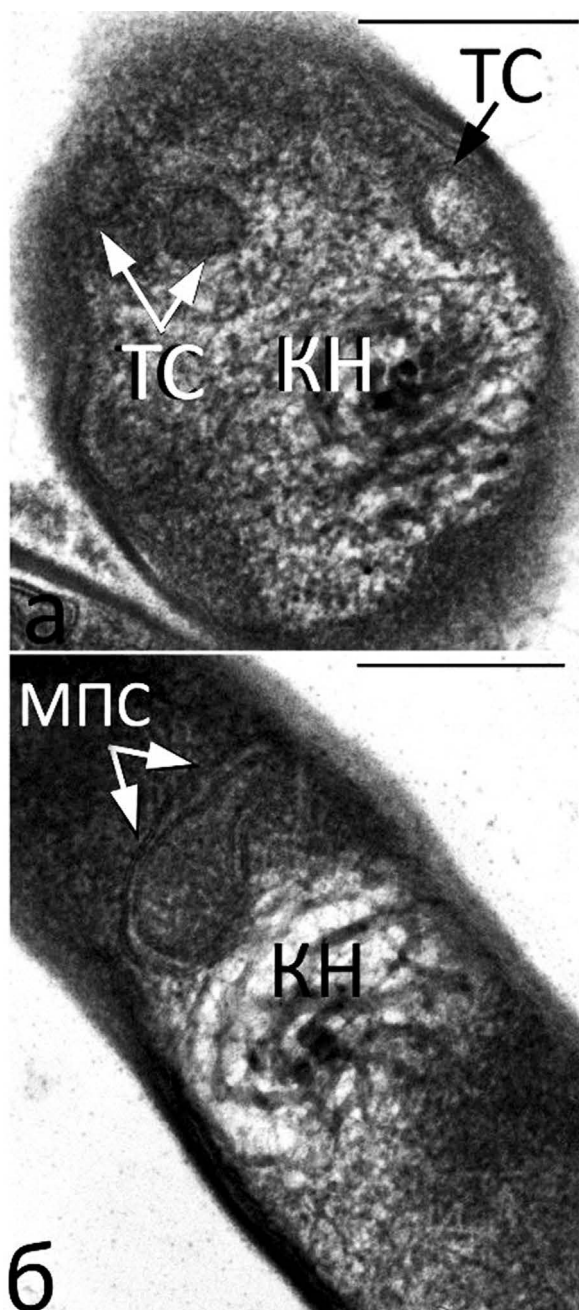


Рис. 12. Тонкие срезы ПФ *R. erythropolis*, нагретых до 60°C, медленное охлаждение. Видны: а, б – компактизованный нуклеоид, практически восстановивший свою структуру БН (а, б); тороидальные структуры ДНК-Dps (а); петля нити линейной ДНК-Dps (б). Масштабная метка – 0.2 мкм.

с результатами наших исследований ЦПК бактерий и данными, полученными в настоящей работе в модели нагревания/охлаждения ПФ, позволяют предложить следующую модель организации БН и связанные с этим проявления фенотипической гетерогенности популяций, вырастающих из ПФ.

Бактериальная цитоплазма, в которой расположен нуклеоид, проявляет свойства, характерные для стеклообразующих коллоидных растворов. В стационарных клетках она изменяется от более жидкообразного к более твердообразному состоянию вследствие: (1) снижения метаболической активности клетки; (2) снижения количества свободной воды (A_w); (3) увеличения размеров и количества внутриклеточных компонентов (Parry et al., 2014). В силу изменения структурной организации цитоплазматической мембраны и изменения транспортных потоков ионов (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{2+} в клетку, а K^+ , Na^+ из клетки) (Minsky et al., 2002) в клетках снижается уровень свободной воды (A_w). Это приводит к увеличению концентрации внутриклеточного “раствора”; собиранию (макро) молекул в более крупные образования, в том числе к образованию рибосом 100S (Mourão et al., 2014), и влияет на самосборку додекамеров Dps и кокристаллизацию ДНК-Dps. При этом в уплотняющемся коллоидном растворе менее крупные частицы могут быть подвижны, а более крупные – демонстрируют “стеклообразную” динамику (Zaccarelli et al., 2005).

Нуклеоид прокариотной клетки включает хромосомальную ДНК (около 60%), а также ассоциированные с ней белки (NAPs), РНК и (не)прочно связанные липиды, которые, в зависимости от качественного и количественного состава, влияют на топологию и, потому, транскрипционную активность ДНК (Azam et al., 1999; Albi et al., 2004). В бактериальной клетке хромосомальная ДНК компактизована более чем в 1000 раз, поэтому нуклеоид обладает многоуровневой, иерархической структурной организацией (Dame et al., 2020). В клетке *E. coli* хромосома организована в 6 макродоменов (Postow et al., 2004; Espeli et al., 2008), в которых обеспечена доступность к отдельным хромосомальным областям для взаимодействия с NAPs в аффинных для них сайтах. Это приводит к топологическим ограничениям нити ДНК и образованию складок, затем складок из складок и т.д., что формирует легко раскрываемую суперскладчатую “глобулу” с отходящими от нее петлями суперспирализованной линейной ДНК (Grosberg et al., 1988), которая располагается диффузно в объеме цитоплазмы.

Что происходит с нуклеоидом ординарных клеток в динамике стационарной фазы? Очевидно, что различающаяся плотность ко-кристаллизованных с Dps участков суперспирализованной линейной и суперскладчатой ДНК будет обуславливать их различную пространственную реорганизацию с образованием зон суперскладчатой ДНК-Dps и петель, сформированных линейной ДНК-Dps, обладающих разной подвижностью, с конденсацией более неподвижных участков хромосомы в центральной области клетки (Perry et al., 2014), что и будет образовывать компактизованный

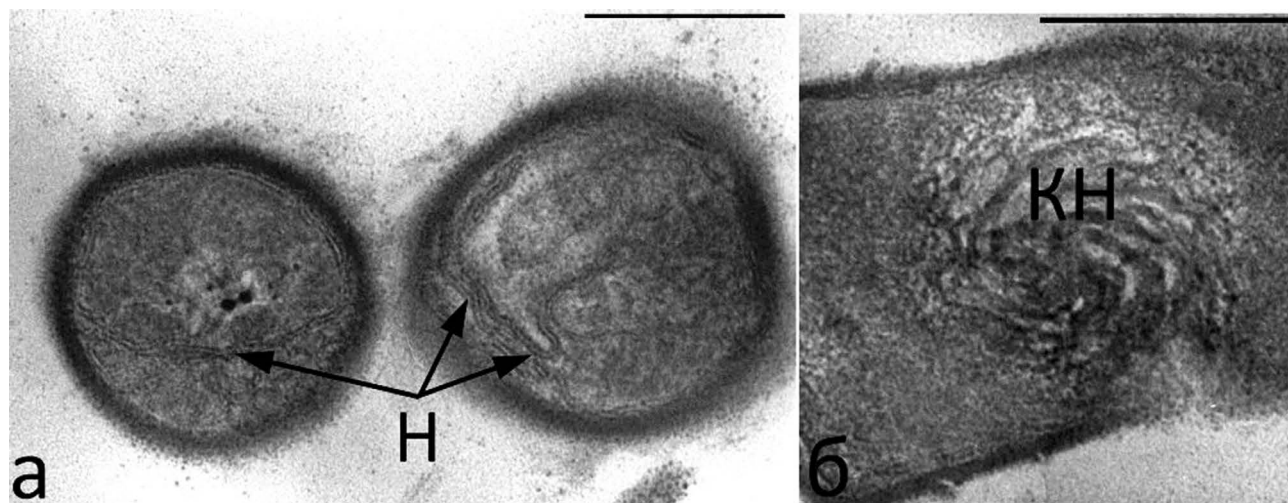


Рис. 13. Тонкие срезы ПФ *R. erythropolis*, нагретых до 70°C, быстрое охлаждение: а, б — восстановление БН. Видны: образование и укладка нитей линейной ДНК-Dps (а); сохранившаяся укладка тяжелой суперспирализованной ДНК компактизованного нуклеоида холестерического типа (б). Масштабная метка — 0.2 мкм.

нуклеоид (рис. 1а, 2а, 3а, 3б). Суперскладчатая структура компактизованного нуклеоида будет препятствовать дальнейшему взаимодействию ДНК с Dps, что подтверждено элементарным анализом (наличием фосфора при крайне низкой концентрации серы) (Крупянских, 2023). Продолжающаяся ко-кристаллизация линейной ДНК с Dps и Dps-Dps будет вытеснять малые молекулы в центральную область клетки с очень низким значением A_w с образованием там своеобразного “криопега”. Это приведет к переходу ДНК компактизованного нуклеоида в жидкокристаллическое состояние холестерического (рис. 10г, 10сб) или изотропного (рис. 3Са, 7в, 10б, 10в) типов.

Ко-кристаллизация суперспирализованной линейной ДНК-Dps, располагающейся в виде петель в объеме цитоплазмы, может осуществляться согласно теоретическим моделям, предложенным на основании электронных микрофотографий БН в голодающих клетках бактерии *E. coli* (Dadinova et al., 2019). Согласно модели (Dadinova et al., 2019), додекамеры Dps формируют различно ориентированные кристаллиты, которые комплементарно со своей нативной структурой огибает ДНК. Последующая ко-кристаллизация Dps-Dps будет повторять эту первичную матричную укладку ДНК-Dps, образуя кристаллический массив Dps-Dps, на срезах которого визуализируется тороидальная (рис. 2д), ламеллярная (рис. 2в) или иная (рис. 1в, 1г) укладка додекамеров Dps.

Так как хромосомальная ДНК гетерогенна по своей первичной структуре и составу адьювантов (NAPs, липидов, РНК), ее ко-кристаллизация с Dps должна быть различна на разных участках ДНК. Поэтому, на наш взгляд, в клетках *in cellulo*

кристаллическая структура ДНК-Dps вряд ли возможна, и методы X-лучевой дифракции выявляют кристаллическую структуру только Dps-Dps, а структура ДНК-Dps не фиксируется (Крупянских et al., 2018).

При снижении в клетке метаболической активности и A_w скорость движения компонентов цитоплазмы замедляется и прекратится, когда концентрация молекул превысит 400 г/л. Происходит стеклование — витрификация цитоплазмы как критическое повышение ее вязкости (Perry et al., 2014), сопровождающееся обратимым прекращением клеточного метаболизма (анабиоз) с приобретением клеткой устойчивости к стрессорным воздействиям. Витрифицированная цитоплазма сохраняет (консервирует) внутриклеточную архитектуру клетки, перешедшей в состояние анабиоза, в том числе — структуру биокристаллизованного нуклеоида (БН). Важным свойством процессов, приводящих к образованию БН, является их обратимость, как отмечено выше, обусловленная относительной нестабильностью додекамерной организации Dps (Antipov et al., 2017), что обеспечивает реверсию стационарных и покоящихся клеток, содержащих БН, к росту в свежей среде.

В отсутствие благоприятных для роста условий судьба клеток поздней стационарной фазы различна. Обычные стационарные клетки (~99%) автолизуются. В клетках немногочисленной субпопуляции устойчивых к автолизу персисторов на протяжении длительного периода (~1 мес.) их созревания в ПФ могут продолжаться обратимые процессы локальной кристаллизации—декристаллизации линейной ДНК-Dps с возможным изменением сайтов взаимодействия Dps с ДНК, что

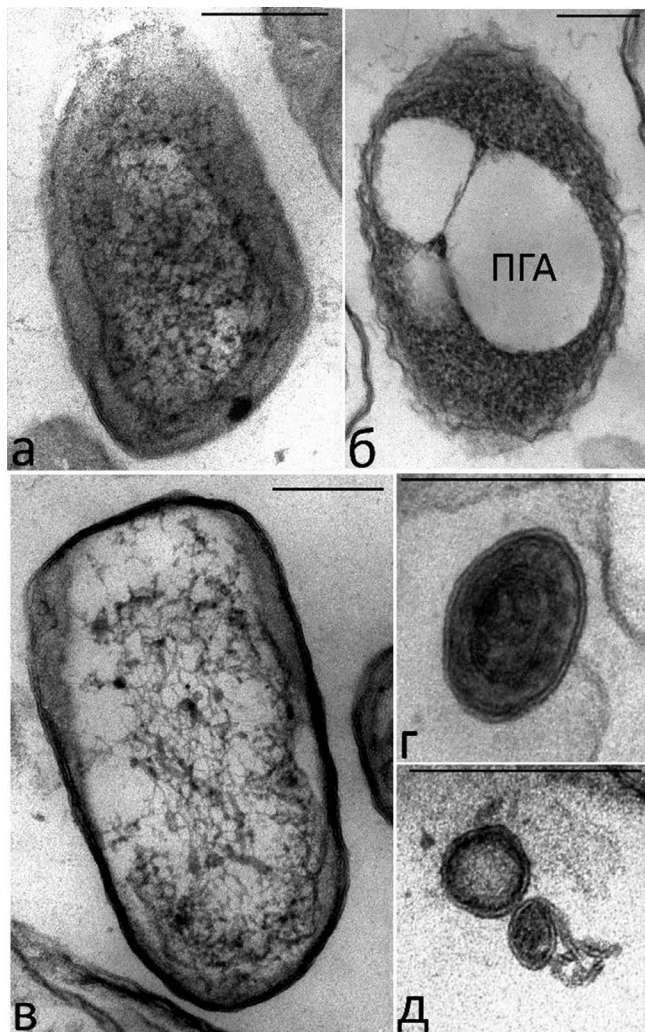


Рис. 14. Тонкие срезы ПФ *P. extremaustralis*, нагретых до 60°C, медленное охлаждение (а–д). Видны: сохранившиеся интактность ПФ II типа (а) и I типа (б) с включениями поли-β-оксимасляной кислоты (ПОМК) (б); нити ДНК потерявшего структурированность компактного нуклеоида (в); самосборка нитей ДНК-Dps в “тороидальные” структуры (г, д). Масштабная метка – 0.2 мкм.

отразится на ко-кристаллизации и укладке нитей ДНК-Dps. Этот процесс возможен только при наличии свободной воды в клетке и будет прекращен вследствие витрификации цитоплазмы, которая зафиксирует последние взаимодействия ДНК с Dps в созревших из клеток-персистеров анабиотических ПФ.

Полученные данные о динамике декристаллизации/рекристаллизации БН при нагревании/охлаждении ПФ модельных бактерий, совокупно с анализом информации в области биофизики цитоплазмы, позволяют предложить следующую последовательность событий биокристаллизации нуклеоида в стационарных клетках и персистерах бактерий.

(1) На начальном этапе интенсивный синтез Dps и комплексообразование ДНК с Dps приводят к образованию дополнительных складок и суперскладчатых участков ДНК, которые, как более плотные, обладающие меньшей подвижностью и меньшей долей сайтов, открытых для Dps, будут концентрироваться в центральной области клетки, образуя компактизованный нуклеоид с отходящими от него петлями линейной ДНК. Происходит разделение объема нуклеоида. В центральной области клетки формируется компактизованный нуклеоид, имеющий в сечении вид тороидально или параллельно уложенных тяжей суперскладчатой ДНК разной толщины (рис. 7в, 7Sa, 10б–10г), что наблюдается в ЦПК бактерий, эндоспорах бацилл и ПФ других типов, а также в ПФ *in situ* в вечномёрзлых почвах (1–3 млн. лет) (Soina et al., 2004; Suzina et al., 2006; Лойко и соавт., 2017). Ко-кристаллизация петлевой линейной ДНК-Dps и на ее скелете – Dps-Dps выдавливает мелкие молекулы в центральную область клетки, вследствие чего в ней резко снижается A_w , что индуцирует переход ДНК компактизованного нуклеоида в жидкокристаллическое состояние. (2). На втором этапе продолжающаяся ко-кристаллизация Dps с петлевой линейной ДНК обуславливает ее компактизацию в объеме цитоплазмы в виде тороидально или параллельно уложенных нитей ДНК-Dps (рис. 2в, 2г, 2Sa, 3б), что многократно демонстрировалось ранее (Frenkel-Krispin, 2001). (3). На третьем этапе происходят кристаллизация Dps-Dps, повторяющая матричную укладку петлевой линейной ДНК-Dps, а также многослойная укладка Dps-Dps, заполняющая периферический объем цитоплазмы.

Такая структурная организация свойственна БН как стареющих стационарных (48–72 ч), так и покоящихся клеток бактерий (1 мес.–миллионы лет), которые, однако, существенно различаются степенью фенотипической гетерогенности популяций, вырастающих при их посеве на свежую среду (Кряжевских и соавт., 2013; Мулюкин и соавт., 2014). Так как молекулярно-генетические события в уже сформированном БН невозможны, отмеченные различия могут быть следствием только физико-химических процессов, связанных с протекающей ко-кристаллизацией ДНК-Dps, при этом, по-видимому, суперспирализованной линейной ДНК-Dps, так как структура компактизованного нуклеоида первична и очень устойчива, в наших экспериментах при нагревании/охлаждении ПФ она не менялась.

Влияние биокристаллизации нуклеоида на проявление фенотипической гетерогенности популяции, вырастающей из ПФ. Недавние исследования обнаружили, что функциональная активность Dps не ограничивается его участием в обратимой супрессии транскрипционной функции ДНК, Dps также

Таблица 1. Соотношение доли (%) диссоциантов доминантного (S) и суммарно минорных (Sm + SCV) фенотипов в популяциях, выросших из прогретых ПФ *E. coli* (2 мес. хранения) без остывания

Температура прогрева, °C	Общее число, КОЕ/мл	Численность диссоциантов, КОЕ/мл			Доля диссоциантов, %	
		S	Sm	SCV	S	Sm + SCV
Контроль*	4.1×10^6	2.6×10^6	1.4×10^6	1×10^5	63	37
45	3.8×10^6	2.2×10^6	1.5×10^6	1.1×10^6	58	42
50	2.3×10^6	1.4×10^6	0.9×10^6		61	39
55	2×10^4	1.1×10^4	0.9×10^4		55	45
60	2.5×10^4	1.65×10^4	0.85×10^4		67	42
65	2×10^2	1×10^2	1×10^2		50	50
70	2×10^2	1×10^2	1×10^2		50	50

*Численность и доли диссоциантов в вариантах без прогревания ПФ.

Таблица 2. Соотношение доли (%) диссоциантов доминантного (S) и суммарно минорных (Sm + SCV) фенотипов в популяциях, выросших из прогретых и затем резко охлажденных ПФ *E. coli* (2 мес. хранения)

Температура прогрева, °C	Общее число, КОЕ/мл	Численность диссоциантов, КОЕ/мл			Доля диссоциантов, %	
		S	Sm	SCV	S	Sm + SCV
Контроль	1.1×10^7	0.55×10^6	0.3×10^6	0.25×10^5	50	50
45	9.7×10^6	0.7×10^6	6.3×10^6	2.7×10^6	7	93
50	3.2×10^6	0.6×10^6	0.9×10^6	1.7×10^6	18	82
60	2.4×10^5	0.6×10^5	0.4×10^5	1.4×10^5	24	78
65	2.2×10^5	0.5×10^5	0.5×10^5	1.2×10^5	23	77

Таблица 3. Соотношение доли (%) диссоциантов доминантного (S) и суммарно минорных (Sm + SCV) фенотипов в популяциях, выросших из прогретых и затем постепенно охлажденных при комнатной температуре ПФ *E. coli* (2 мес. хранения)

Температура прогрева, °C	Общее число, КОЕ/мл	Численность диссоциантов, КОЕ/мл			Доля диссоциантов, %	
		S	Sm	SCV	S	Sm+SCV
Контроль	1.1×10^7	0.55×10^7	0.3×10^7	0.25×10^7	50	50
45	7.4×10^6	1.6×10^6	2.2×10^6	1.6×10^6	29	71
50	7.7×10^6	2.6×10^6	1.5×10^6	3.6×10^6	34	66
60	1.7×10^5	0.7×10^5	0.4×10^5	0.6×10^5	39	61
65	1.2×10^5	0.39×10^5	0.44×10^5	0.37×10^5	33	67
70	2.4×10^3	1.0×10^3	0.6×10^3	0.8×10^3	42	58

влияет на ее транскрипционный профиль (Antipov et al., 2017). Распределение Dps на хромосомальной ДНК имеет неслучайный характер. В *E. coli* регионы его связывания с ДНК перекрываются сайтами, занятыми другими NAPs, что может влиять на связывание Dps с ДНК, а с другой стороны, Dps может вмешиваться в транскрипционную регуляцию других NAPs (Melekhov et al., 2015).

Если специфичность связывания ДНК с Dps и другими NAPs влияет на реализацию определенной транскрипционной программы ДНК в прорастающих ПФ, то нарушения этой сайт-специфичности ДНК-NAPs, вызванные нагреванием/охлаждением

ПФ, будут влиять на изменения транскрипционного профиля (фенотип) в популяции прорастающих ПФ. В настоящем исследовании было показано, что собственно нагревание ПФ *E. coli* (45–60°C, 15 мин) без последующего остывания, приводящее к декристаллизации петельной линейной ДНК-Dps при сохранении структурированности компактизованного нуклеоида (рис. 4, 5, 6), не влияло на диссоциативный спектр популяции прорастающих ПФ (табл. 1). Однако последующее охлаждение прогретых ПФ, при котором происходила рекристаллизация петельной линейной ДНК-Dps, достоверно изменяло степень фенотипической гетерогенности

популяций, вырастающих из ПФ *E. coli* (табл. 2, 3). Из полученных результатов следует, что на изменение транскрипционной программы клетки, вырастающей из ПФ, влияет процесс не декристаллизации, а рекристаллизации ДНК-Dps, при котором, по-видимому, происходило связывание Dps не только с прежними, но и другими, также афинными для Dps сайтами и, возможно, частично оккупированными другими NARs, что влияло на реализацию альтернативных доминантному фенотипов.

Экстраполируем полученные результаты на процесс созревания персистеров в ПФ. Отметим, что 48–72 ч персистеры, в которых, в силу их крайне низкого метаболизма, в отличие от стационарных ординарных клеток, еще не сформировался БН, вырастают на свежей среде как родительский фенотип (доминантный), что неоднократно отмечалось в литературе (Van den Bergh et al., 2016; Balaban et al., 2019). Однако длительно инкубируемые (не менее 1 мес.) персистеры, созревшие в ПФ, вырастают популяцией, содержащей 40–50% альтернативных фенотипов (табл. 1). То есть принципиально важным фактором для появления гетерогенности популяций, вырастающих из ПФ является длительность процессов биокристаллизации нуклеоида ПФ, так как это может обуславливать возможность процессов декристаллизации/рекристаллизации на отдельных участках петельной линейной ДНК-Dps в созревающих ПФ, аналогично процессам, наблюдаемым при нагревании/охлаждении ПФ. Такой обратимый процесс локальной компактизации ко-кристаллизованной ДНК-Dps – декомпактизация ДНК без Dps (Vtyurina et al., 2016), при этом, возможно, неоднократный за длительный период созревания персистеров в ПФ, может быть причиной изменения сайтов связывания ДНК-Dps и затем – топологии ДНК, аналогично показанному в модели нагревания–охлаждения ПФ. Эти события, протекающие стохастически в разных областях петельной ко-кристаллизованной ДНК-Dps и в разных клетках-персистерах, созревающих в ПФ, случайным образом прекратятся в силу наступившей витрификации цитоплазмы как последнего этапа созревания П в ПФ и приобретения ими анабиотического состояния. Это объясняет гетерогенность диссоциативного фенотипического спектра вырастающих из ПФ популяций. Важно подчеркнуть, что этот процесс был эволюционно закреплён как адаптивное свойство популяции, которая выживает в неростовых условиях в виде ПФ и сохраняет вид в результате прорастания ПФ спектром диссоциантов, свойственных этому виду (штамму).

Таким образом, впервые с использованием модели нагревания/охлаждения цистоподобных ПФ неспорообразующих бактерий определена последовательность этапов структурной организации

биокристаллического нуклеоида. Показано, что на изменение диссоциативного спектра популяции, вырастающей из прогретых/охлажденных ПФ, по сравнению с вырастающей из нативных ПФ, влияет не процесс декристаллизации (нагревание ПФ) петельной линейной ДНК-Dps, а процесс ее рекристаллизации (охлаждение ПФ) при сохранении структурированности компактизованного нуклеоида. Полученные данные подчеркивают и расширяют важную роль физико-химических процессов в структурной организации клеток бактерий, которая определяет уровень и тип их функциональной активности в соответствии с условиями окружающей среды. Биокристаллизация нуклеоида как физико-химическая консервация ко-кристаллизованной хромосомальной ДНК-Dps в кристаллическом массиве Dps-Dps обеспечивает не только стрессопротекторную защиту ДНК и супрессию ее транскрипционной функции в ПФ, но и фенотипическую гетерогенность вырастающих из ПФ популяций.

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

- Кряжевских Н.А., Демкина Е.В., Лойко Н.Г., Колганова Т.В., Соина В.С., Манучарова Н.А., Гальченко В.Ф., Эль-Регистан Г.И. Сравнение адаптационного потенциала изолятов из вечномерзлых осадочных пород *Arthrobacter oxydans* и *Acinetobacter lwoffii* и их коллекционных аналогов // Микробиология. 2013. Т. 82. С. 27–41.
- Kryazhevskikh N.A., Demkina E.V., Loiko N.G., Baslerov R.V., Kolganova T.V., Soina V.S., Manucharova N.A., Gal'chenko V.F., El'-Registan G.I. Comparison of the adaptive potential of the *Arthrobacter oxydans* and *Acinetobacter lwoffii* isolates from permafrost sedimentary rock and the analogous collection strains // Microbiology (Moscow). 2013. V. 82. P. 29–42.
- Лойко Н.Г., Козлова А.Н., Николаев Ю.А., Гапонов А.М., Тутельян А.В., Эль-Регистан Г.И. Влияние стресса на образование антибиотикотолерантных клеток *Escherichia coli* // Микробиология. 2015. Т. 84. С. 595–609.

- Loiko N.G., Kozlova A.N., Nikolaev Yu.A., Gaponov A.M., Tutel'yan A.V., El'-Registan G.I. Effect of stress on emergence of antibiotic-tolerant *Escherichia coli* cells // Microbiology (Moscow). 2015. V. 84. P. 595–609.
- Лойко Н.Г., Сузина Н.Е., Соина В.С., Смирнова Т.А., Зубашева М.В., Азизбекян Р.Р., Синицын Д.О., Терешкина К.Б., Николаев Ю.А., Крупнянский Ю.Ф., Эль-Регистан Г.И. Биокристаллические структуры в нуклеоидах стационарных и покоящихся клеток прокариот // Микробиология. 2017. Т. 86. С. 703–719.
- Loiko N.G., Suzina N.E., Soina V.S., Smirnova T.A., Zubashева M.V., Azizbekyan R.R., Sinitsyn D.O., Tereshkina K.B., Nikolaev Yu.A., Krupnyanskii Yu.F., El'-Registan G.I. Biocrystalline structures in the nucleoids of the stationary and dormant prokaryotic cells // Microbiology (Moscow). 2017. V. 86. P. 714–727.
- Мулюкин А.Л., Козлова А.Н., Сорокин В.В., Сузина Н.Е., Чердынцева Т.А., Котова И.Б., Гапоннов А.М., Тутельян А.В., Эль-Регистан Г.И. Формы выживания *Pseudomonas aeruginosa* при антибиотической обработке // Микробиология. 2015. Т. 84. С. 645–659.
- Mulyukin A.L., Kozlova A.N., Sorokin V.V., Suzina N.E., Cherdynitseva T.A., Kotova I.B., Gaponov A.M., Tutel'yan A.V., El'-Registan G.I. Surviving forms in antibiotic-treated *Pseudomonas aeruginosa* // Microbiology (Moscow). 2015. V. 84. P. 751–763.
- Мулюкин А.Л., Сузина Н.Е., Мельников В.Г., Гальченко В.Ф., Эль-Регистан Г.И. Состояние покоя и фенотипическая вариабельность у *Staphylococcus aureus* и *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* // Микробиология. 2014. Т. 83. С. 15–27.
- Mulyukin A.L., Suzina N.E., Mel'nikov V.G., Gal'chenko V.F., El'-Registan G.I. Dormant state and phenotypic variability of *Staphylococcus aureus* and *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* // Microbiology (Moscow). 2014. V. 83. P. 149–159.
- Николаев Ю.А., Лойко Н.Г., Демкина Е.В., Атрошчик Е.А., Константинов А.И., Перминова И.В., Эль-Регистан Г.И. Функциональная активность гуминовых веществ в пролонгировании выживания популяции углеводородокисляющей бактерии *Acinetobacter junii* // Микробиология. 2020. Т. 89. С. 74–87.
- Nikolaev Yu.A., Loiko N.G., Demkina E.V., Atroshchik E.A., Konstantinov A.I., Perminova I.V., El'-Registan G.I. Functional activity of humic substances in survival prolongation of populations of hydrocarbon-oxidizing bacteria *Acinetobacter junii* // Microbiology (Moscow). 2020. V. 89. P. 74–85.
- Эль-Регистан Г.И., Мулюкин А.Л., Николаев Ю.А., Сузина Н.Е., Гальченко В.Ф., Дуда В.И. Адаптогенные функции внеклеточных ауторегуляторов микроорганизмов // Микробиология. 2006. Т. 75. С. 446–456.
- El-Registan G.I., Mulyukin A.L., Nikolaev Yu.A., Suzina N.E., Gal'chenko V.F., Duda V.I. Adaptogenic functions of extracellular autoregulators of microorganisms // Microbiology (Moscow). 2006. V. 75. P. 380–389.
- Abbondanzieri E.A., Vtyurina N., Meyer A. Nucleoid reorganization by the stress response protein Dps // Biophys. J. 2014. V. 106. P. 79a.
- Albi E., Magni M.P.V. The role of intranuclear lipids // Biol. Cell. 2004. V. 96. P. 657–667.
- Antipov S.S., Tutukina M.N., Preobrazhenskaya E.V., Kondrashov F.A., Patrushev M.V., Toshchakov S.V., Dominova I., Shvyreva U.S., Vrublevskaya V.V., Morenkov O.S., Sukharicheva N.A., Panyukov V.V., Ozoline O.N. The nucleoid protein Dps binds genomic DNA of *Escherichia coli* in a non-random manner // PLoS One. 2017. V. 12. Art. e0182800.
- Azam T.A., Iwata A., Nishimura A., Ueda S., Ishihama A. Growth phase-dependent variation in protein composition of the *Escherichia coli* nucleoid // J. Bacteriol. 1999. V. 181. P. 6361–6370.
- Balaban N.Q., Helaine S., Lewis K., Ackermann M., Aldridge B., Andersson D.I., Brynildsen M.P., Bumann D., Camilli A., Collins J.J., Dehio C., Fortune S., Ghigo J.-M., Hardt W.-D., Harms A., Heinemann M., Hung D.T., Jenal U., Levin B.R., Michiels J., Storz G., Tan M.-W., Tenson T., Melder L., Zinkernagel A. Definitions and guidelines for research on antibiotic persistence // Nat. Rev. Microbiol. 2019. V. 17. P. 441–448.
- Dadinova L.A., Chesnokov Y.M., Kamyshinsky R.A., Orlov I.A., Petoukhov M.V., Mozhaev A.A., Soshinskaya E.Yu., Lazarev V.N., Manuvera V.A., Orekhov A.S., Vasiliev A.L., Shtykova E.V. Protective Dps–DNA co-crystallization in stressed cells: an *in vitro* structural study by small-angle X-ray scattering and cryo-electron tomography // FEBS Lett. 2019. V. 593. P. 1360–1371.
- Dame R.T., Rashid F.Z.M., Grainger D.C. Chromosome organization in bacteria: mechanistic insights into genome structure and function // Nature Rev. Genet. 2020. V. 21. P. 227–242.
- Espeli O., Mercier R., Boccard F. DNA dynamics vary according to macrodomain topography in the *E. coli* chromosome // Mol. Microbiol. 2008. V. 68. P. 1418–1427.
- Frenkiel-Krispin D., Ben-Avraham I., Englander J., Shimoni E., Wolf S.G., Minsky A. Nucleoid restructuring in stationary-state bacteria // Mol. Microbiol. 2004. V. 51. P. 395–405.
- Frenkiel-Krispin D., Levin-Zaidman S., Shimoni E., Wolf S.G., Wachtel E.J., Arad T., Minsky A. Regulated phase transitions of bacterial chromatin: a non-enzymatic pathway for generic DNA protection // EMBO J. 2001. V. 20. P. 1184–1191.
- Grant R.A., Filman D.J., Finkel S.E., Kolter R., Hogle J.M. The crystal structure of Dps, a ferritin homolog that binds and protects DNA // Nature Struct. Biol. 1998. V. 5. P. 294–303.
- Grosberg A.Y., Nechaev S.K., Shakhnovich E.I. The role of topological constraints in the kinetics of collapse

- of macromolecules // *J. Physique*. 1988. V. 49. P. 2095–2100.
- Karas V.O., Westerlaken I., Meyer A.S. The DNA-binding protein from starved cells (Dps) utilizes dual functions to defend cells against multiple stresses // *J. Bacteriol.* 2015. V. 197. P. 3206–3215.
- Krupyanskii Y.F., Loiko N.G., Sinitsyn D.O., Tereshkina K.B., Tereshkin E.V., Frolov I.A., Chulichkov A.L., Bokareva D.A., Mysyakina I.S., Nikolaev Y.A., El'-Registan G.I., Popov V.O., Sokolova O.S., Shaitan K.V., Popov A.N. Biocrystallization in bacterial and fungal cells and spores // *Crystallogr. Rep.* 2018. V. 63. P. 594–599.
- Krupyanskii Y.F. Determination of DNA architecture of bacteria under various types of stress, methodological approaches, problems, and solutions // *Biophys. Rev.* 2023. V. 15. P. 1035–1051.
- Melekhov V.V., Shvyreva U.S., Timchenko A.A., Tutukina M.N., Preobrazhenskaya E.V., Burkova D.V., Artiukhov V.G., Ozoline O.N., Antipov S.S. Modes of *Escherichia coli* Dps interaction with DNA as revealed by atomic force microscopy // *PLoS One*. 2015. V. 10. Art. e0126504.
- Mika J.T., Poolman B. Macromolecule diffusion and confinement in prokaryotic cells // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2011. V. 22. P. 117–126.
- Minsky A., Shimon E., Frenkiel-Krispin D. Stress, order and survival // *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 2002. V. 3. P. 50–60.
- Mourão M.A., Hakim J.B., Schnell S. Connecting the dots: the effects of macromolecular crowding on cell physiology // *Biophys. J.* 2014. V. 107. P. 2761–2766.
- Nikolaev Y.A., Loiko N.G., Galuza O.A., Mardanov A.V., Beletskii A.V., Deryabin D.G., Demkina E.V., El'-Registan G.I. Transcriptome analysis of *Escherichia coli* dormant cystlike cells // *Microbiology (Moscow)*. 2023. V. 92. P. 775–791.
- Orban K., Finkel S.E. Dps is a universally conserved dual-action DNA-binding and ferritin protein // *J. Bacteriol.* 2022. V. 204. Art. e00036–22.
- Parry B.R., Surovtsev I.V., Cabeen M.T., O'Hern C.S., Dufresne E.R., Jacobs-Wagner C. The bacterial cytoplasm has glass-like properties and is fluidized by metabolic activity // *Cell*. 2014. V. 156. P. 183–194.
- Postow L., Hardy C.D., Arsuaga J., Cozzarelli N.R. Topological domain structure of the *Escherichia coli* chromosome // *Genes Dev.* 2004. V. 18. P. 1766–1779.
- Soina V.S., Mulyukin A.L., Demkina E.V., Vorobyova E.A., El'-Registan G.I. The structure of resting microbial populations in soil and subsoil permafrost // *Astrobiology*. 2004. V. 4. P. 348–358.
- Suzina N.E., Mulyukin A.L., Dmitriev V.V., Nikolaev Yu.A., Shorokhova A.P., Bobkova Yu.S., Barinova E.S., Plakunov V.K., El'-Registan G.I., Duda V.I. The structural bases of long-term anabiosis in non-spore-forming bacteria // *J. Adv. Space Res.* 2006. V. 38. P. 1209–1219.
- Van den Bergh B., Michiels J.E., Wenseleers T., Windels E.M., Boer P.V., Kestemont D., De Meester L., Verstrepen K.J., Verstraeten N., Fauvart M., Michiels J. Frequency of antibiotic application drives rapid evolutionary adaptation of *Escherichia coli* persistence // *Nat. Microbiol.* 2016. V. 1. Art. 16020.
- Vtyurina N.N., Dulin D., Docter M.W., Meyer A.S., Dekker N.H., Abbondanzieri E.A. Hysteresis in DNA compaction by Dps is described by an Ising model // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2016. V. 113. P. 4982–4987.
- Willenbrock H., Ussery D.W. Chromatin architecture and gene expression in *Escherichia coli* // *Genome Biol.* 2004. V. 5. Art. 252.
- Zaccarelli E., Buldyrev S.V., La Nave E., Moreno A.J., Saika-Voivod I., Sciortino F., Tartaglia P. Model for reversible colloidal gelation // *Phys. Rev. Lett.* 2005. V. 94. Art. 218301.

EXPERIMENTAL ARTICLES

The Structure of the Biocrystalline Nucleoid and Its Role in the Regulation of Dissociative Phenotypic Heterogeneity of Microbial Populations

G. I. El'-Registan¹, N. E. Suzina², E.V. Demkina^{1, *}, Yu. A. Nikolaev¹

¹Winogradsky Institute of Microbiology, FRC Fundamental of Biotechnology RAS, Moscow, 119071 Russia

²Scryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms,
Pushchino Scientific Center for Biological Research RASciences, Pushchino, 142290, Russia

*e-mail: elenademkina@mail.ru

The survival of the microbial population in constantly changing environmental conditions, including those unfavorable for growth, is ensured by: (1) the formation of a subpopulation of persister cells (P), maturing into ametabolic quiescent forms (RF); (2) protection of chromosomal DNA of stationary cells using the physicochemical mechanism of its co-crystallization with the nucleoid-associated

protein Dps and the formation of a biocrystalline nucleoid (BN); (3) the ability of RF to germinate in a fresh environment with a mixed population of phenotypically different dissociators, one of which will be the most adaptive to it. This study addressed two questions: (1) how BN is structurally organized in prokaryotic RFs, and (2) how nucleoid biocrystallization is related to the phenotypic heterogeneity of populations growing from RFs. The work proposes a new model of BN decrystallization/recrystallization during heating/cooling of RF at sublethal temperatures in a non-growth environment, which reproduces the dynamics of BN formation in the model of nucleoid organization as a folded globule. Electron microscopic analysis of structural changes in BN in heated/cooled RFs, together with the determination of the dissociative spectra of the populations growing from them, allowed us to obtain the following new information. Biocrystallization of the nucleoid occurs in the following sequence: (1) the beginning co-crystallization of DNA-Dps is accompanied by the division of the nucleoid volume with the formation of a compacted nucleoid from superfolded DNA in the central region of the cell and loops of superfolded linear DNA extending from it; (2) co-crystallization of looped DNA-Dps with its different geometric arrangement – toroidal, lamellar, etc.; (3) crystallization of Dps-Dps, repeating the template folding of looped DNA-Dps and the formation of a multilayer structure of the Dps-Dps crystalline array. It was found that the actual heating of the PF (45–700C, 15 min), leading to decrystallization of looped DNA-Dps while maintaining the structure of the compacted nucleoid, does not affect the dissociative (colonial-morphological) spectrum of the population growing from the PF. The change in its dissociative spectrum is influenced by the process of DNA-Dps recrystallization, during which, apparently, Dps binds not only to the former, but also to other DNA sites, also affinity for Dps and, possibly, partially occupied by other nucleoid-associated proteins, which influences changes in DNA topology and its transcription.

Keywords: biocrystalline nucleoid, structure, bacteria, resting forms (RF), de/recrystallization of DNA-Dps, heating/cooling of RF, phenotypic heterogeneity of populations

УДК 57.016.4:577.181.5

МОДУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ АЗИТРОМИЦИНА В ОТНОШЕНИИ МОНОВИДОВЫХ И БИНАРНЫХ БИОПЛЕНОК *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* И *KYTOCOCCUS SCHROETERI* ГОРМОНОМ НОРАДРЕНАЛИНОМ¹

© 2024 г. Е. В. Дювенжи^а, И. Д. Соловьев^а, М. В. Сухачева^а, Е. Д. Невolina^а,
М. А. Овчарова^а, Н. А. Логинова^а, А. М. Мосолова^а, С. В. Мартьянов^а,
В. К. Плакунов^а, А. В. Ганнесен^{а,*}

^аФИЦ “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071, Россия

*e-mail: andrei.gannesen@gmail.com

Поступила в редакцию 13.05.2024 г.

После доработки 03.06.2024 г.

Принята к публикации 05.06.2024 г.

Исследовано действие норадреналина как вещества-модулятора активности антибиотика азитромицина в отношении моновидовых и бинарных биопленок представителей микробиоты человека *Staphylococcus aureus* и *Kytococcus schroeteri* в различных модельных системах. Показано, что гормон в концентрации 3.55 мкМ, в зависимости от системы культивирования и времени инкубации, способен как усиливать, так и ослаблять эффекты от действия азитромицина в субингибиторных концентрациях (0.001 и 4 мкг/мл). В случае быстро сформированных биопленок норадреналин ослабляет ингибирующее действие антибиотика, тогда как при наличии полной стадии адгезии, напротив, гормон усиливает ингибиторный эффект антибиотика. Не менее важным является фактор взаимодействия двух микроорганизмов в сообществе, поскольку присутствие *K. schroeteri* в сообществе изменяет эффект от действия 4 мкг/мл азитромицина в комбинации с норадреналином на *S. aureus*. Показано, что азитромицин и норадреналин, а также их комбинации способны менять экспрессию генов устойчивости не только к макролидам (повышение экспрессии гена *mx* сочетанием 4 мкг/мл азитромицина и 3.55 мкМ норадреналина), но и к фторхинолонам (понижение экспрессии гена *arlR* и повышение — *mdtK*).

Ключевые слова: норадреналин, азитромицин, биопленки, мультивидовые биопленки, микробная эндокринология, *Staphylococcus aureus*, *Kytococcus schroeteri*, устойчивость к антибиотикам, конфокальная микроскопия, экспрессия генов

DOI: 10.31857/S0026365624060058

Грамположительные кокки *Staphylococcus aureus* (филум *Firmicutes*) и *Kytococcus schroeteri* (филум *Actinobacteria*) входят в состав микробиоты кожи человека. *S. aureus* — условно-патогенная бактерия, в определенных случаях вызывающая целый ряд заболеваний, начиная с относительно “легких” кожных инфекций (акне вулгарис, импетиго, фурункулеза, флегмоны), до смертельно опасных (пневмонии, менингита, остеомиелита, эндокардита, инфекционно-токсического шока и сепсиса) (Tong et al., 2015). Многие штаммы *S. aureus* устойчивы к антибиотикам. Наибольшую опасность представляют собой метициллинрезистентные штаммы *S. aureus* (meticillin-resistant *S. aureus*, MRSA),

устойчивые к бета-лактамам (благодаря наличию лактамаз) и к ряду других антибиотиков (Green et al., 2012). Ситуация значительно усугубляется, если *S. aureus* формирует биопленки в очагах инфекций. В составе биопленок микроорганизмы становятся еще более устойчивыми к антимикробным веществам, и борьба с биопленочными инфекциями является одной из наиболее острых в клинической практике (Sauer et al., 2022).

K. schroeteri является частью нормальной микробиоты кожи человека, и в целом не представляет такой опасности для здоровья человека, как золотистый стафилококк. Тем не менее зарегистрировано достаточное количество клинических

¹Дополнительные материалы размещены в электронном виде по DOI статьи: <https://doi.org/10.31857/S0026365624060058>

случаев эндокардита после имплантации искусственного клапана или шунта в сердце (Aepinus et al., 2008; Yousri et al., 2010; Schaumburg et al., 2013). Также сообщалось, что *K. shroeteri* обладает устойчивостью к пенициллину G, оксациллину, эритромицину (Becker et al., 2002). Способность данных микроорганизмов образовывать биопленки, а также полученные ранее результаты о межвидовых взаимодействиях в составе биопленки (Дювенжи и соавт., 2022) делают их интересным объектом для изучения устойчивости бактериальных биопленочных сообществ к антибиотикам.

Около 80% всех хронических заболеваний вызываются биопленками патогенных микроорганизмов (Sharma et al., 2019). Микробные клетки в биопленках обладают в 10–1000 раз большей устойчивостью к антимикробным веществам, чем в составе жидких суспензионных (планктонных) культур (Mah, 2012). В биопленочных сообществах устойчивость к антибиотикам возникает благодаря различным факторам, таким как измененный фенотип и метаболизм клеток, медленное или неполное проникновение антибиотиков в биопленку из-за барьерной функции внеклеточного полимерного матрикса (физической или химической), наличия клеток-персистеров и др. (Плакунов и соавт., 2010; Lewis, 2010). Также устойчивость биопленок к биоцидам может быть следствием совокупных защитных свойств микроорганизмов в составе многовидовых биопленок, когда более устойчивые виды защищают от биоцида менее устойчивые (Плакунов и соавт., 2019). Все вышеперечисленное затрудняет лечение инфекций при помощи классической химиотерапии антибиотиками. Кроме того, серьезными проблемами являются неправильное употребление антибиотиков и недостаточный контроль за их оборотом, вследствие чего лекарственные вещества попадают в организм зачастую в недостаточной концентрации. Кроме того, антибиотики часто попадают в окружающую среду (Chow et al., 2021). Известно, что антибиотики в субингибиторных концентрациях способствуют не только развитию устойчивости у микроорганизмов (Chow et al., 2021), но могут стимулировать рост биопленок и повышать их вирулентность (Ranieri et al., 2018). Следовательно, помимо контроля за употреблением антибиотиков, а также для преодоления лекарственной устойчивости микроорганизмов и для купирования возможных негативных эффектов неправильного применения антибиотиков необходимы новые подходы и стратегии лечения. Одним из перспективных подходов к решению данной проблемы является комбинированная терапия — применение антибиотиков в сочетании с другими активными соединениями, усиливающими (или дополняющими) их действие. Такими соединениями могут быть гормоны человека.

Микробная эндокринология (Lyte, 2013) — относительно новое междисциплинарное направление

исследований, изучающее взаимосвязи организма человека и его микробиоты на уровне сигнальных молекул — факторов гуморальной регуляции. Разрозненные, но достаточно многочисленные данные, накопленные к настоящему времени, позволяют утверждать универсальность явления регуляции моновидовых биопленок и микробных сообществ гормонами человека. Такие данные получены для стероидов (Hosoda et al., 2011; Clabaut et al., 2021), натрийуретических пептидов (Veron et al., 2007; Louis et al., 2022), нейропептидов (N'diaye et al., 2016) и катехоламинов (Cambronel et al., 2019). Последние являются наиболее изученным классом гормонов с точки зрения микробной эндокринологии. Говоря об объектах настоящего исследования, стоит отметить, что ранее было показано дозозависимое ингибирующее действие на биопленки *K. shroeteri* — наибольшее подавление роста наблюдалось при более высоких концентрациях гормона относительно нормального уровня в плазме крови (Данилова и соавт., 2021).

На основе этих данных, а также с учетом актуальности темы комбинированной терапии, целью данной работы было исследование модулирующего действия норадреналина на активность широко используемого полусинтетического макролидного антибиотика — азитромицина — в отношении моновидовых и мультивидовых биопленок *K. shroeteri* и *S. aureus*. Учитывая вышеизложенные факты, действие азитромицина на микроорганизмы исследовали в субингибиторных концентрациях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Микроорганизмы и их культивирование. В работе использовали штаммы бактерий *S. aureus* 209P и *K. schroeteri* H01, полученные из коллекции лаборатории выживаемости микроорганизмов ФИЦ Биотехнологии РАН. Культивирование производили аэробно на обогащенной клостридиальной среде (reinforced clostridial medium, RCM) (Данилова и соавт., 2021). Для получения моновидовых культур и биопленок ОП₅₄₀ суспензий доводили до 0.5 ед. физиологическим раствором (0.9% NaCl) (“Диа-М”, Москва, Россия) в дистиллированной воде. Для получения бинарных культур и биопленок ОП₅₄₀ обеих бактериальных суспензий доводили до 1.0 ед., затем суспензии смешивали в соотношении 1 : 1.

Активные соединения. В работе использовали азитромицин в форме препарата Сумамед (“Teva”, Хорватия). Исходный раствор азитромицина готовили в 96% этаноле и хранили при температуре –20°C. Для получения требуемых тестовых концентраций исходный раствор азитромицина (50 мг/мл) разбавляли стерильной средой RCM

до необходимой концентрации — 0.001 и 4 мкг/мл. Норадреналин (“Merck”, Германия) разводили в стерильной воде MilliQ до концентрации 3.55 ммоль (MQ) и хранили при температуре –20°C. Перед экспериментом проводили серию разведений в стерильной MQ-воде в зависимости от необходимой концентрации. В работе использовали концентрацию 3.55 мкмоль согласно результатам предыдущего исследования (Данилова и соавт., 2021).

Выращивание моновидовых культур и биопленок на тефлоновых кубиках. Биопленки и планктонные культуры получали, как описано ранее (Дювенжи и соавт., 2022). Микроорганизмы выращивали на среде RCM. Комбинации норадреналина и азитромицина в подобранных ранее концентрациях (Дювенжи и соавт., 2022) исследовали в сравнении с контрольными образцами и с образцами с добавлением действующих веществ. Культивирование производили в течение 24, 48 и 72 ч аэробно.

Выращивание биопленок на стекловолоконных фильтрах. Стекловолоконные фильтры марки Whatman GF/F (“Merck”, Германия) диаметром 21 мм использовали в двух разных модельных системах, как описано ранее (Дювенжи и соавт., 2022). В первой модельной системе биопленки выращивали на фильтрах в жидкой среде RCM с добавлением активных веществ (стадия обратимой адгезии не редуцирована во времени). Во второй модельной системе фильтры помещали на поверхность агаризованной среды RCM (редуцирована во времени стадия обратимой адгезии). Культивирование производили в течение 24, 48 и 72 ч в аэробных условиях.

По истечении срока инкубации один фильтр с биопленкой использовали для определения метаболической активности клеток, второй — для определения количества колониеобразующих единиц и анализа агрегации клеток.

Определение метаболической активности клеток. Метаболическую активность клеток в составе биопленок определяли косвенно методом окрашивания 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромидом (МТТ), как описано ранее (Плакунов и соавт., 2016). МТТ, восстанавливаясь за счет переносчиков электронов ЭТЦ в клетках, превращается в нерастворимое окрашенное в синий цвет вещество — формазан. Формазан экстрагировали диметилсульфоксидом и измеряли оптическую плотность экстрактов при $\lambda = 540$ нм.

Определение числа КОЕ. Диспергирование биопленок проводили методом, описанным ранее (Ovcharova et al., 2021). Чашки с агаризованной средой RCM, на которых рассеивали суспензии, инкубировали 48 ч при 37°C для более быстрого роста колоний, после чего производили подсчет КОЕ и расчет количества клеток в биопленке на фильтре.

Оценка агрегации клеток. Оценку агрегации клеток в составе биопленок проводили с помощью световой микроскопии фиксированных образцов суспендированных биопленок на фильтрах, как описано ранее (Ovcharova et al., 2021). Рассчитывали размер агрегатов и процентное соотношение числа агрегатов и одиночных клеток.

Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия (КЛСМ) биопленок, выращенных в жидкой среде в планшетах со стеклянным дном. Биопленки исследуемых микроорганизмов выращивали в 24-луночных планшетах (“Eppendorf”, Германия) с плоским стеклянным дном, как описано ранее (Coenye et al., 2007; Diuvenji et al., 2023) в течение 24 и 48 ч. Для *S. aureus* использовали зонд 5'-GAA-GCA-AGC-TTC-TCG-TCC-G-3' (“Синтол”, Москва, Россия), меченый родамином R6G для флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH). Все образцы дополнительно окрашивали SYTO9 Green (“Thermo”, США) в течение 15 мин. Затем аккуратно отмывали от красителя с помощью физраствора и покрывали фиксирующей жидкостью ProLongTM Gold Antifade mountant (“ThermoFisher”, США). Анализ образцов и получение 3D-изображений проводили с использованием микроскопа Nikon TE2000-U (“Nikon”, Токио, Япония) с иммерсионным масляным объективом Nikon 100× 1.3NA S Fluo и сканирующей конфокальной системой Becker&Hickl DCS-120 для получения изображений. Полученные файлы OME-TIFF анализировали с использованием плагина Comstat2 (“TDU”, Копенгаген, Дания) (Heydorn et al., 2000) в программном пакете ImageJ (NIH, Bethesda, Мэриленд, США). Определяли среднюю плотность биомассы на единицу площади (мкм³/мкм²). Трехмерные изображения получали из z-стеков OME-TIFF с использованием плагина Volume Viewer 2.0 в ImageJ.

Количественная ПЦР. Анализ генов устойчивости к антибиотикам у *K. schroeteri* и *S. aureus* проводили с помощью алгоритма CARD (The comprehensive antibiotic resistance database). Праймеры для ПЦР подбирались с помощью инструмента primer-BLAST NCBI (NIH, США) (таблица; дополнительные материалы). Все праймеры проверяли на возможность формирования вторичных структур в виде шпикл в программе Oligo (“Molecular Biology Insights”, США). Выделение РНК, проверку праймеров и количественную ПЦР проводили по стандартным протоколам, описанным ранее (Diuvenji et al., 2023).

Статистическая обработка. Эксперименты проводили минимум в трех независимых повторах. Данные обрабатывали с помощью программного пакета GraphPad Prism 8.3.0. На графиках отмечали медианные значения с разбросом от максимального к минимальному либо среднее с разбросом, равным стандартной ошибке среднего в зависимости

Таблица. Эффект от добавления 3.55 мкМ норадреналина в среду, содержащую азитромицин в концентрациях 0.001 мкг/мл или 4 мкг/мл, на рост и агрегацию клеток в моновиовых и бинарных биопленках *K. schroeteri* и *S. aureus*

Биопленка	Время, ч	Концентрация азитромицина, мкг/мл	Эффект от добавления 3.55 мкМ норадреналина на действие азитромицина					
			На плотной среде		На жидкой среде			
			КОЕ	Агрегация (размер и доля)	ОП планктонных культур/экстрактов КФ	КОЕ	Агрегация (размер и доля)	КЛСМ (плотность биомассы биопленок, мкм ³ /мкм ²)
<i>K. schroeteri</i>	24	0.001	Н/Э	О/И	С	Н/Э	О/С	Н/Э
		4	У/И	Н/Э	Н/Э	Н/Э	Н/Э	Н/Э
	48	0.001	Н/Э	Н/Э	Н/Э	Н/Э	О/И	Н/Э
		4	О/И	Н/Э	У/И	Н/Э	У/И	У/И
	72	0.001	С	С	Н/Э	Н/Э	О/И	Н/Д
		4	Н/Э	О/И размера, И доли	Н/Э	У/И	У/И	Н/Д
<i>S. aureus</i>	24	0.001	Н/Э	С	Н/Э	Н/Э	Н/Э	С
		4	Н/Э	О/И размера, С доли	Н/Э	Н/Э	Н/Э	У/И
	48	0.001	Н/Э	У/И размера, С доли	И	У/И	Н/Э	Н/Э
		4	Н/Э	Н/Э	О/И	Н/Э	Н/Э	У/И
	72	0.001	Н/Э	У/И размера, С доли	Н/Э	Н/Э	Н/Э	Н/Д
		4	Н/Э	Н/Э	Н/Э	Н/Э	Н/Э	Н/Д
Бинарное сообщество	24	0.001	Н/Э	С	Н/Д	Н/Э	Н/Э	Н/Э
		4	Н/Э	С	Н/Д	Н/Э	Н/Э	Н/Э
	48	0.001	У/С	О/С	Н/Д	У/И	Н/Э	Н/Э
		4	Н/Э	Н/Э	Н/Д	Н/Э	Н/Э	У/И
	72	0.001	Н/Э	У/С	Н/Д	Н/Э	О/С	Н/Д
		4	У/С	У/С	Н/Д	Н/Э	Н/Э	Н/Д

Условные обозначения: И – ингибирование, О/И – ослабление ингибирования, У/И – усиление ингибирования, С – стимуляция, О/С – ослабление стимуляции, У/С – усиление стимуляции, Н/Э – нет эффекта, Н/Д – нет данных

от необходимости. Для определения значимости различий использовали множественный *t*-критерий в программе GraphPad.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние комбинаций азитромицина и норадреналина на моновиовые планктонные культуры и биопленки на тефлоновых кубиках

В работе использовали субингибиторные концентрации азитромицина 0.001 и 4 мкг/мл, подобранные ранее (Diuvenji et al., 2023). Было

обнаружено, что влияние комбинаций норадреналина и азитромицина на рост планктонных культур и биопленок зависел от времени культивирования и концентрации антибиотика. Было показано, что добавление норадреналина в среду с 4 мкг/мл азитромицина усиливало ингибирующее действие азитромицина на планктонные культуры *K. schroeteri*. Условная оптическая плотность (ОП) суспензии планктонных клеток снижалась, ее относительный показатель составлял 22.8% от контроля, в то время как при действии одного антибиотика он составлял 77.9% (рис. 1а). Добавление норадреналина к антибиотику также усиливало его ингибирующее действие в отношении биопленок

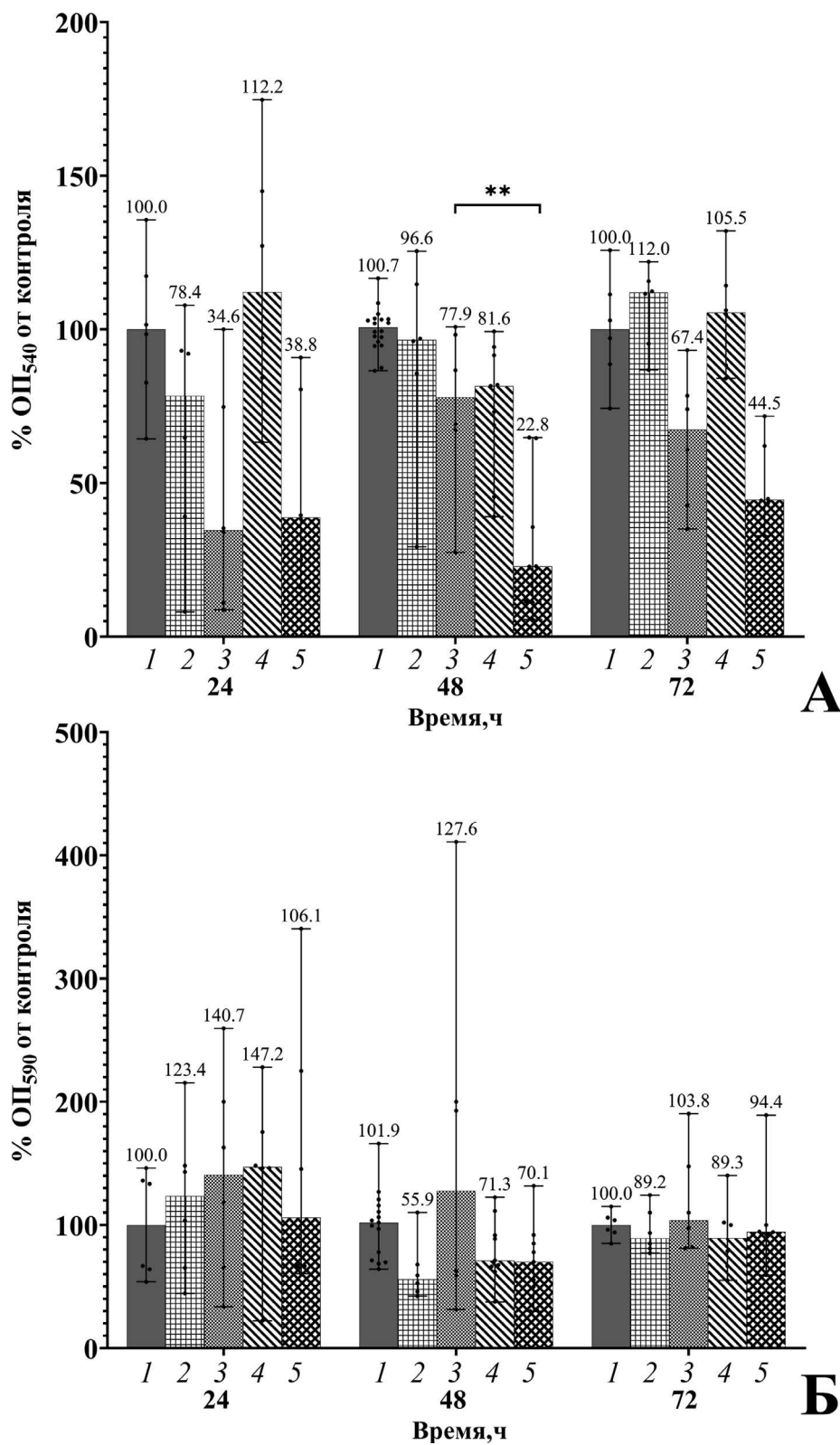


Рис. 1. Влияние комбинации азитромицина и норадреналина на рост планктонных культур (а) и биопленок (б) *K. Schroeteri*: 1 – контроль; 2 – азитромицин 0.001 мкг/мл; 3 – азитромицин 4 мкг/мл; 4 – сочетание норадреналина 3.55 мкМ и азитромицина 0.001 мкг/мл; 5 – сочетание норадреналина 3.55 мкМ и азитромицина 4 мкг/мл. ** – различие достоверно при $p < 0.01$.

после 48 ч инкубации (рис. 16), однако статистически значимым этот эффект не был.

На моновидовые планктонные культуры *S. aureus* азитромицин в концентрации 4 мкг/мл в среде также оказывал ингибиторный эффект (рис. 2а), показатель плотности биомассы суспензии не превышал 11% (после 48 ч инкубации). В концентрации 0.001 мкг/мл азитромицин не оказывал значимого эффекта, однако при добавлении норадреналина к антибиотику после 48 ч инкубации появлялся ингибирующий эффект — показатель ОП планктонных культур понижался на 11% — до 89% от ОП контроля.

Интересно, что норадреналин значимо ослаблял подавляющее действие 4 мкг/мл азитромицина в среде после 48 ч инкубации: при сочетании активных веществ показатель ОП суспензии планктонных клеток составлял 79% относительно ОП контроля (в присутствии одного антибиотика — всего 11% от ОП контроля). Подобного эффекта не наблюдали после 24 и 72 ч инкубации. Если говорить о биопленках *S. aureus*, стоит отметить, что гормон значимо усиливал действие азитромицина в концентрации 0.001 мкг/мл (рис. 2б): показатель ОП экстрактов КФ из образцов с сочетанием активных веществ составлял 60.5% от ОП экстрактов из контроля, тогда как в присутствии одного антибиотика — 93%. В отношении биопленок также наблюдали тенденцию к ослаблению ингибирующего действия 4 мкг/мл азитромицина в присутствии норадреналина, однако данное различие не было статистически значимым.

Таким образом, добавление в среду норадреналина может модулировать действие азитромицина на планктонные культуры и моновидовые биопленки *K. schroeteri* и *S. aureus*. Показано, что этот эффект зависит от времени культивирования (наибольшие эффекты при 48 ч) и концентрации антибиотика (при концентрации азитромицина 0.001 мкг/мл норадреналин усиливал ингибирующее действие, в то время как при концентрации 4 мкг/мл — ослаблял).

Определение числа КОЕ в моновидовых и бинарных биопленках

В данных экспериментах подсчитывали количество КОЕ в биопленке на фильтре. Дополнительно исследовали количество КОЕ в присутствии норадреналина через 48 ч инкубации.

Биопленки на плотной среде (система с редуцированной во времени стадией первичной адгезии). Количество КОЕ в моновидовых биопленках *K. schroeteri*, выращенных на агаризованной среде RCM, через 24 ч составило 1.13×10^8 (дополнительные материалы, рис. S1A). В присутствии азитромицина в концентрации 4 мкг/мл число

КОЕ снижалось до 5.7×10^6 . Добавление норадреналина к антибиотику в концентрации 4 мкг/мл снижало число КОЕ еще сильнее — до 2.75×10^5 . Через 48 ч инкубации добавление гормона вместе с антибиотиком в среду вело к ослаблению ингибирующего действия азитромицина в концентрации 4 мкг/мл: число КОЕ составляло 6.5×10^7 против 2×10^6 в образцах с одним антибиотиком (рис. S1A). Через 72 ч инкубации значимый эффект наблюдали только в образцах с норадреналином в сочетании с 0.001 мкг/мл азитромицина. Сочетание веществ оказывало стимулирующее действие на моновидовые биопленки китококков. Число КОЕ увеличивалось в данном случае до 1.7×10^9 против 1×10^9 в контроле и 8×10^8 в образцах с антибиотиком (рис. S1A).

В случае *S. aureus*, выращенных на агаризованной среде, азитромицин в концентрации 4 мкг/мл оказывал сильное ингибирующее действие на биопленки, особенно выраженное после 72 ч инкубации. В свою очередь, добавление норадреналина не приводило к сколь-либо значимому изменению числа КОЕ.

В бинарном сообществе, ввиду особенностей роста *K. schroeteri*, определяли только КОЕ *S. aureus*. Как и в случае с моновидовыми биопленками, азитромицин в концентрации 4 мкг/мл понижал число КОЕ *S. aureus* в бинарных сообществах (рис. S1D). Однако после 48 и 72 ч инкубации (рис. S1D) сочетания гормона и антибиотика приводили к ослаблению ингибирующего эффекта азитромицина. Влияние норадреналина и азитромицина в концентрации 0.001 мкг/мл, напротив, оказывало стимулирующее действие на биопленки, и число КОЕ увеличивалось до 1.14×10^{10} против 5.25×10^9 в контроле и 4.07×10^9 в образцах с одним антибиотиком.

Через 72 ч инкубации норадреналин снимал ингибирующее действие азитромицина в концентрации 4 мкг/мл и даже оказывал стимулирующее действие: число КОЕ увеличивалось до 5.15×10^9 против 3.15×10^9 в контроле и 3.25×10^7 в образцах с 4 мкг/мл азитромицина в среде.

Таким образом, в зависимости от времени культивирования норадреналин в данной системе ослаблял подавляющее действие азитромицина, максимальное проявление данного эффекта наблюдалось в бинарных биопленках.

Биопленки в жидкой среде (система с полной стадией первичной адгезии). Количество КОЕ в моновидовых биопленках *K. schroeteri*, выращенной в жидкой среде RCM, через 24 ч инкубации составляло 9.3×10^5 (рис. S1B). Азитромицин в концентрации 4 мкг/мл оказывал ингибирующее действие на рост биопленок, и число КОЕ снижалось до 3.4×10^5 (рис. S1B). Добавление норадреналина приводило к усилению ингибирующего действия антибиотика и снижению числа КОЕ до 2.1×10^4 .

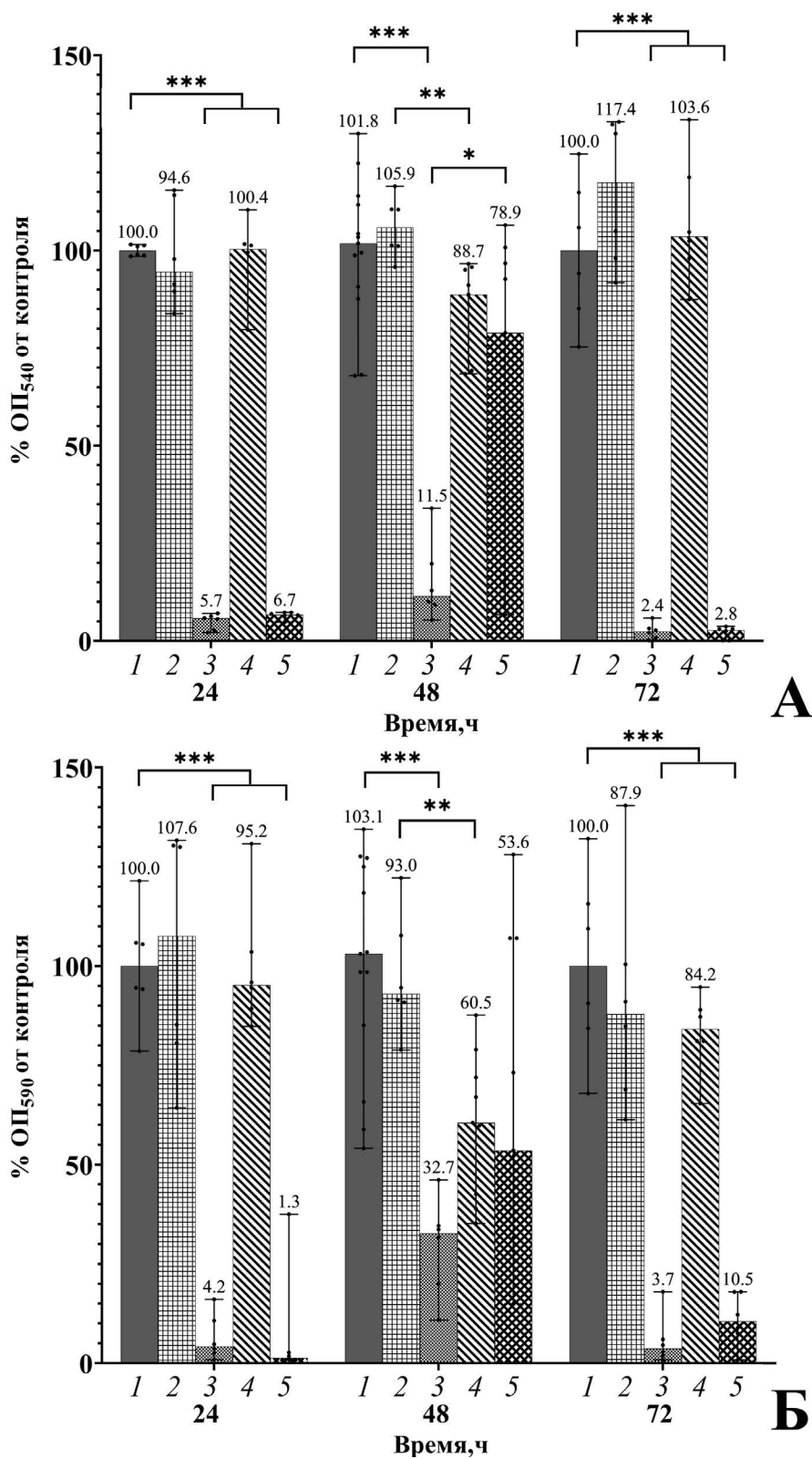


Рис. 2. Влияние комбинации азитромицина и норадреналина на рост планктонных культур (а) и биопленок (б) *S. aureus*: 1 – контроль; 2 – азитромицин 0.001 мкг/мл; 3 – азитромицин 4 мкг/мл; 4 – сочетание норадреналина 3.55 мкМ и азитромицина 0.001 мкг/мл; 5 – сочетание норадреналина 3.55 мкМ и азитромицина 4 мкг/мл. * – различие достоверно при $p < 0.05$; ** – различие достоверно при $p < 0.01$; *** – различие достоверно при $p < 0.005$.

Азитромицин в концентрации 0.001 мкг/мл также оказывал ингибирующее действие на биопленку *K. schroeteri*, и показатели КОЕ снижались до 3.8×10^4 против 2×10^6 в контроле через 48 ч инкубации. Однако добавление норадреналина, напротив, вызывало стимулирующее действие, и число КОЕ возрастало до 6.7×10^8 по сравнению с 4.4×10^8 в образце с одним антибиотиком.

В моновиовых биопленках *S. aureus* азитромицин в концентрации 0.001 мкг/мл (рис. S1Г) оказывал ингибирующее действие, и добавление гормона через 24 ч ослабляло этот эффект. Число КОЕ в присутствии норадреналина увеличивалось до 7.9×10^8 против 5.3×10^8 в образце с одним антибиотиком. На вторые сутки инкубации наблюдали такой же эффект. Число КОЕ увеличивалось до 1.4×10^8 , в то время как в образце с одним антибиотиком число КОЕ составляло 4.4×10^7 , а в контроле — 1.6×10^8 КОЕ на биопленку.

В бинарном сообществе *K. schroeteri* и *S. aureus* через 24 ч инкубации норадреналин снимал стимулирующее действие азитромицина в концентрации 0.001 мкг/мл (дополнительные материалы, рис. S1Е). Число КОЕ при сочетании гормона и азитромицина снижалось до 6.3×10^8 , когда в присутствии только антибиотика оно составляло 8.5×10^8 . На третьи сутки инкубации гормон также снимал стимулирующий эффект азитромицина в концентрации 0.001 мкг/мл и даже понижал число КОЕ в бинарной биопленке. При добавлении норадреналина показатели снижались до 1.2×10^8 против 3.6×10^8 в контроле и 8.4×10^8 в контроле с антибиотиком.

Таким образом, норадреналин модулировал влияние азитромицина на число КОЕ в моновиовых и бинарных биопленках. Однако данный эффект зависел от системы культивирования и времени инкубации. Так, в биопленках *K. schroeteri*, культивируемых на плотной среде, норадреналин на ранних стадиях роста усиливал ингибирующее действие азитромицина, тогда как после 48 и 72 ч инкубации добавление гормона ослабляло ингибирующий эффект антибиотика. В моновиовых биопленках *S. aureus*, культивируемых на плотной среде, эффекта от добавления гормона не наблюдали, тогда как в бинарных биопленках число КОЕ на поздних стадиях роста увеличивалось. В жидкой среде, напротив, и в моновиовых, и в бинарных биопленках добавление гормона усиливало ингибирующее действие азитромицина. Вероятно, характер адгезии, а также сосуществование двух организмов в одной биопленке влияет на механизм модулирующего действия норадреналина в отношении азитромицина в субингибиторных концентрациях, что подтверждает данные предыдущих исследований (Дювенжи и соавт., 2022; Diuvenji et al., 2023).

Исследование метаболической активности моновиовых и бинарных биопленок

Статистически значимого влияния активных соединений на метаболическую активность моновиовых и бинарных биопленок не наблюдалось (рис. S2). Исключение составляли биопленки стафилококков, метаболическая активность которых подавлялась в присутствии 4 мкг/мл азитромицина (рис. S2В).

Исследование агрегации клеток в биопленках

Подсчет КОЕ при изучении биопленок может не всегда давать точные результаты. Даже после диспергирования в суспензии может оставаться некоторое количество агрегатов, которые будут искажать данные, т.к. количество клеток в агрегате методом подсчета КОЕ учесть невозможно. Поэтому результаты, полученные методом подсчета КОЕ, следует уточнять методами анализа агрегации, например, при помощи световой микроскопии.

Исследование агрегации клеток в биопленках, выращенных на плотной среде. Агрегаты клеток в моновиовых биопленках *K. schroeteri*, выращенных на поверхности плотной среды, были самыми крупными среди трех типов биопленок (рис. S3). В процессе культивирования по мере созревания биопленок размеры агрегатов китококков увеличивались и составляли в контрольных образцах около 30 клеток на агрегат через 72 ч инкубации (после 24 и 48 ч — 14 и 18 клеток соответственно; рис. S3А, S3В, S3Д). Действие азитромицина приводило к снижению размера агрегатов клеток в биопленках китококков, причем сильнее всего — в 72-часовых биопленках (рис. S3Д). Добавление норадреналина ослабляло действие азитромицина, причем этот эффект был замечен уже после 24 и 72 ч инкубации. В зрелых бинарных биопленках (рис. S3Д) сочетание 0.001 мкг/мл азитромицина и норадреналина приводило не только к снятию ингибирования, но даже к увеличению размеров агрегатов с 19 до 47 клеток.

Следует отметить, что степень агрегации в моновиовых биопленках *K. schroeteri* была выше, чем в других исследованных биопленках. Максимальное количество агрегатов обнаружено через 24 ч инкубации и составляло 71% от совокупного количества агрегатов и одиночных клеток, наблюдавшихся в поле зрения (рис. S3Б), тогда как через 72 ч инкубации число агрегатов снижалось до 63% (рис. S3Е). В моновиовых биопленках *S. aureus* относительное количество агрегатов было максимальным через 48 ч и составляло 56% (рис. S3Г).

Азитромицин в концентрации 4 мкг/мл снижал агрегацию клеток в биопленках, однако добавление в среду норадреналина, как правило, снимало

данный эффект антибиотика. Похожее действие норадrenalина в сочетании с 0.001 мкг/мл азитромицина в биопленках *K. schroeteri* оказывал через 72 ч инкубации и в бинарных сообществах через 48 ч инкубации (рис. S3Б, S3Е). В бинарном сообществе антибиотик в концентрации 4 мкг/мл увеличивал долю агрегатов во всех временных точках, и добавление в среду гормона не оказывало значимого эффекта (рис. S3Е).

Исследование агрегации клеток в биопленках, выращенных в жидкой среде. В биопленках, выращенных в жидкой среде RCM, в целом повторялись закономерности, наблюдавшиеся в биопленках на плотной среде (рис. S4). При этом размер агрегатов был значительно меньше. Максимальный размер агрегатов в моновиовых биопленках *K. schroeteri* наблюдался через 48 ч инкубации и составлял в среднем около 7 клеток на агрегат (рис. S4А). В случае *S. aureus* максимальный размер агрегатов приходился на первые сутки и составлял 3.3 клетки, тогда как через 48 и 72 ч наблюдался их частичный или полный распад (рис. S4В). Доля агрегатов в моновиовых биопленках *S. aureus* в присутствии 0.001 мкг/мл азитромицина в сочетании с норадrenalином уменьшалась через 24 ч инкубации, и их количество составляло 24% против 38% в образцах без норадrenalина (рис. S4Б). Однако через 72 ч инкубации наблюдали обратный эффект, и относительное количество агрегатов увеличивалась до 25% против 16% (рис. S4Е).

В бинарных сообществах в жидкой среде азитромицин (в обеих концентрациях), как и в предыдущем опыте, увеличивал размер агрегатов, особенно в концентрации 4 мкг/мл (минимум в два раза). Влияния норадrenalина после 24 и 48 ч инкубации обнаружено не было. Только через 72 ч наблюдали некоторый модулирующий эффект норадrenalина: если 0.001 мкг/мл азитромицина в среде приводило к увеличению размера агрегатов с 2.6 до 3.7 клеток, то добавление гормона снимало этот эффект (рис. S4Е). Сочетание гормона с антибиотиком в концентрации 4 мкг/мл, напротив, увеличивало размер агрегатов клеток (типовые фото всех образцов представлены на рис. S5–S10).

Таким образом, действие активных соединений на моновиовые и бинарные биопленки, выращенные в различных системах, различалось при сравнении числа КОЕ и степени агрегации клеток. Так, в системе с редуцированной во времени стадией обратимой адгезии (на плотной среде) добавление норадrenalина к азитромицину, как правило, приводило к усилению роста клеточной биомассы и степени агрегации клеток. Напротив, в системе, где биопленка формировалась с обратной стадией первичной адгезии (в жидкой среде) добавление гормона, как правило, снижало рост биомассы, что выражалось в меньшем числе КОЕ

и в меньшем или не изменившемся размере агрегатов (таблица). Вероятно, характер адгезии при формировании биопленки влияет на действие как антибиотика, так и гормона.

КЛСМ биопленок, выращенных в жидкой среде в планшетах со стеклянным дном

Для уточнения количественного соотношения клеточной биомассы *K. schroeteri* и *S. aureus* в бинарной биопленке использовали метод КЛСМ. Исследование проводили, рассчитывая параметр плотности биомассы биопленок каждого микроорганизма (отношение объем детектируемой биомассы в поле зрения к площади поля зрения).

Поскольку моновиовые биопленки *S. aureus* и бинарные сообщества окрашивались зеленым красителем SYTO9 и красным красителем R6G, вначале рассчитывали коэффициент, представляющий отношение сигнала от *S. aureus*, окрашенного SYTO9, к сигналу от *S. aureus*, окрашенного R6G в моновиовых биопленках. Данный коэффициент использовали для расчетов долей биомассы стафилококка и китоккокка в бинарных сообществах (Diuvenji et al., 2023, трехмерная визуализация биопленок представлена на рис. S12–S17).

Структуру и показатель плотности биомассы (рассчитанного по детектируемому сигналу объема биомассы на единицу площади поля зрения) моновиовых и бинарных биопленок *K. schroeteri* и *S. aureus* в присутствии активных соединений исследовали с помощью анализа трехмерных изображений, полученных в ходе КЛСМ.

Через 24 ч инкубации плотность биомассы моновиовых биопленок *K. schroeteri* (рис. S11А, S12А, S12Б) и бинарных сообществ (рис. S11А, S143) значимо не изменялась ни в присутствии азитромицина (4 мкг/мл, здесь и далее), ни в присутствии комбинации антибиотика и норадrenalина. В то же время в моновиовых биопленках *S. aureus*, окрашенных SYTO9, плотность биомассы снижалась в присутствии азитромицина, но при добавлении норадrenalина — увеличивалась до 3.03 мкм³/мкм² против 0.07 мкм³/мкм² в образцах с одним антибиотиком (рис. S11А, S12В).

В 24-часовых моновиовых биопленках *S. aureus* (рис. S11В), окрашенных зондом с R6G, а также в бинарном сообществе (рис. S11Д) практически ни один из изученных эффектов от действия активных соединений не был статистически значимым.

Через 48 ч инкубации норадrenalин усиливал ингибирующее действие азитромицина на моновиовые биопленки *K. schroeteri*, и плотность биомассы уменьшалась до 1.67 мкм³/мкм² против 2.37 мкм³/мкм² в образцах только с одним антибиотиком (рис. S11Б, S15). На моновиовые биопленки *S. aureus* норадrenalин оказывал

аналогичное действие. По результатам окраски SYTO9 (рис. S11Б, S16) и R6G (рис. S11Г, S16) плотность биомассы биопленок *S. aureus* в присутствии азитромицина снижалась с 3.6 мкм³/мкм² в контроле до 0.7 мкм³/мкм². Добавление норадреналина приводило к еще большему усилению ингибиторного действия антибиотика, и плотность биомассы снижалась еще сильнее — до 0.27 мкм³/мкм². В бинарном сообществе в присутствии азитромицина и норадреналина доля стафилококка также уменьшалась (рис. S11Е, S17).

Таким образом, установлено, что в зависимости от времени инкубации норадреналин оказывал двойственный эффект на биопленки. Если после 24 ч инкубации гормон нивелировал ингибирующее действие антибиотика (что заметно, в первую очередь, в случае *S. aureus*), то после 48 ч инкубации добавление норадреналина ингибирующее действие антибиотика усиливало.

Более выраженные эффекты после 48 ч инкубации могут быть в том числе следствием процессов, происходящих в более зрелых биопленках, ведущих к ускорению распада биопленок. В итоге, подтверждено, что в системе, где стадия обратимой адгезии не редуцирована, норадреналин усиливает ингибирующее действие азитромицина биопленок изученных микроорганизмов. Результаты систематизированы в таблице.

Исследование экспрессии генов

Чтобы понять, какие молекулярные механизмы лежат в основе реакций, вызванных норадреналином и антибиотиком, была исследована дифференциальная экспрессия генов с помощью метода количественной ПЦР (табл. S1–S2). Полученные результаты в моновиовых биопленках *K. schroeteri* показали, что азитромицин в концентрации 0.001 мкг/мл в комбинации с норадреналином снижал экспрессию гена *fomB*, отвечающего за инактивацию антибиотика, в то же время экспрессия генов *novA*, *mrh*, *mdtK* увеличивалась. Наибольшие изменения наблюдались с геном *arlR*, отвечающим за синтез выкачивающих помп, обуславливающих отток антибиотика из клетки. В присутствии норадреналина увеличивалась также экспрессия гена *tetA*, ответственного за устойчивость к тетрациклинам.

Полученные данные показывают, что азитромицин способен влиять на экспрессию генов устойчивости и к другим антибиотикам. Снижение экспрессии генов также может быть следствием связывания азитромицина с бактериальной рибосомой и блокировкой синтеза белка, что в том числе приводит к замедленному росту. Азитромицин в комплексе с норадреналином снижал экспрессию генов, что было показано для генов устойчивости к фторхинолонам и антибиотикам группы фосфоновой кислоты.

Итак, полученные данные показали, что норадреналин способен модулировать действие азитромицина на биопленки *K. schroeteri* и *S. aureus*. При этом ключевым моментом, вероятно, являются процессы адгезии клеток и формирования биопленочного фенотипа у обоих изученных микроорганизмов, а также их бинарного сообщества. В случае быстро сформировавшихся биопленок добавление норадреналина к азитромицину чаще ослабляло его ингибиторное действие, а в некоторых случаях даже стимулировало рост. Тогда как в случае, когда клетки проходят полную стадию адгезии, норадреналин усиливает подавляющее действие азитромицина. При этом, на начальных этапах гормон ускоряет, по видимому, деление клеток, что говорит о вовлеченности активных соединений в процессы распада зрелых биопленок.

Показано, что присутствие в бинарном сообществе одного микроорганизма (а именно *K. schroeteri*), способно модулировать активность азитромицина в отношении другого (*S. aureus*), как было показано при подсчете КОЕ стафилококков. Было также показано, что сочетание азитромицина и норадреналина может оказывать влияние на экспрессию генов устойчивости к антибиотикам.

Полученные результаты в ряде случаев могут отчасти объяснить, с одной стороны, низкую эффективность терапии антибиотиками, а с другой стороны, — негативные эффекты от их неправильного применения. В связи с тем, что антибиотикорезистентность является одной из главных проблем в медицине, проведенное исследование поможет лучше понять механизмы взаимодействия микроорганизмов внутри биопленки, а также потенциальное влияние системы гуморальной регуляции организма человека на микробное сообщество и, возможно, в будущем позволит создать новые стратегии лечения бактериальных инфекций.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят А.Л. Мулюкина и В.В. Сорокина (ЦКП “Коллекция UNIQEM”) за предоставление жидкого азота. Авторы благодарят А.П. Савицкого (лаборатория физической биохимии ФИЦ Биотехнологии РАН) за предоставление доступа к конфокальной микроскопии. Исследование экспрессии генов методом ПЦР проводилось на базе ЦКП “Биоинженерия” ФИЦ Биотехнологии РАН.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (проект № 19-74-10071). Работа

В.К. Плакунова выполнена частично за счет средств Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

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

- Данилова Н.Д., Гераскина О.В., Дювенжи Е.В., Фефанов А.В., Плакунов В.К., Ганнесен А.В. Ингибирующее действие норадреналина на рост биопленок комменсала кожи человека *Kytococcus schroeteri* H01 // Микробиология. 2021. Т. 90. С. 618–622.
- Danilova N. D., Geraskina O. V., Diuvenji E. V., Feofanov A. V., Plakunov V. K., Gannesen A. V. Inhibitory effect of norepinephrine on biofilm growth of the human skin commensal *Kytococcus schroeteri* H01 // Microbiology (Moscow). 2021. V. 90. P. 666–669.
- Дювенжи Е.В., Неволлина Е.Д., Мартьянов С.В., Журина М.В., Калмантаева О.В., Макарова М.А., Бочкова Е.А., Фирстова В.В., Плакунов В.К., Ганнесен А.В. Бинарные биопленки *Staphylococcus aureus* 209Р и *Kytococcus schroeteri* H01: дуалистическая роль китококков и изменения клеточной адгезии в присутствии натрийуретического пептида А-типа // Микробиология. 2022. Т. 91. С. 597–612.
- Diuvenji E. V., Nevolina E. D., Mart'yanov S. V., Zhurina M. A., Kalmantaeva O. V., Makarova M. A., Botchkova E. A., Firstova V. V., Plakunov V. K., Gannesen A. V. Binary biofilms of *Staphylococcus aureus* 209P and *Kytococcus schroeteri* H01: Dualistic role of kytococci and cell adhesion alterations in the presence of the A-type natriuretic peptide // Microbiology (Moscow). 2022. V. 91. P. 563–576.
- Плакунов В.К., Мартьянов С.В., Тетенева Н.А., Журина М.В. Универсальный метод количественной характеристики роста и метаболической активности микробных биопленок в статических моделях // Микробиология. 2016. Т. 85. №. 4. С. 484–489.
- Plakunov V. K., Mart'yanov S. V., Teteneva N. A., Zhurina M. V. A universal method for quantitative characterization of growth and metabolic activity of microbial biofilms in static models // Microbiology (Moscow). 2016. V. 85. P. 509–513.
- Плакунов В.К., Николаев Ю.А., Ганнесен А.В., Чемаева Д.С., Журина М.В. Новый подход к выявлению защитной роли *Escherichia coli* в отношении грамположительных бактерий при действии антибиотиков на бинарные биопленки // Микробиология. 2019. Т. 88. С. 288–296.
- Plakunov V. K., Nikolaev Y. A., Gannesen A. V., Chemaeva D. S., Zhurina M. V. A new approach to detection of the protective effect of *Escherichia coli* on Gram-positive bacteria in binary biofilms in the presence of antibiotics // Microbiology (Moscow). 2019. V. 88. P. 275–281.
- Плакунов В.К., Стрелкова Е.А., Журина М.В. Персистенция и адаптивный мутагенез в биопленках // Микробиология. 2010. Т. 79. С. 447–458.
- Plakunov V. K., Strelkova E. A., Zhurina M. V. Persistence and adaptive mutagenesis in biofilms // Microbiology (Moscow). 2010. V. 79. P. 424–434.
- Aepinus C., Adolph E., von Eiff C., Podbielski A., Petzsch M. *Kytococcus schroeteri*: a probably underdiagnosed pathogen involved in prosthetic valve endocarditis // Wien Klin. Wochenschr. 2008. V. 120. P. 46–49.
- Becker K., Schumann P., Wullenweber J., Schulte M., Weil H. P., Stackebrandt E., Peters G., von Eiff C. *Kytococcus schroeteri* sp. nov., a novel Gram-positive actinobacterium isolated from a human clinical source // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2002. V. 52. P. 1609–1614.
- Cambrone M., Tortuel D., Biaggini K., Maillot O., Taupin L., Réhel K., Rince I., Muller C., Hardouin J., Feuilloley M., Rodrigues S., Connil N. Epinephrine affects motility, and increases adhesion, biofilm and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* H103 // Sci. Rep. 2019. V. 9. Art. 20203.
- Chow L. K. M., Ghaly T. M., Gillings M. R. A survey of sub-inhibitory concentrations of antibiotics in the environment // J. Environ. Sci. 2021. V. 99. P. 21–27.
- Clabaut M., Suet A., Racine P. J., Tahrioui A., Verdon J., Barreau M., Maillot O., le Tirant A., Karsybayeva M., Kremser C., Redziniak G., Duclairoir-Poc C., Pichon C., Chevalier S., Feuilloley M. G. J. Effect of 17 β -estradiol on a human vaginal *Lactobacillus crispatus* strain // Sci. Rep. 2021. V. 11. Art. 7133.
- Coenye T., Peeters E., Nelis H. Biofilm formation by *Propionibacterium acnes* is associated with increased resistance to antimicrobial agents and increased production of putative virulence factors // Res. Microbiol. 2007. V. 158. P. 386–392.
- Diuvenji E. V., Nevolina E. D., Solov'yev I. D., Sukhacheva M. V., Mart'yanov S. V., Novikova A. S., Zhurina M. V., Plakunov V. K., Gannesen A. V. A-Type natriuretic peptide alters the impact of azithromycin on planktonic culture and on (monospecies and binary) biofilms of skin bacteria *Kytococcus schroeteri* and *Staphylococcus aureus* // Microorganisms. 2023. V. 11. Art. 2965.
- Green B. N., Johnson C. D., Egan J. T., Rosenthal M., Griffith E. A., Evans M. W. Methicillin-resistant

- Staphylococcus aureus*: an overview for manual therapists // J. Chiropr. Med. 2012. V. 11. P. 64–76.
- Heydorn A., Nielsen A.T., Hentzer M., Sternberg C., Givskov M., Ersbøll B.K., Molin S. Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT // Microbiology (Reading). 2000. V. 146. P. 2395–2407.
- Hosoda K., Shimomura H., Hayashi S., Yokota K., Hirai Y. Steroid hormones as bactericidal agents to *Helicobacter pylori* // FEMS Microbiol. Lett. 2011. V. 318. P. 68–75.
- Lewis K. Persister cells // Annu. Rev. Microbiol. 2010. V. 64. P. 357–372.
- Louis M., Clamens T., Tahrioui A., Desriac F., Rodrigues S., Rosay T., Harmer N., Diaz S., Barreau M., Racine P.J., Kipnis E., Grandjean T., Vieillard J., Bouffatrigues E., Cornelis P., Chevalier S., Feuilloley M.G.J., Lesouhaitier O. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm dispersion by the human atrial natriuretic peptide // Adv. Sci. 2022. V. 9. Art. 2103262.
- Lyte M. Microbial endocrinology in the microbiome-gut-brain axis: how bacterial production and utilization of neurochemicals influence behavior // PLoS Pathog. 2013. V. 9. Art. e1003726.
- Mah T.F. Biofilm-specific antibiotic resistance // Future Microbiol. 2012. V. 7. P. 1061–1072.
- Mart'yanov S.V., Botchkova E.A., Plakunov V.K., Gannesen A.V. The impact of norepinephrine on mono-species and dual-species staphylococcal biofilms // Microorganisms. 2021. V. 9. Art. 820.
- N'Diaye A., Mijouin L., Hillion M., Diaz S., Konto-Ghiorghi Y., Percoco G., Chevalier S., Lefevre L., Harmer N.J., Lesouhaitier O., Feuilloley M.G. Effect of substance P in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* virulence: implication for skin homeostasis // Front. Microbiol. 2016. V. 7. Art. 188414.
- Ovcharova M.A., Geraskina O.V., Danilova N.D., Botchkova E.A., Martyanov S.V., Feofanov A.V., Plakunov V.K., Gannesen A.V. Atrial natriuretic peptide affects skin commensal *Staphylococcus epidermidis* and *Cutibacterium acnes* dual-species biofilms // Microorganisms. 2021. V. 9. Art. 552.
- Ranieri M.R.M., Whitchurch C.B., Burrows L.L. Mechanisms of biofilm stimulation by subinhibitory concentrations of antimicrobials // Curr. Opin. Microbiol. 2018. V. 45. P. 164–169.
- Sauer K., Stoodley P., Goeres D.M., Hall-Stoodley L., Burmølle M., Stewart P.S., Bjarnsholt T. The biofilm life cycle: expanding the conceptual model of biofilm formation // Nat. Rev. Microbiol. 2022. V. 20. P. 608–620.
- Sharma D., Misba L., Khan A.U. Antibiotics versus biofilm: an emerging battleground in microbial communities // Antimicrob. Resist. Infect. Control. 2019. V. 8. Art. 76.
- Schaumburg F., Schmalstieg C., Fiedler B., Brentrup A., Omran H., Becker K. A bumpy road to the diagnosis of a *Kytococcus schroeteri* shunt infection // J. Med. Microbiol. 2013. V. 62. P. 165–168.
- Tong S.Y., Davis J.S., Eichenberger E., Holland T.L., Fowler V.G. Jr. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management // Clin. Microbiol. Rev. 2015. V. 28. P. 603–661.
- Veron W., Lesouhaitier O., Pennanec X., Rehel K., Leroux P., Orange N., Feuilloley M.G. Natriuretic peptides affect *Pseudomonas aeruginosa* and specifically modify lipopolysaccharide biosynthesis // FEBS J. 2007. V. 274. P. 5852–5864.
- Yousri T., Hawari M., Saad R., Langley S. *Kytococcus schroeteri* prosthetic valve endocarditis // BMJ Case Rep. 2010. V. 2010. Art. bcr0620103064.

EXPERIMENTAL ARTICLES

Modulation of Azithromycin Activity Against Monospecies and Binary Biofilms *Staphylococcus aureus* and *Kytococcus schroeteri* by Norepinephrine

E. V. Diuvenji¹, I. D. Soloviev¹, M. V. Sukhacheva¹, E. D. Nevolina¹,
M. A. Ovcharova¹, N. A. Loginova¹, A. M. Mosolova¹, S. V. Mart'yanov¹,
V. K. Plakunov¹, A. V. Gannesen^{1,*}

¹FRC "Fundamentals of biotechnology" of RAS, Moscow, 119071, Russia

*e-mail: andrei.gannesen@gmail.com

The effect of norepinephrine as a substance modulator of the activity of the antibiotic azithromycin in relation to monospecies and binary biofilms of representatives of the human microbiota *Staphylococcus*

aureus and *Kytococcus schroeteri* was studied in various model systems. It has been shown that the hormone at a concentration of 3.55 μM , depending on the cultivation system and incubation time, is capable of both enhancing and weakening the effects of azithromycin at subinhibitory concentrations (0.001 and 4 $\mu\text{g/ml}$). In the case of rapidly formed biofilms, norepinephrine weakens the inhibitory effect of the antibiotic, while in the presence of the full stage of adhesion, on the contrary, the hormone enhances the inhibitory effect of the antibiotic. No less important is the factor of interaction between two microorganisms in the community, since the presence of *K. schroeteri* in the community changes the effect of 4 $\mu\text{g/ml}$ azithromycin in combination with norepinephrine on *S. aureus*. It has been shown that azithromycin and norepinephrine, as well as their combinations, are able to change the expression of resistance genes not only to macrolides (increased expression of the *mrx* gene by a combination of 4 $\mu\text{g/ml}$ azithromycin and 3.55 μM norepinephrine), but also to fluoroquinolones (decreased expression of the *arlR* gene and increased *mdtK*).

Keywords: norepinephrine, azithromycin, biofilms, multispecies biofilms, microbial endocrinology, *Staphylococcus aureus*, *Kytococcus schroeteri*, antibiotic resistance, confocal microscopy, gene expression

УДК 579.24+57.013+577.35

АНАЛИЗ ЭЛЕКТРОФИЗИЧЕСКИХ ПРОФИЛЕЙ ПЛАНКТОННЫХ И БИОПЛЕНОЧНЫХ КЛЕТОК НА МОДЕЛИ БАКТЕРИЙ *AZOSPIRILLUM BALDANIORUM*

© 2024 г. А. В. Шелудько^{а, *}, С. С. Евстигнеева^а, Е. М. Телешева^а,
Ю. А. Филиппчева^а, Л. П. Петрова^а, Д. И. Мокеев^а, И. В. Волохина^а,
И. В. Борисов^а, В. Д. Бунин^б, О. И. Гулий^{а, **}

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

^бEloSystem GbR, Berlin 13407, Германия

^{*}, ^{**}e-mail: shel71@yandex.ru; gulyi_olga@mail.ru

Поступила в редакцию 08.04.2024

После исправления 10.06.2024 г.

Принята к опубликованию 17.06.2024 г.

Формирование биопленок является широко распространенным явлением в мире микробов. Они способны оказывать влияние на здоровье людей и животных, наносить ущерб различным отраслям промышленности, и в тоже время могут быть полезны в таких областях, как очистка сточных вод или увеличение биодоступности питательных веществ для растений. Это актуализирует развитие методов исследования биопленок. В данной работе впервые описан оптический сенсорный метод индикации формирования бактериальной биопленки с учетом биологической изменчивости на примере стимулирующих рост растений ризобактерий рода *Azospirillum*. Обнаружена корреляция между изменениями регистрируемых сенсорной системой электрофизических параметров и морфологическими особенностями бактерий из планктонных и/или биопленочных культур: наличие двигательных органелл (жгутиков), полиморфизма и ультраструктуры клеточных форм. Установлено, что регистрируемый оптической системой профиль микробных клеток значительно отличается в планктонной и биопленочной формах. При сравнении клеток различных штаммов (родительский штамм и его производные) или планктонных и биопленочных бактерий переменные, фиксируемые электрооптической сенсорной системой, согласуются с зафиксированными нами другими методами изменениями микро- и ультраструктуры бактерий. Результаты анализа электрофизических профилей *A. baldaniorum* Sp245 могут быть использованы в качестве референсных для выявления специфичности взаимодействия биопленочных клеток этого штамма с различными компонентами поверхности корня предполагаемого растительного партнера с использованием оптической сенсорной системы.

Ключевые слова: *Azospirillum baldaniorum*, биосенсоры, жгутики, подвижность, биопленки, ультраструктура

DOI: 10.31857/S0026365624060066

Бактериальные биопленки присутствуют повсюду как преобладающая форма жизни микробов практически во всех биотических и абиотических системах (Cámara et al., 2022). Формирование бактериальных биопленок является одним из важных факторов развития стойких внутрибольничных инфекций, а также заражения медицинских устройств. Биопленки оказывают серьезное влияние на здоровье людей и животных, создают проблемы с безопасностью пищевых продуктов, нарушают добычу нефти и газа и загрязняют запасы

питьевой воды. В других областях они могут быть полезны, например, таких как процессы очистки сточных вод и почвы или увеличение биодоступности питательных веществ для растений (Bogino et al., 2013; Hemdan et al., 2021; Cámara et al., 2022). Так успешное формирование и функционирование растительно-микробной ассоциации и противостояние бактерий и растений различным абиотическим стрессам возможно благодаря способности микроорганизмов, стимулирующих рост растений, формировать биопленки на корнях

растения-хозяина (Bogino et al., 2013). Биопленки представляют собой организованные гетерогенные сообщества микробных клеток, заключенных в самопродуцируемый сложный матрикс, состоящий из внеклеточного полимерного вещества, разделенного открытыми каналами, обеспечивающими лучшую диффузию питательных веществ и более легкое удаление продуктов метаболизма (Bogino et al., 2013; Hemdan et al., 2021; Cámara et al., 2022).

Формирование бактериальных биопленок является ключевым фактором, который необходимо учитывать при работе с культурами микроорганизмов. Обнаружение, диагностика и контроль формирования биопленок являются важными моментами, необходимыми не только для предотвращения развития биопленки, но и для развития методов управления процессами пленкообразования, как в медицинских, так и биотехнологических аспектах. Это справедливо не только для лабораторных исследований, но и для тестирования в реальных условиях, например, для контроля эффективности борьбы с биопленками в инженерных системах водоснабжения или для измерения результатов официальных клинических испытаний новых противомикробных препаратов. Подходы, используемые для анализа биопленок, основаны на методах окрашивания пленок, микроскопического анализа, использовании спектрохимических, электрохимических, пьезоэлектрических, оптических и сенсорных методов (O'Toole, Kolter, 1998; Salcedo et al., 2015; Hartmann et al., 2021; Guliy et al., 2022). Однако существует важный исследовательский пробел, как в фундаментальном, так и в прикладном контексте, в возможностях точно моделировать, прогнозировать и оценивать активность биопленок в реальных условиях (Cámara et al., 2022). Более того, изменчивость, присущая микробным клеткам, диктует необходимость в проведении нескольких параллельных независимых исследований для обеспечения надежности методов индикации бактериальных биопленок (Salcedo et al., 2015). Так, например, известно, что свободно плавающие ("планктонные") бактерии, переходя к существованию в составе биопленки, утрачивают зависящую от жгутиков подвижность. В то же время инактивация генов, отвечающих за подвижность, негативно влияет на формирование микробами биопленок (Guttenplan, Kearns 2013; Shelud'ko et al., 2019). Поэтому актуальным является не только развитие метода исследования биопленок и клеток в их составе, но и адаптация методов анализа биопленки для подвижных бактерий. Известно, что при переходе бактерий из планктонной формы в биопленочную происходит изменение их физиологического состояния (Otto, 2008; Junne et al., 2010), которое сопровождается перераспределением ионов и зарядов на поверхности микробной клетки, что и может быть зафиксировано оптическим датчиком.

Объектами настоящего исследования стали стимулирующий рост растений типовой штамм *A. baldaniorum* Sp245 (ранее *A. brasiliense* Sp245; Dos Santos Ferreira et al., 2020), формирующий биопленки на различных поверхностях (Baldani et al., 1983; Шелудько и соавт., 2010; Шелудько и соавт., 2020), и полученный нами ранее мутант, у которого вставка транспозона *Omegon-Km* произошла в ген одного из ключевых элементов экспортного аппарата полярного жгутика — белка FlhB1 (*flhB1*) (Filip'echeva et al., 2018). В жидких средах бактерии штамма Sp245 плавают с помощью полярного жгутика (Fla). При росте на полужидких и плотных средах на клетках Sp245, как и в случае других азоспирилл, дополнительно появляются многочисленные латеральные жгутики (Laf), используемые бактериями для роевания (Moens et al., 1996; Filip'echeva et al., 2018).

Цель работы заключалась в развитии оптического сенсорного метода исследования планктонных и биопленочных бактерий *A. baldaniorum* Sp245 с учетом клеточных структур, обеспечивающих их подвижность.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Штаммы бактерий и питательные среды. В работе использовали штамм *A. baldaniorum* Sp245 [IBPPM 219] (ранее *A. brasiliense* Sp245; Dos Santos Ferreira et al., 2020), выделенный в Бразилии из корней пшеницы (*Triticum* sp.) (Baldani et al., 1983), и его (Km^R) мутант Fla⁻Laf⁻ Sp245.1063 (*flhB1::Omegon-Km*) (Filip'echeva et al., 2018).

Бактерии культивировали при 30°C на малатно-солевой среде (MCC) (Döbereiner, Day, 1976) и на среде Luria–Bertani (LB) (Sambrook et al., 1989). При необходимости в среды добавляли 50 мкг/мл канамицина (Km).

Анализ формирования и микроструктуры биопленок. Ночные (20 ч) культуры азоспирилл, выращенные с аэрацией в жидкой среде LB, отмывали 50 мМ фосфатным буфером (ФБ) (pH 7.0) и суспендировали до ОП₅₉₀ = 0.05–0.10 ($I = 0.5$ см) в свежей LB. Вносили по 2 мл полученных суспензий в стеклянные пробирки, инкубировали при 30°C в стационарных условиях. Относительное количество биомассы в зрелых биопленках оценивали посредством окраски биопленок кристаллическим фиолетовым (O'Toole, Kolter, 1998). Клетки из смывов с поверхности стекла биопленок или планктонных культур также исследовали на предмет наличия жгутиков и их длины с использованием просвечивающего электронного микроскопа Libra 120 ("Carl Zeiss", Германия) при ускоряющем напряжении 120 кВ. Фазово-контрастную и просвечивающую электронную микроскопию биопленок и отдельных клеток, изучение подвижности

бактерий, определение толщины биопленок выполняли на приборах, находящихся в ЦКП “Симбиоз” ИБФРМ РАН (г. Саратов, Россия): Leica DM6000 В (“Leica-Microsystems”, Германия) и Libra 120 (“Carl Zeiss”, Германия). Топографию поверхности биопленок исследовали с помощью атомно-силового микроскопа SolverBio (“НТ-МДТ”, Россия). Подробную информацию о процедурах подготовки препаратов для микроскопии и их анализа можно найти в работах (Schelud’ko et al., 2009; Шумилова и соавт., 2016; Shelud’ko et al., 2019).

Приготовление ультратонких срезов. Биопленки осторожно промывали и смывали 50 мМ ФБ (pH 7.0). Смывы, содержащие фрагменты биопленок, или 24-часовые планктонные культуры из жидкой МСС с азотом, выросшие в условиях аэрации, осаждали центрифугированием. Полученные образцы биопленочных и планктонных клеток поэтапно фиксировали и обезвоживали, как описано ранее (Шелудько и соавт., 2020). Обезвоженный материал заключали в эпоксидную смолу Epon 812. Срезы получали на ультратоме, переносили на сеточки и при необходимости негативно окрашивали 3% раствором уранилацетата в 70% спирте. Ультратонкие срезы просматривали в просвечивающем электронном микроскопе Libra 120 (“Carl Zeiss”, Германия) при ускоряющем напряжении 120 кВ.

Определение численности жизнеспособных клеток в биопленках и их устойчивости к высушиванию. Зрелые биопленки осторожно промывали 50 мМ ФБ (pH 7.0). Определяли количество колониеобразующих единиц (КОЕ) в промытых нативных не подвергавшихся каким-либо воздействиям и сухих биопленках. В последнем случае промытые биопленки сушили при 30°C и хранили при 37°C. Для определения КОЕ в пробирки с биопленками вносили по 2 мл 50 мМ ФБ (pH 7.0), инкубировали 1 ч и смывали биомассу. Биомассу ресуспендировали в 50 мМ ФБ (pH 7.0) и 1 мин диспергировали на встряхивателе Vortex. Из полученной суспензии готовили серию десятикратных разведений и высевали из них по 100 мкл на плотную среду. Результаты с учетом разведения пересчитывали на 1 мл смыва. В качестве контроля использовали пробирки, в которых 6 сут инкубировали стерильную питательную среду. Результаты повторного проверочного окрашивания поверхности стекла опытных пробирок после смывания из них биопленок не отличались от контрольных значений и не превышали 0.04 ед. ОП₅₉₀ ($l = 0.5$ см), что свидетельствовало о полноте смывания биомассы биопленок.

Обработка биопленок проназой и периодатом натрия. В работе использовали 40 мМ раствор NaIO₄ в дистиллированной воде. Проназу растворяли в 100 мМ Tris-HCl буфере (pH 7.5) до концентрации 1000 мкг/мл и инкубировали 2 ч при 37°C, затем разводили в 50 мМ ФБ (pH 7.0) в соотношении 1 : 9.

Растворы фермента или NaIO₄ добавляли к биопленкам, предварительно удалив планктонную культуру (по 2 мл в пробирку); с ферментами инкубировали 2 ч при 37°C. В контрольных вариантах использовали 50 мМ ФБ (pH 7.0). С NaIO₄ инкубировали 23 ч при 4°C. В качестве контроля использовали дистиллированную воду, содержащую по 40 мМ NaIO₄ и глюкозы. После инкубации биопленки однократно отмывали дистиллированной водой и окрашивали 1% раствором кристаллического фиолетового при комнатной температуре, затем дважды промывали дистиллированной водой. Краситель, связавшийся с биомассой биопленок, растворяли в этаноле и измеряли при $\lambda = 590$ нм ($l = 0.5$ см) оптическую плотность раствора. Результаты выражали в процентах относительно соответствующих контрольных проб.

Подготовка образцов для сенсорного контроля. Биопленки выращивали в стеклянных пробирках в течение 6 сут при 30°C в стационарных условиях. удаляли планктонную культуру и смывали аспирацией биомассу пленок с поверхности стекла. У азоспирилл к 6 сут инкубации стабилизируется относительное количество биомассы биопленок и завершается процесс их формирования на поверхности стекла (зрелые биопленки) (Шелудько и соавт., 2015). Затем клетки осаждали (13000 г, 5 мин), после чего ресуспендировали в стерильной дистиллированной воде. Мониторинг осуществлялся с помощью прибора EloSystem 1.0 (“EloSystems GbR”, Германия). Перед анализом клетки трижды промывали от питательной среды центрифугированием (2800 г, 5 мин) в дистиллированной воде (электропроводность 1.6–1.8 мкСм/см), а затем центрифугировали однократно (1000 г, 1 мин) для удаления клеточных агрегатов. Измеряемые переменные были следующими: напряженность электрического поля – 93.1 В/см; длина волны света 670 нм (относительно вакуума); время приложения электрического поля 3.0 с. Объем измерительной ячейки составил ~1 мл, а концентрация клеток в измерительной ячейке ОП₆₇₀ (в единицах поглощения) колебались от 0.4 до 0.5. В экспериментах использовали дискретный набор частот ориентирующего поля: 740, 1000, 1450, 2000 и 2800 кГц.

В основе оптического метода анализа лежит поляризация частиц, суспендированных в непроводящей жидкости, под воздействием переменного электромагнитного поля. Регистрируемым параметром является изменение оптических параметров бактериальной суспензии под воздействием переменного электрического магнитного поля в указанном диапазоне частот. Клетки под действием поля вследствие поляризации меняют свою ориентацию, что приводит к изменению производимого ими светорассеяния. Это изменение детектируется анализатором. В качестве интегрального параметра распределения электрических зарядов

по границам клеток и клеточных структур, описывающего поляризуемость клетки как функцию частоты электрического поля, использовался тензор поляризуемости $\alpha(\omega)$. Вращательный момент клетки при изменении ее пространственной ориентации пропорционален разнице между продольной $\alpha_{||}(\omega)$ и осевой $\alpha_{\perp}(\omega)$ компонентами тензора $\alpha(\omega)$: $\Delta\alpha(\omega) = \alpha_{||}(\omega) - \alpha_{\perp}(\omega)$ (Guliy et al., 2022).

Для каждого эксперимента использовали не менее 5 циклов измерения. Все эксперименты проводились не менее чем в трех повторностях с соблюдением аналогичных условий выращивания культур и подготовки образцов. Относительная погрешность результатов измерений составляла $\pm 5\%$, т.е. при проведении нескольких экспериментов с одними и теми же бактериями регистрируемые значения имели разброс значений на любой измеряемой частоте в пределах $\pm 5\%$. Кривые на рисунках строили по средним значениям, полученным в результате не менее пяти измерений.

Статистическая обработка результатов. Выполняли не менее трех независимых экспериментов как минимум в двух повторностях. Статистическую обработку данных проводили с использованием t -критерия Стьюдента (доверительные интервалы даны для 95% уровня значимости) и однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) (при уровне значимости $p \leq 0.05$). Для статистической обработки использовали пакет программ Microsoft Office Excel 2010. Анализ распределения клеток по длине проводили с использованием инструмента анализа Гистограмма из пакета программ Microsoft Office Excel 2010.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ планктонной формы бактерий. Штамм *A. baldaniorum* Sp245 и его мутант Sp245-*flhB1::Omegon-Km* (Sp245.1063) примерно с одинаковой скоростью росли в жидкой среде. В 18–24-часовых планктонных культурах $(88.4 \pm 3.9)\%$ клеток Sp245 синтезировали длинный Fla (рис. 1А (1)), обеспечивающий их подвижность (рис. 2А), а в случае Sp245.1063 $(87.7 \pm 7.0)\%$ бактерий были лишены флагеллы (рис. 1А) (Filip'sheva et al., 2018). У мутанта бактерии, сохраняющие синтез длинного или короткого Fla, оказались неподвижны.

Электрофизические профили планктонных клеток родительского штамма Sp245 и Sp245.1063 характеризовались существенными различиями величины зарегистрированных изменений сенсорных переменных (рис. 2Б (1)). Зафиксированные различия регистрируемых данных для планктонных клеток мутанта и Sp245 могут быть обусловлены в значительной степени изменениями жгутикования бактерий Sp245.1063. В данном случае утрата бактериями Fla согласуется с существенным

увеличением величины зарегистрированных изменений у мутанта (рис. 2Б (1)). Для удобства на рис. 2Д приведены результаты изменения сигнала датчика на частоте 740 кГц.

Профили графиков (рис. 2Б (1)) для планктонной формы бактерий родительского штамма Sp245 и его мутанта Sp245.1063 были использованы как эталонные в дальнейшем при анализе биопленочной культуры.

Анализ клеток азоспирилл, сформировавших биопленки. В процессе формирования биопленок адсорбция и адгезия клеток штаммов Sp245 и Sp245.1063 к твердой поверхности, находящейся под жидкой средой, происходила на 2–3 сут культивирования, а к 5–6 сут наблюдался максимальный прирост и стабилизация биомассы биопленки (рис. 2Г). На стадии адгезии бактерии образовывали тонкие пленки, при микроскопии которых видны разрозненные клеточные агрегаты. С 3 сут инкубации микроколонии сливались в биопленку с более ровной поверхностью. Различия в относительном количестве биомассы в биопленках штамма Sp245 и его мутантов проявлялись к 6 сут инкубации (зрелые пленки) (рис. 2Г). Через 6 сут культивирования под жидкой средой LB мутант накапливал значительно меньше биомассы в биопленках, чем Sp245. Пленки Sp245.1063 были тоньше, чем Sp245 (таблица, в)). Количество КОЕ в биопленках Sp245 и Sp245.1063 существенно не отличалось (таблица, б)). Стоит отметить, что начиная со вторых суток инкубации, азоспириллы колонизируют не только твердую поверхность, но и образуют биопленку на разделе воздух/жидкость, которая с течением времени может оседать под толщу жидкости (на дно пробирки). Биомасса биопленок Sp245 или Sp245.1063, сформированных на стекле, после инкубации с проназой, убывала на 25–35% (рис. 2Е). После обработки периодатом натрия, модифицирующим гликополимеры, окисляя полисахариды с образованием диальдегидполисахаридов, биомасса зрелых биопленок Sp245 убывает на 40%, а в случае мутанта эта величина составляет 63% (рис. 2Е).

Электрофизические профили биопленочных клеток Sp245 или Sp245.1063 заметно отличались от профилей, характерных для планктонных бактерий (рис. 2Б (3 и 4)). У азоспирилл из биопленок величина зарегистрированных изменений сенсорных переменных была ниже таковой из планктонных культур (рис. 2Б (3 и 4)). При сравнении электрофизических профилей бактерий родительского штамма Sp245 и мутанта, сформировавших биопленки, также наблюдали различия (рис. 2Б (2)). Результаты изменений на частоте 740 кГц, приведенные на рис. 2Д, свидетельствуют, что величина зарегистрированного сигнала датчика у биопленочных клеток Fla⁺Laf⁺ мутант Sp245.1063 выше значений, характерных для бактерий Sp245, как и в случае сравнения планктонных культур

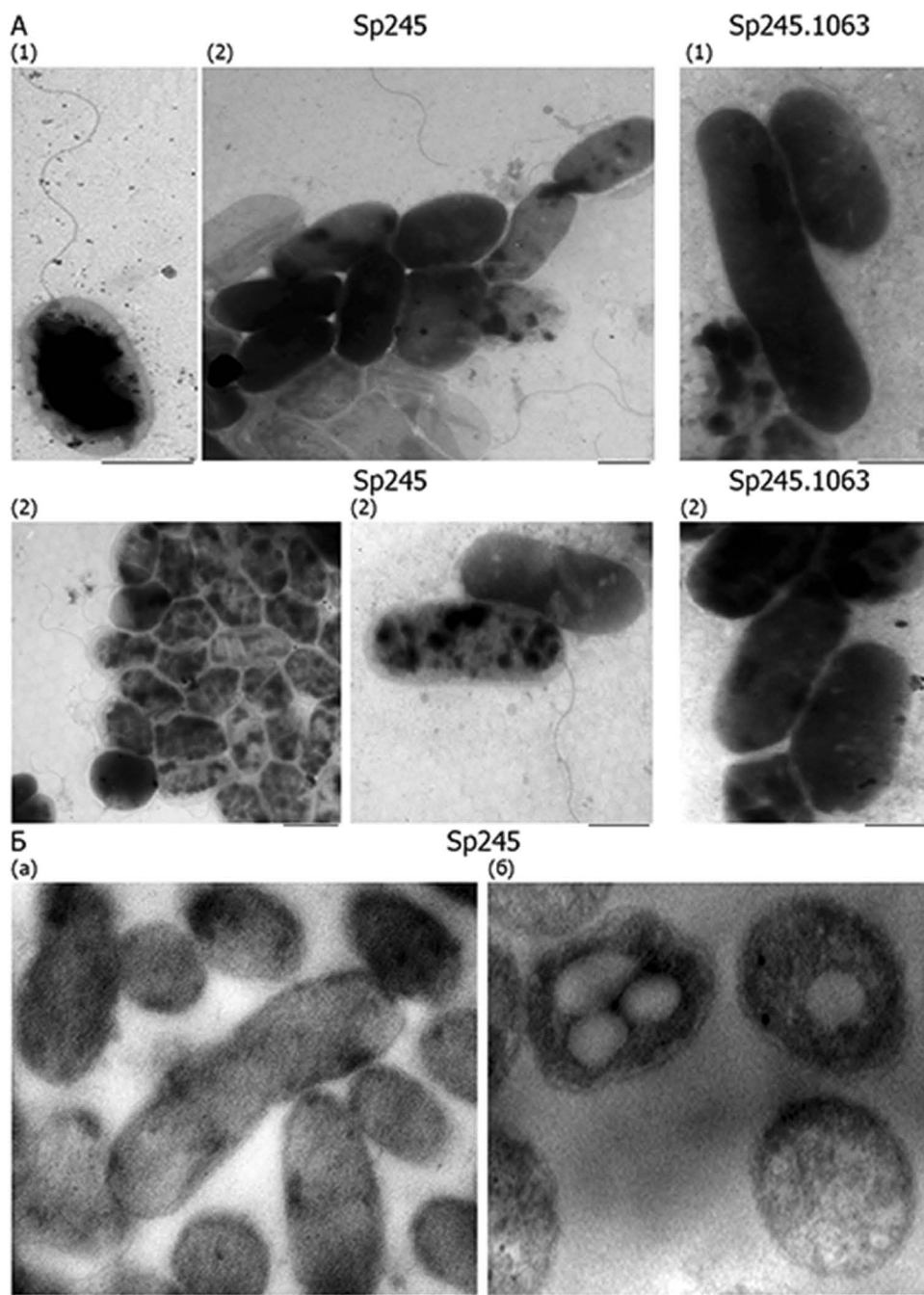


Рис. 1. А — Просвечивающая электронная микроскопия клеток *A. baldaniorum* Sp245 и Sp245.1063 из 20 ч жидких культур (1) или биопленок (2), сформированных на стекле под жидкой средой за 6 сут культивирования. Б — Просвечивающая электронная микроскопия ультратонких срезов клеток *A. baldaniorum* Sp245 из фрагментов биопленок, сформированных под жидкой средой на поверхности стекла за 6 сут культивирования. На панели (а) представлены “вегетативные” и “длинные” клетки, на панели (б) показаны “цистоподобные формы”. Масштабная линейка — 1 мкм.

этих штаммов. Однако при измерении на других частотах, в случае сравнения клеток из биопленочных культур Sp245 и Sp245.1063, не наблюдали тенденций, характерных для планктонных бактерий этих штаммов (рис. 2Б (1 и 2)).

Характеристика микро- и ультраструктуры клеток в зрелых биопленках. С помощью атомно-силовой и электронной микроскопии исследованы клетки из нативных и смытых с поверхности стекла пленок. По сравнению с планктонной культурой доля

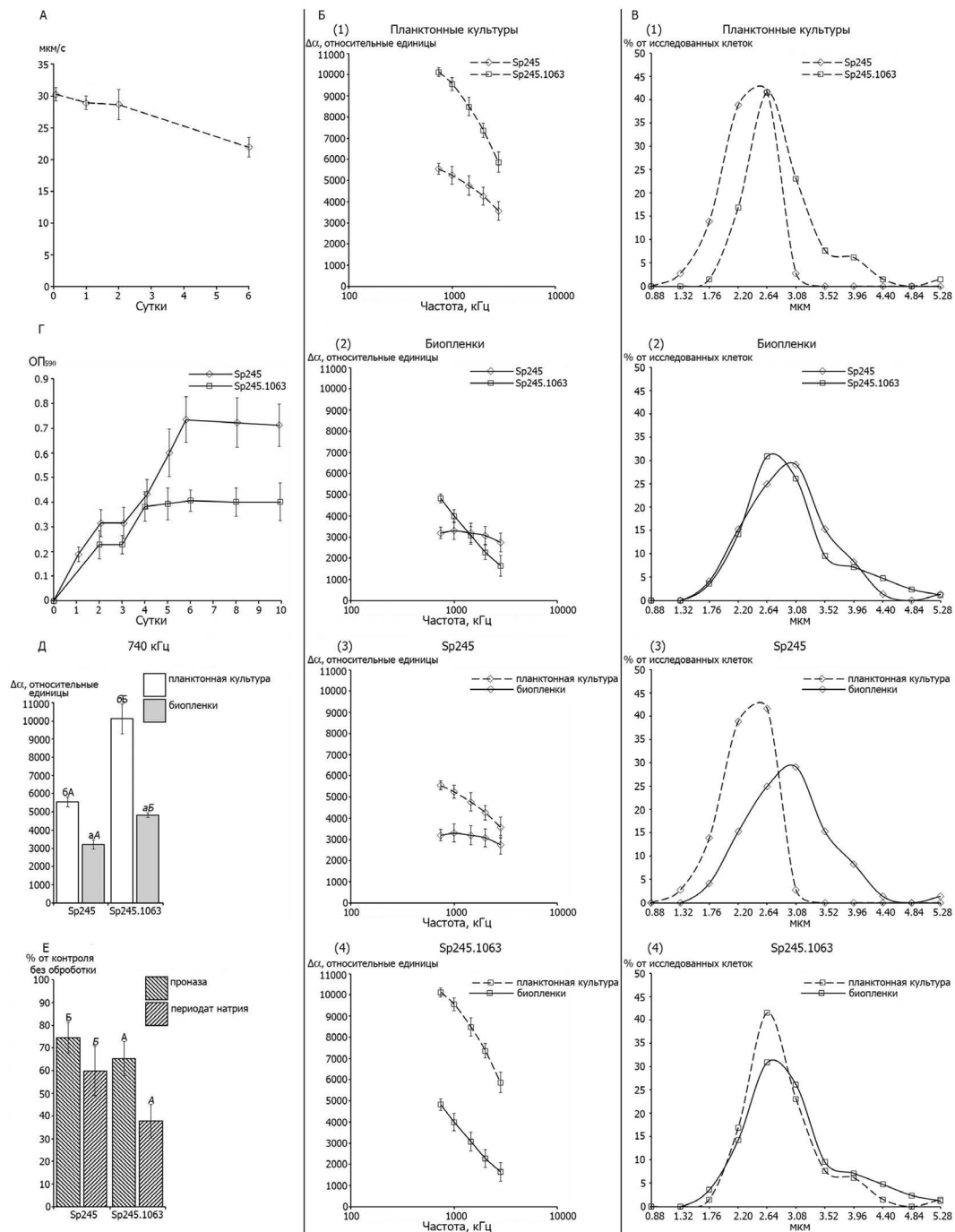


Рис. 2. **А** – Влияние состава среды на скорость движения планктонных клеток *A. baldaniorum* Sp245 в жидкой среде. **Б** – Электрофизические профили бактерий из планктонных 20-ч жидких культур и 6-сут биопленок. **В** – Распределение клеток по длине. Средняя длина клеток *A. baldaniorum* Sp245 и Sp245.1063 соответственно штамму в 20 ч планктонных жидких культурах составляла (2.6 ± 0.3) и (2.1 ± 0.2) мкм, (2.8 ± 0.3) и (2.8 ± 0.2) мкм в случае 6-сут биопленок. **Г** – Динамика накопления биомассы в биопленках, сформированных *A. baldaniorum* Sp245 и Sp245.1063 на стекле под жидкой LB. ОП₅₉₀ – оптическая плотность кристаллического фиолетового, десорбированного после окрашивания биопленок. **Д** – Результаты изменения величины электрооптического сигнала клеток на частоте 740 кГц. **Е** – Влияние проназы и периодата натрия на биомассу 6-сут биопленок, сформированных на стекле под жидкой средой LB. % – процентное отношение оптической плотности красителя, десорбированного с окрашенных пленок после их инкубации в растворе проназы или периодата натрия к аналогичному показателю без обработки. Однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) данных на панелях (Д) и (Е) проводили, сравнивая показатели каждого штамма (строчные буквы) или сопоставляя показатели Sp245 и Sp245.1063 (заглавные буквы); разными буквами обозначены статистически значимые различия; а, а, А и А – средние значения с наименьшей величиной.

Таблица. Биомасса (а, д), толщина (г) и количество КОЕ (б, в) в зрелых биопленках *A. baldaniorum*, сформированных в стеклянных пробирках под жидкой LB за 6 сут

Штамм	Условия культивирования				
	Статично				Перемешивание, 140 об./мин
	(а)	(б)	(в)	(г)	(д)
	A_{590} ($l = 0.5$ см) кристаллического фиолетового, десорбированного после окрашивания биопленок	*Количество КОЕ в 1 мл суспензии смытой биомассы нативной биопленки	*Количество КОЕ в 1 мл суспензии смытой биомассы сухой биопленки	Толщина биопленок, мкм	A_{590} ($l = 0.5$ см) кристаллического фиолетового, десорбированного после окрашивания биопленок
Sp245	0.72 ± 0.06 аБ	$(2.6 \pm 0.3) \times 10^7$	$(3.6 \pm 0.7) \times 10^6$	33.7 ± 3.5 Б	0.70 ± 0.09 аБ
Sp245.1063	0.42 ± 0.04 БА	$(1.5 \pm 0.5) \times 10^7$	$(3.0 \pm 0.4) \times 10^3$	23.7 ± 2.5 А	0.22 ± 0.04 аА

Примечание. Однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) данных в колонках (а), (г) и (д) проводили, сравнивая показатели каждого штамма (строчные буквы) или сопоставляя показатели Sp245 и Sp245.1063 (заглавные буквы); разными буквами обозначены статистически значимые различия; а, А и А – средние значения с наименьшей величиной. *Биомассу биопленки смывали 2 мл 50 мМ ФБ (рН 7.0).

клеток, лишенных Fla, в зрелых пленках Sp245 возрастает, однако особи, продолжающие синтезировать жгутик, были обнаружены на всех этапах формирования биопленок этим штаммом (рис. 1А и 3). Филаменты Fla в пленках Sp245, переплетаясь, образуют сеть (рис. 3а, 3г). У Sp245.1063 бактерии, синтезирующие Fla, в пленках отсутствуют (рис. 1А). В биопленках, образованных на твердой поверхности штаммом Sp245, как и в случае Fla[–] Laf[–] мутанта Sp245.1063, отсутствовали латеральные жгутики (рис. 1А).

Зрелые биопленки азоспирилл содержали различного диаметра везикулы/пузырьки (рис. 1А и 3). При атомно-силовой микроскопии в случае пленок Sp245 на разделе жидкость/воздух везикулы встречались чаще, чем в биопленках на границе жидкость/твердая поверхность (рис. 3б, 3в, 3д, 3е). Расположение пузырьков в биопленках не регулярно, в отличие от клеточных кластеров, состоящих из 3–5 бактерий (рис. 3). Как правило, везикулы формируются из наружной мембраны грамотрицательных бактерий и содержат ферменты и нуклеиновые кислоты. Не исключено, что везикулы/пузырьки также способствуют сохранению стабильного положения биопленок азоспирилл на границе жидкость/воздух.

Планктонные клетки Sp245.1063 были на 20% длиннее Sp245 (средняя длина бактерий составляла соответственно (2.6 ± 0.3) и (2.1 ± 0.2) мкм). Этот показатель морфологии бактерий в биопленках у Sp245.1063 и Sp245 не отличался (средняя длина клеток составляла соответственно (2.8 ± 0.3) и (2.8 ± 0.2) мкм). Распределение клеток в биопленочной популяции Sp245 и Sp245.1063 по размеру были примерно одинаковыми (рис. 2В (2)).

При сравнении клеток Sp245.1063 из планктонной и биопленочной культуры не обнаружили существенной разницы в их длине и в распределении по размеру (рис. 2В (4)). В случае штамма Sp245 бактерии из биопленок были длиннее клеток из планктонной культуры, а их распределение в популяции по размеру различалось (рис. 2В (3)).

Выраженный полиморфизм размера и формы бактерий, сформировавших биопленки, подтверждает анализ их ультратонких срезов. На срезах биопленок, подробно исследованных на примере Sp245, обнаруживались вегетативные клетки (В-клетки), характерные для планктонных культур, которые являются вибрионами с минимальным количеством включений (рис. 1Б). Тонкий слой капсулы тесно связан с липополисахаридом наружной мембраны В-клеток. Встречаются клетки, лишенные выраженной капсулы, делящиеся особи и длинные клетки (Д-клетки), а также клетки яйцевидной формы (рис. 1Б) средних и больших размеров – цистоподобные формы (ЦП-формы. Часть Д-клеток, как и ЦП-формы, покрыты выраженным внешним слоем (рис. 1Б). Наличие в биопленках ЦП-форм способствует выживанию биопленочных популяций азоспирилл в условиях высушивания (Шелудько и соавт., 2020). Биопленки Sp245.1063 содержат на порядок меньше, чем штамм Sp245, устойчивых к высушиванию клеточных форм (таблица).

ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты анализа электрофизических профилей планктонных бактерий показали, что в случае мутанта Sp245-*flhB1::Omegon-Km* (Sp245.1063),

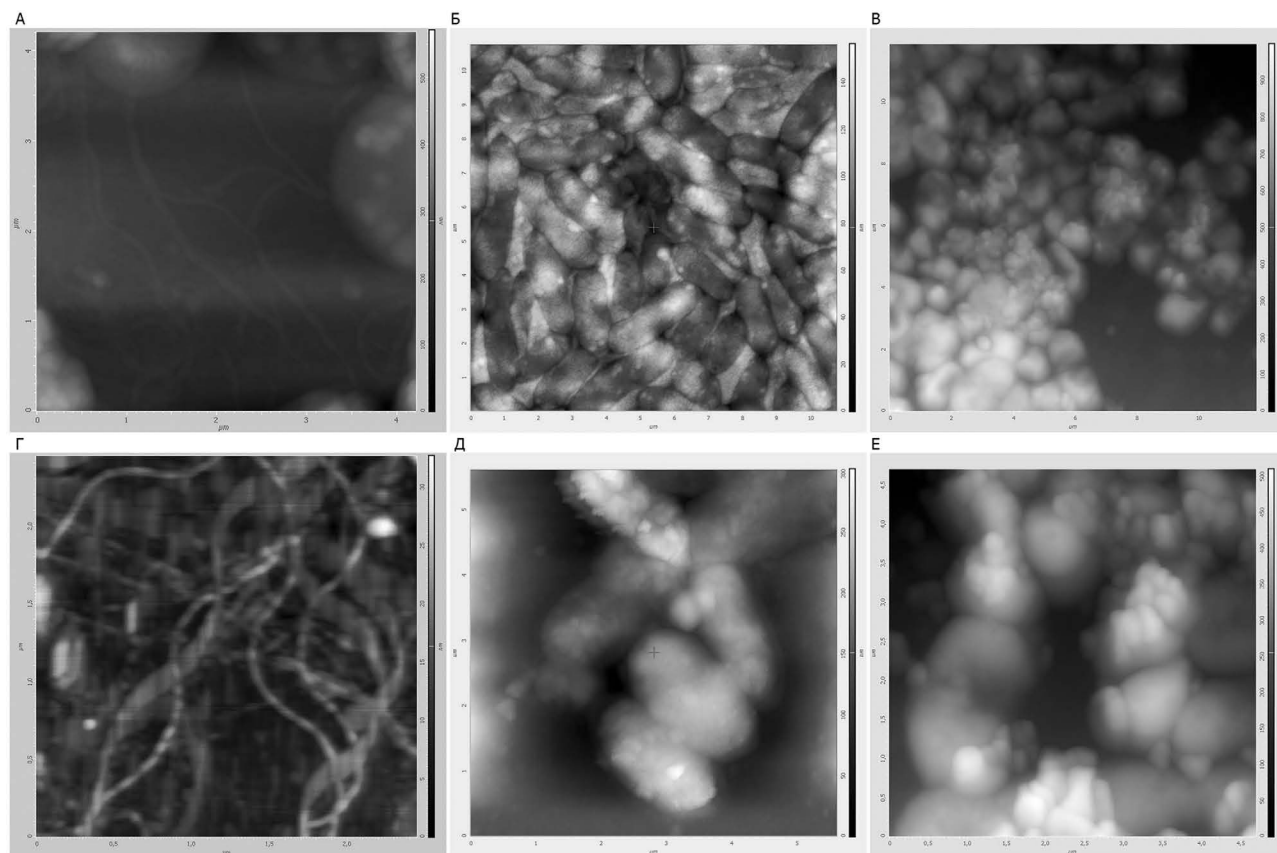


Рис. 3. Результаты атомно-силовой микроскопии. АСМ-изображения 6-сут биопленок штамма *A. baldaniorum* Sp245, сформированных на разделе жидкая LB/стекло (А, Б, Г, Д), жидкая LB/воздух (В, Е).

на клетках которого отсутствовал Fla (Filip'echeva et al., 2018), величина зарегистрированных сенсорных переменных значительно увеличивается по сравнению с показателями у *A. baldaniorum* Sp245. Очевидно, характеристики электрофизических профилей клеток азоспирилл согласуются с изменениями морфологии/микроструктуры бактерий. Данное обстоятельство свидетельствует о перспективности использования данного показателя клеток и для характеристики бактерий из биопленок, поскольку переход свободнодвижущих микробов к прикрепленному существованию сопровождается изменением их морфологии. Действительно, в случае каждого исследованного штамма при сравнении планктонных и биопленочных клеток наблюдали заметные отличия в их электрофизических профилях.

Используя метод, основанный на окрашивании бактериальных пленок неспецифическим красителем кристаллическим фиолетовым (O'Toole, Kolter, 1998), сравнили динамику формирования биопленок на гидрофильной поверхности под жидкой средой в статичных условиях штаммом Sp245 и Fla⁻Laf⁻ мутантом Sp245-*flhB1::Omegon*-Km

(Sp245.1063). Этот метод позволил обнаружить, что относительное количество биомассы зрелых биопленок Sp245.1063 заметно отличалось от показателей, характерных для Sp245. Электрофизические профили бактерий из биопленок Sp245 и мутанта Sp245.1063 также различались. Результаты электронной микроскопии показали, что по сравнению с планктонной культурой доля клеток, лишенных Fla, в пленках Sp245 возрастает, однако доля особей, продолжающих синтезировать жгутик, остается значительной. В биопленках родительского штамма, как и в случае Fla⁻Laf⁻ мутанта, отсутствовали Laf, синтез которых у азоспирилл индуцируется на полужидких и плотных агаризованных средах (Moens et al., 1996; Filip'echeva et al., 2018). Положение электрофизического профиля биопленочных клеток Sp245.1063 относительно Sp245 свидетельствует о том, что у последнего величина зарегистрированных изменений заметно ниже на частоте 740 кГц, как и в случае их планктонных культур. Согласно модели микробной клетки (Bai et al., 2006), изменения, зарегистрированные на частоте 740 кГц, характеризуют изменение свойств клеточной поверхности. На других

частотах, в случае сравнения клеток из биопленочных культур, мы не наблюдали высоких значений сенсорных переменных у Fla^- мутанта (по сравнению с Sp245), характерных для его планктонных бактерий. Это может свидетельствовать о схожих параметрах клеток в биопленках Sp245.1063 и Sp245, влияющих на величину сенсорных переменных, зарегистрированных на частотах выше 740 кГц.

Помимо измерения поляризационных параметров электрооптический метод анализа суспендированных клеток позволяет охарактеризовать размер клеток (Van De Merwe et al., 2004; Junne et al., 2010). После окончания действия электрического поля клетки из частичного ориентированного состояния под воздействием броуновского движения переходят в хаотическое движение. Фракция каждого размера представляет собой экспоненту с показателем, связанным с размером и формой клеток и весовым множителем, равным их парциальной концентрации. В сумме эти экспоненты формируют суммарную релаксационную кривую. Известно, что при периодическом культивировании форма функции распределения размеров бактерий остается постоянной, и релаксационная кривая сохраняет свою форму. Но временной масштаб может меняться. Если взять для сравнения две релаксационные кривые от разных клеток или различных фаз роста одного вида клеток и вытягивать или сжимать одну из кривых по времени, то полное совпадение формы этих кривых будет подтверждать идентичность функций распределения клеток по размерам. Так, при анализе результатов электронной микроскопии мы обнаружили примерно одинаковое распределение клеток в биопленочной популяции Sp245 и Sp245.1063 по размеру. Средняя длина бактерий из биопленок Sp245 и Sp245.1063 также не различалась. Сравнение клеток Sp245.1063 из планктонной и биопленочной культуры показало отсутствие существенной разницы в их длине и в распределении по размеру. В случае штамма Sp245 бактерии из биопленок были длиннее клеток из планктонной, а их распределение в популяции по размеру отличалось. Положение электрофизического профиля планктонных клеток Sp245, по отношению такового у биопленочных бактерий, свидетельствует о снижении величины зарегистрированных изменений у последних. Сходная тенденция характерна и для Fla^- мутанта. Таким образом, при трактовке результатов сенсорного анализа клеток из биопленочной популяции Sp245 и Sp245.1063 длина клеток, их распределение по этому показателю не являются определяющими.

Морфологический и функциональный полиморфизм клеточных форм в биопленках азоспирилл практически не охарактеризован, хотя типичен для вегетативных клеток этих бактерий, выросших в жидких или на плотных средах

(Dobereiner, Day, 1975; Wang et al., 2017; Шелудько и соавт., 2020). В планктонных культурах азоспирилл, в том числе штамма Sp245, среди вегетативных клеток, являющихся вибрионами с минимальным количеством включений, встречаются делящиеся и длинные клетки (Dobereiner, Day, 1975; Шелудько и соавт., 2020). Анализируя ультратонкие срезы биопленок, мы обнаружили вегетативные клетки, характерные для планктонных культур, длинные клетки, а также клетки яйцевидной формы средних и больших размеров — цистоподобные формы (ЦП-формы), которые описаны в старых культурах азоспирилл, в частности, в среде без источника связанного азота. Часть длинных клеток, как и ЦП-формы, покрыта выраженным внешним слоем. Очевидно, полиморфизм клеток, обусловленный их ультраструктурой, в значительной степени определяет показатели, фиксируемые электрооптической сенсорной системой при сравнительном анализе планктонных и биопленочных бактерий.

Мы наблюдали, что биопленки Sp245 и Sp245.1063 отличаются численностью ЦП-форм, способствующих выживанию азоспирилл в условиях высушивания (Шелудько и соавт., 2020). Также у клеток каждого из исследованных нами штаммов соотношение белковых и углеводсодержащих структур, соединяющих бактерии в биопленке и обеспечивающих ее прикрепление к поверхности, было индивидуальным. Эти характеристики биопленочных клеток также могут оказывать влияние на электрофизические профили бактерий из биопленок Sp245 и Sp245.1063 и определять различия между штаммами. Так на клетках азоспирилл, сформировавших биопленки, могут присутствовать полярный жгутик, пили, белки лектиновой природы, амилоидные структуры, глюканы и другие гликополимеры капсулы (Wisniewski-Dyé et al., 2011; Шумилова и соавт., 2016; Shelud'ko et al., 2019).

Таким образом, использование сенсорной системы позволяет сравнить клетки, сформировавшие биопленки, различных штаммов/производных одного штамма и сопоставить их с бактериями из планктонных культур. Традиционно для таких сравнений используют целый набор сложных и трудоемких методических подходов, требующих специальной подготовки образцов (Salcedo et al., 2015). Необходимо отметить, что микро/ультраструктура, жизнеспособность и метаболизм планктонных или сформировавших биопленки бактерий довольно разнообразны и изменчивы (Wang et al., 2017; Шелудько и соавт., 2020). То же самое относится и к заселяемым микробами субстратам. В данной работе мы охарактеризовали динамику формирования биопленок на гидрофильной абиотической поверхности штаммом *A. baldaniorum* Sp245 и его мутантом Sp245-*flhB1::Omegon-Km*, имеющим дефекты в синтезе жгутиков

и подвижности клеток. Используя сенсорную систему, в основе которой лежит определение электрофизических профилей клеток, мы смогли выявить различия не только между планктонными и биопленочными бактериями, но и между клетками родительского штамма и его мутантов. При сравнении клеток родительского штамма и мутанта или планктонных и биопленочных бактерий переменные, фиксируемые электрооптической сенсорной системой, согласуются с зафиксированными другими методами изменениями микро- и ультраструктуры бактерий. Использование оптической сенсорной системы является перспективной основой для оценки эффективности формирования/фиксации биопленок на поверхности корня потенциального растения-хозяина. Известно, что взаимодействие азоспирилл с различными биомакромолекулами, в том числе растительными лектинами, влияющими на подвижность клеток этих бактерий и определяющими специфичность их прикрепления к растительным корням (Yagoda-Shagam et al., 1988; Skvortsov, Ignatov, 1998; Yegorenkova et al., 2001; Shelud'ko et al., 2009), влияет на их электрофизические профили (Гулий и соавт., 2008). Результаты анализа электрофизических профилей бактерий в данной работе могут быть использованы в качестве эталонных, как при характеристике специфичности начальных этапов взаимодействия микроорганизмов (профили планктонных свободноживущих клеток) с корневой системой растений, так и последующих этапов фиксации пленок на растении (профили биопленочных клеток).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Гулий О.И., Антонюк Л.П., Игнатов В.В., Игнатов О.В. Динамика изменений электрофизических свойств клеток *Azospirillum brasilense* Sp7 при их связывании с агглютинином зародыша пшеницы // Микробиология. 2008. Т. 77. С. 782–787.
- Guliy O.I., Antonyuk L.P., Ignatov V.V., Ignatov O.V. Dynamics of the changes of electrophysical properties of *Azospirillum brasilense* Sp7 cells at their binding with wheat germ agglutinin // Microbiology (Moscow). 2008. V. 77. P. 695–699.
- Шелудько А.В., Широков А.А., Соколова М.К., Соколов О.И., Петрова Л.П., Матора Л.Ю., Кацы Е.И. Колонизация корней пшеницы бактериями *Azospirillum brasilense* с различной подвижностью // Микробиология. 2010. Т. 79. С. 696–704.
- Shelud'ko A.V., Shirokov A.A., Sokolova M.K., Sokolov O.I., Petrova L.P., Matora L.Yu., Katsy E.I. Wheat root colonization by *Azospirillum brasilense* strains with different motility // Microbiology (Moscow). 2010. V. 79. P. 688–695.
- Шелудько А.В., Филипьева Ю.А., Шумилова Е.М., Хлебцов Б.Н., Буров А.М., Петрова Л.П., Кацы Е.И. Изменения в формировании биопленок у *flhB1* мутанта бактерии *Azospirillum brasilense* Sp245, лишённого жгутиков // Микробиология. 2015. Т. 84. С. 175–183.
- Shelud'ko A.V., Filip'echeva Y.A., Shumilova E.M., Khlebtsov B.N., Burov A.M., Petrova L.P., Katsy E.I. Changes in biofilm formation in the nonflagellated *flhB1* mutant of *Azospirillum brasilense* Sp245 // Microbiology (Moscow). 2015. V. 84. P. 144–151.
- Шелудько А.В., Мокеев Д.И., Евстигнеева С.С., Филипьева Ю.А., Буров А.М., Петрова Л.П., Пономарева Е.Г., Кацы Е.И. Анализ ультраструктуры клеток в составе биопленок бактерий *Azospirillum brasilense* // Микробиология. 2020. Т. 89. С. 59–73.
- Shelud'ko A.V., Mokeev D.I., Evstigneeva S.S., Filip'echeva Yu.A., Burov A.M., Petrova L.P., Ponomareva E.G., Katsy E.I. Cell ultrastructure in biofilms of *Azospirillum brasilense* // Microbiology (Moscow). 2020. V. 89. P. 50–63.
- Шумилова Е.М., Шелудько А.В., Филипьева Ю.А., Евстигнеева С.С., Пономарева Е.Г., Петрова Л.П., Кацы Е.И. Изменение свойств клеточной поверхности и эффективности формирования биопленок у мутантов бактерии *Azospirillum brasilense* Sp245 по предполагаемым генам липидного метаболизма *mmsB1* и *fabG1* // Микробиология. 2016. Т. 85. С. 162–170.
- Shumilova E.M., Shelud'ko A.V., Filip'echeva Y.A., Evstigneeva S.S., Ponomareva E.G., Petrova L.P., Katsy E.I. Changes in cell surface properties and biofilm formation efficiency in *Azospirillum brasilense* Sp245 mutants in the putative genes of lipid metabolism *mmsB1* and *fabG1* // Microbiology (Moscow). 2016. V. 85. P. 172–179.
- Baldani V.L.D., Baldani J.I., Döbereiner J. Effects of *Azospirillum* inoculation on root infection and nitrogen incorporation in wheat // Can. J. Microbiol. 1983. V. 29. P. 924–929.
- Bai W., Zhao K.S., Asami K. Dielectric properties of *E. coli* cell as simulated by the three-shell spheroidal model // Biophys. Chem. 2006. V. 122. P. 136–142.
- Bogino P.C., Oliva M.M., Sorroche F.G., Giordano W. The role of bacterial biofilms and surface components in plant-bacterial associations // Int. J. Mol. Sci. 2013. V. 14. P. 15838–15859.

- Cámara M., Green W., MacPhee C.E., Rakowska P.D., Raval R., Richardson M.C., Slater-Jefferies J., Steven-ton K., Webb J.S. Economic significance of biofilms: a multidisciplinary and cross-sectoral challenge // *Biofilms Microbiomes*. 2022. V. 8. Art. 42.
- Dos Santos Ferreira N., Sant'Anna F.H., Reis V.M., Ambro-sini A., Gazolla Volpiano C., Rothballer M., Schwab S., Baura V.A., Balsanelli E., Pedrosa F.O., Pereira Pas-saglia L.M., Maltempi de Souza E., Hartmann A., Cassan F., Zilli J.E. Genome-based reclassification of *Azospirillum brasilense* Sp245 as the type strain of *Azospirillum baldaniorum* sp. nov. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2020. V. 70. P. 6203–6212.
- Döbereiner J., Day J.M. Associative symbiosis in tropical grass: Characterization of microorganisms and dinitrogen fixing sites // *Symposium on Nitrogen Fixation* / Eds. Newton W.E., Nijmans C.J. Pullman: Washington State University Press, 1976. P. 518–538.
- Filip'echeva Y., Shelud'ko A., Prilipov A., Telesheva E., Mo-keev D., Burov A., Petrova L., Katsy E. Chromosomal *flhB1* gene of the alphaproteobacterium *Azospirillum brasilense* Sp245 is essential for correct assembly of both constitutive polar flagellum and inducible lateral flagel-la // *Folia Microbiol.* 2018. V. 63. P. 147–153.
- Guliy O.I., Evstigneeva S.S., Bunin V.D. Electrical sensor system for *in vitro* bacteria biofilm diagnostics // *Bio-sens. Bioelectron.* X. 2022. V. 11. Art. 100174.
- Guttenplan S.B., Kearns D.B. Regulation of flagellar motil-ity during biofilm formation // *FEMS Microbiol. Rev.* 2013. V. 37. P. 849–871.
- Hartmann R., Jeckel H., Jelli E., Singh P.K., Vaidya S., Bayer M., Rode D.K.H., Vidakovic L., Díaz-Pascual F., Fong J.C.N., Dragoš A., Lamprecht O., Thöming J.G., Netter N., Haussler S., Nadell C.D., Sourjik V., Kovács A.T., Yildiz F.H., Drescher K. Quantitative image analysis of microbial communities with Bio-filmQ // *Nat. Microbiol.* 2021. V. 6. P. 151–156.
- Hemdan B.A., El-Taweel G.E., Goswami P., Pant D., Sev-da S. The role of biofilm in the development and dis-semination of ubiquitous pathogens in drinking water distribution systems: an overview of surveillance, out-breaks, and prevention // *World J. Microbiol. Bio-technol.* 2021. V. 37. Art. 36.
- Junne S., Cruz-Bournazou M.N., Angersbach A., Götz P. Electrooptical monitoring of cell polarizability and cell size in aerobic *Escherichia coli* batch cultivations // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2010. V. 37. P. 935–942.
- Moens S., Schlöter M., Vanderleyden J. Expression of the structural gene, *lafI*, encoding the flagellin of the lat-eral flagella in *Azospirillum brasilense* Sp7 // *J. Bacte-riol.* 1996. V. 178. P. 5017–5019.
- O'Toole G.A., Kolter R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signaling pathways: a genetic analysis // *Mol. Microbiol.* 1998. V. 28. P. 449–461.
- Otto M. Staphylococcal biofilms // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2008. V. 322. P. 207–228.
- Salcedo F., Pereyra C.M., Arruebarrena Di Palma A., Lamattina L., Creus C.M. Methods for studying bio-films in *Azospirillum* and other PGPRs // *Handbook for Azospirillum* / Eds. Cassán F., Okon Y., Creus C. Springer, Cham., 2015. P. 199–229.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edn. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
- Schelud'ko A.V., Makrushin K.V., Tugarova A.V., Kresti-nenko V.A., Panasenkov V.I., Antonyuk L.P., Katsy E.I. Changes in motility of the rhizobacterium *Azospirillum brasilense* in the presence of plant lectins // *Microbiol. Res.* 2009. V. 164. P. 149–156.
- Shelud'ko A.V., Filip'echeva Y.A., Telesheva E.M., Yevstign-eeva S.S., Petrova L.P., Katsy E.I. Polar flagellum of the alphaproteobacterium *Azospirillum brasilense* Sp245 plays a role in biofilm biomass accumulation and in biofilm maintenance under stationary and dy-namic conditions // *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2019. V. 35. Art. 19.
- Skvortsov I.M., Ignatov V.V. Extracellular polysaccharides and polysaccharide-containing biopolymers from *Azospirillum* species: properties and the possible role in interaction with plant roots // *FEMS Microbiol. Lett.* 1998 V. 165. P. 223–229.
- Van De Merwe W.P., Czégé J., Milham M.E., Bronk B.V. Rapid optically based measurements of diameter and length for spherical or rod-shaped bacteria *in vivo* // *Appl. Opt.* 2004. V. 43. P. 5295–5302.
- Wang D., Xu A., Elmerich C., Ma L.Z. Biofilm formation enables free-living nitrogen-fixing rhizobacteria to fix nitrogen under aerobic conditions // *ISME J.* 2017. V. 11. P. 1602–1613.
- Wisniewski-Dyé F., Borziak K., Khalsa-Moyers G., Alex-andre G., Sukharnikov L.O., Wuichet K., Hurst G.B., McDonald W.H., Robertson J.S., Barbe V., Calteau A., Rouy Z., Mangenot S., Prigent-Combaret C., Normand P., Boyer M., Siguier P., Dessaux Y., Elmerich C., Con-demine G., Krishnen G., Kennedy I., Paterson A.H., Gonzalez V., Mavingui P., Zhulin I.B. *Azospirillum* ge-nomes reveal transition of bacteria from aquatic to ter-restrial environments // *PLoS Genet.* 2011. V. 7. Art. e1002430.
- Yagoda-Shagam J., Barton L.L., Reed W.P., Chiovetti R. Fluorescein isothiocyanate-labeled lectin analysis of the surface of the nitrogen-fixing bacterium *Azos-pirillum brasilense* by flow cytometry // *Appl. Environ. Microbiol.* 1988. V. 54. P. 1831–1837.
- Yegorenkova I.V., Konnova S.A., Sachuk V.N., Ignatov V.V. *Azospirillum brasilense* colonisation of wheat roots and the role of lectin–carbohydrate interactions in bacteri-al adsorption and root-hair deformation // *Plant Soil.* 2001. V. 231. P. 275–282.

EXPERIMENTAL ARTICLES

Analysis of Electrophysical Profiles of Plankton and Biofilm Cells on the Model of *Azospirillum baldaniorum* Bacteria

A. V. Sheludko^{1, *}, S. S. Evstigneeva¹, E. M. Telesheva¹, Yu. A. Filip'echeva¹,
L. P. Petrova¹, D. I. Mokeev¹, I. V. Volokhina¹, I. V. Borisov¹, V.D. Bunin², O. I. Guliy^{1, **}

¹*Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Federal Research Center
"Saratov Scientific Center of the Russian Academy of Sciences", Saratov, 410049, Russia*

²*EloSystem GbR, Berlin 13407, Germany*

^{*}, ^{**}*e-mail: shel71@yandex.ru; guliy_olga@mail.ru*

Biofilm formation is a widespread phenomenon in the world of microbes. They can affect human and animal health, cause damage to various industries, and at the same time can be useful in areas such as wastewater treatment or increasing the bioavailability of nutrients for plants. This actualizes the development of biofilm research methods. In this paper, an optical sensor method for indicating bacterial biofilm formation taking into account biological variability is described for the first time using the example of plant growth-stimulating rhizobacteria of the genus *Azospirillum*. A correlation was found between changes in the electrophysical parameters recorded by the sensor system and morphological features of bacteria from planktonic and/or biofilm cultures: the presence of motor organelles (flagella), polymorphism and ultrastructure of cellular forms. It was found that the profile of microbial cells recorded by the optical system in planktonic and biofilm forms differs significantly. When comparing cells of different strains (parent strain and its derivatives) or planktonic and biofilm bacteria, the variables recorded by the electro-optical sensor system are consistent with the changes in the micro- and ultrastructure of bacteria recorded by us using other methods. The results of the analysis of the electrophysical profiles of *A. baldaniorum* Sp245 can be used as a reference for identifying the specificity of the interaction of biofilm cells of this strain with various components of the root surface of the putative plant partner using an optical sensor system.

Keywords: *Azospirillum baldaniorum*, biosensors, flagella, motility, biofilms, ultrastructure

УДК 579.24+577.171.5+57.05

ИЗМЕНЕНИЯ БЕЛКОВЫХ ПРОФИЛЕЙ ПЛАНКТОННЫХ КУЛЬТУР И БИОПЛЕНОК *STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS*, ВЫРАЩЕННЫХ В АНАЭРОБНЫХ УСЛОВИЯХ В ПРИСУТСТВИИ ГОРМОНА CNP¹

© 2024 г. А. В. Ганнесен^{а, *}, Р. Х. Зиганьшин^б, М. А. Овчарова^а,
А. М. Мосолова^а, Н. А. Логинова^а, Е. В. Дювенжи^а, Е. Д. Неволлина^а,
С. В. Мартянов^а, В. К. Плакунов^а

^аФИЦ “Фундаментальные основы биотехнологии” РАН, Москва, 119071, Россия

^бИнститут биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
Москва, 117997, Россия

*e-mail: andrei.gannesen@gmail.com

Поступила в редакцию 18.06.2024 г.

После доработки 22.07.2024 г.

Принята к публикации 22.07.2024 г.

Натрийуретические пептиды (natriuretic peptides, NP) способны влиять на биопленки микроорганизмов-комменсалов человека, в том числе на представителей рода *Staphylococcus*, однако в литературе отсутствуют данные о молекулярных изменениях, вызываемых данными гормонами на посттрансляционном уровне. В связи с этим в настоящей работе впервые показано, что натрийуретический пептид С-типа (CNP) вызывает большие изменения в белковых профилях клеток и биопленок стафилококка. Присутствие гормона приводит к более выраженному различию в белковых профилях между планктонными клетками и биопленками при сравнении с контрольными парами образцов. Основные процессы, которые при этом затрагиваются – ЦТК, транспорт белков, синтез пуринов (понижение количества соответствующих белков в биопленках) и метаболизм нитрата (повышение количества нитрогеназа и других белков в биопленках). Необходимо отдельно упомянуть понижение количества лизоцифина в биопленках по сравнению с планктонными культурами при воздействии CNP. Возможно, это один из потенциальных механизмов показанного недавно понижения конкурентных свойств *S. epidermidis* в сообществе с другими микроорганизмами, которое индуцируется наличием в среде CNP. Кроме того, результаты исследования укрепляют гипотезу о том, что, как и в случае других гормонов человека, действие CNP на *S. epidermidis* является мультитаргетным. Одним из вероятных механизмов действия гормона может быть нарушение перехода от планктонной культуры к биопленке без подавления роста клеток, что нуждается в дальнейшей проверке.

Ключевые слова: *Staphylococcus epidermidis*, гормоны, натрийуретические пептиды, натрийуретический пептид С-типа, биопленки, микробная эндокринология, протеомика, масс-спектрометрия методом орбитальной ловушки

DOI: 10.31857/S0026365624060072

В настоящее время данных о воздействии гормонов человека на рост микроорганизмов и их биопленок накоплено достаточно, для того чтобы утверждать, что потенциально любой человеческий гормон является эффектором для любого микроорганизма. Недавний обзор Luqman достаточно подробно систематизирует имеющиеся данные по эффектам основных классов гормонов на самые

различные микроорганизмы (Luqman, 2023). Неудивительно, что микробная эндокринология становится все более популярным направлением исследований по всему миру: появляются новые коллективы, занимающиеся вопросами воздействия гормонов на микробиоту человека, развиваются новые направления, такие как, к примеру, влияние гормонов на чувствительность бактерий к антибиотикам

¹Дополнительные материалы размещены в электронном виде по DOI статьи: <https://doi.org/10.31857/S0026365624060072>

(Kalaycı-Yüksek et al., 2021; Kalaycı-Yüksek et al., 2022; Louis et al., 2022; Diuvenji et al., 2023).

Натрийуретические пептиды (natriuretic peptides, NP) представляют собой небольшие пептиды, имеющие в своем составе кольцообразную структуру, замкнутую дисульфидным мостиком между двумя остатками цистеина (Potter et al., 2009). Они выполняют множество регуляторных функций в организме человека. В частности, натрийуретический пептид С-типа (CNP), состоящий из 22 аминокислот и синтезирующийся в клетках сердца и эндотелия сосудов (в т.ч. капилляров), является одним из важных регуляторов кровяного давления и тонуса сосудов, а также веществом, защищающим от различных сердечных заболеваний, в том числе гипертрофии сердца (Lumsden et al., 2010). Относительно недавно началось постепенное накопление данных о NP как о молекулах, оказывающих эффект на микроорганизмы и, в особенности, на их биопленки. Так, подобный аспект активности NP начал системно исследоваться коллективом под руководством профессора Марка Фейоле (а именно профессора Лезуатье и его коллег, начавших изучение действия CNP на псевдомонады; Veron et al., 2007). В дальнейшем в ходе исследований было показано, что NP способны не только каким-либо образом влиять на моновидовые биопленки микроорганизмов, но и регулировать простейшие бактериальные сообщества — двухвидовые биопленки (Ганнесен и соавт., 2018; Gannesen et al., 2018; Ovcharova et al., 2021; Ovcharova et al., 2023; Дювенжи и соавт., 2022). В частности, показано, что натрийуретические пептиды А- и С-типов способны усиливать конкурентные преимущества *Cutibacterium acnes* относительно *Staphylococcus aureus* и *Staphylococcus epidermidis* в составе двухвидовых биопленок (Ганнесен и соавт., 2018; Gannesen et al., 2018; Ovcharova et al., 2021; Ovcharova et al., 2023). При этом, если в случае сообщества кутибактерий и эпидермального стафилококка эффект гормонов выражается, в том числе в изменении количества биомассы биопленок и экспрессии генов (Ovcharova et al., 2021, Ovcharova et al., 2023), то в случае золотистого стафилококка эффект может быть менее выраженным при пониженных концентрациях гормона. Иногда этот регуляторный эффект может не обнаруживаться традиционными методами, такими как окраска биопленок с помощью кристаллического фиолетового, однако при этом все равно NP оказывают эффект на микроорганизмы. Данное явление было показано на сообществе *S. aureus* и другого кожного микроорганизма *Kytococcus schroeteri*, при этом также эффект натрийуретического пептида А-типа (ANP) на *S. aureus* зависит от присутствия второго микроорганизма — *K. schroeteri* — в сообществе (Дювенжи и соавт., 2022). Французскими коллегами было высказано предположение, что бактерии потенциально могут

обладать рецепторами натрийуретических пептидов, сходными с таковыми у человека, например, это было предположено для *Pseudomonas aeruginosa* и CNP (Rosay et al., 2015). Функцию амидазы AmiC как ортолога рецептора натрийуретических пептидов недавно продемонстрировал коллектив исследователей (Louis et al., 2023), показавший взаимодействие данного белка с остеокином (агонист рецепторов натрийуретических пептидов у человека) и важность присутствия самого пептида для запуска целого каскада биохимических реакций в клетках *P. aeruginosa*. Однако механизм воздействия пептидов на микроорганизмы по-прежнему требует глубокого изучения.

Последние исследования показывают, что гормоны способны изменять чувствительность микроорганизмов к антибиотикам, что весьма перспективно с точки зрения медицинской микробиологии. Так показано, что стероидные гормоны прогестерон и эстрадиол влияют на чувствительность *S. aureus* к ципрофлоксацину и гентамицину (Kalaycı-Yüksek et al., 2023). Показано снижение минимальных ингибиторных концентраций гентамицина и ципрофлоксацина у *S. aureus* и *P. aeruginosa* (в моновидовых и двухвидовых культурах) в присутствии мелатонина и норадреналина (Kalaycı-Yüksek et al., 2021). ANP в зависимости от концентрации меняет чувствительность моновидовых и двухвидовых биопленок *S. aureus* и *K. schroeteri* к азитромицину (Diuvenji et al., 2023), а также изменяет чувствительность *P. aeruginosa* к имипенему, полимиксину В и тобрамицину (Louis et al., 2022). Таким образом, натрийуретические пептиды обладают достаточным потенциалом для дальнейшего исследования в качестве потенциальных адъювантов антибиотиков.

S. epidermidis является одним из наиболее представленных микроорганизмов-комменсалов кожи человека, предпочитающим увлажненные, богатые потовыми железами участки кожи (Grise et al., 2009). Вместе с *Cutibacterium acnes* — еще одним грамположительным микроорганизмом — *S. epidermidis* считается некоторыми исследователями одним из основных акторов, поддерживающих гомеостаз кожной микробиоты, во многом определяющим состояние кожи (Fourniere et al., 2020).

Ранее было исследовано влияние CNP на сообщество *C. acnes* и *S. epidermidis*. Мы показали изменения структуры моновидовых и двухвидовых биопленок, изменения экспрессии генов и конкурентных свойств микроорганизмов в присутствии гормона (Ovcharova et al., 2023).

Целью настоящей работы было исследование белковых профилей планктонных культур и биопленок *S. epidermidis* в присутствии CNP в анаэробных условиях, подобных тем, в которых выращивали сообщества с *C. acnes*, для понимания характера изменений в клетках на уровне трансляции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ
ИССЛЕДОВАНИЯ

Штамм и культивирование. *S. epidermidis* ATCC14990 хранили на столбиках с полужидким лизогенным бульоном (lysogeny broth, LB, “Диаэм”, Россия). Для экспериментов производили рассев на чашки с агаризованной средой LB до отдельных колоний. Затем биомассу колонии засеивали в колбу с 20 мл жидкой LB и культивировали 24 ч при 33°C на качалке (150 об./мин). Посевной материал доводили до оптической плотности 0.5 при длине волны 540 нм стерильным физиологическим раствором (ФР, 0.9% хлорида натрия в дистиллированной воде). Подготовленные таким образом культуры использовали в экспериментах.

Активное соединение. Гормон CNP (“Alfa-Aesar”, США) растворяли в стерильной MilliQ-воде (MQ) и хранили при –20°C. В экспериментах стоковый раствор разбавляли стерильной MQ-водой до необходимой концентрации и добавляли в среду.

Выращивание планктонных культур и биопленок. Для анаэробного культивирования планктонных культур в центрифужные пробирки объемом 50 мл (“Falcon”, США) помещали 50 мл жидкой обогащенной клостридиальной среды (reinforced clostridial medium, RCM) следующего состава (г/л): дрожжевой экстракт (“Диаэм”, Россия) – 13, пептон (“Диаэм”, Россия) – 10, глюкоза (“Диаэм”, Россия) – 5, хлорид натрия (“Диаэм”, Россия) – 5, ацетат натрия (“Реахим”, Россия), крахмал (“Диаэм”, Россия) – 1, гидрохлорид цистеина (“Biomerieux”, Франция) – 0.5; pH 7.0. Затем вносили необходимый объем раствора гормона до конечной концентрации 2.7 пМ и 1 мл подготовленной культуры. 2.7 пМ является нормальной концентрацией в плазме крови человека (Ikeda et al., 2000). Контрольные образцы были без добавок. Образцы инкубировали при 33°C в течение 24 или 72 ч. После культивирования биомассу осаждали центрифугированием при 4000 g, дважды промывали ФР и переходили к выделению белков.

Биопленки выращивали на целлюлозных подложках (“Озон”, Россия). Кружки из целлюлозной пленки диаметром, равным диаметру чашки Петри, вырезали и автоклавируют при 1 атм

в течение 30 мин. В чашки разливали по 20 мл агаризованной (1.5%) среды RCM с добавлением гормона или без него; после застывания среды располагали на ее поверхности целлюлозную пленку. На поверхность пленки наносили 0.5 мл посевного материала и распределяли по поверхности шпателем. Чашки инкубировали анаэробно в системе GasPak (“BD”, США) с газогенерирующими пакетами Анаэрогаз (“Биом”, Россия), в течение 24 или 72 ч. Далее биомассу собирали в 2 мл микроцентрифужные пробирки (“Eppendorf”, Германия) и приступали к выделению белков.

Выделение белков. Каждый образец биомассы биопленок или планктонных культур ресуспендировали в стерильном ФР и доводили оптическую плотность суспензии до 1 при длине волны 600 нм. 10 мл подготовленных суспензий осаждали центрифугированием при 4000 g и комнатной температуре в течение 30 мин, после чего пеллеты ресуспендировали в 600 мкл лизирующего буфера (табл. 1), как описано ранее (Gannesen et al., 2023).

Затем суспензии переносили в 2 мл пробирки для лизиса, содержащие лизирующую матрицу В (“MP Biomedicals”, США). Биомассу разрушали с помощью прибора-дезинтегратора FastPrep (“MP Biomedicals”, США) на скоростном режиме 6 в течение 20 с пять раз подряд. Затем пробирки центрифугировали при 13000 g в течение 1 мин для осаждения остатков клеток и абразива. Выделение белков контролировали с помощью метода Брэдфорд.

Масс-спектрометрический анализ белков. Анализ протеома проводили, как описано ранее (Gannesen et al., 2023). Белки после лизиса биомассы осаждали ацетоном. К объему лизата, содержащего 2 мкг белков, добавляли 5 объемов ледяного (–20°C) ацетона (“Merck”, Германия), после чего смесь встряхивали на вортексе и оставляли на ночь при –20°C. Затем образцы центрифугировали при 15000 g при 4°C в течение 15 мин, суператант отбрасывали, пеллеты сушили под вакуумом при комнатной температуре.

Восстановление, алкилирование и расщепление белков в растворе проводили, как описано ранее (Kulak et al., 2014), с минимальными изменениями. Буфер для лизиса, восстановления

Таблица 1. Состав лизирующего буфера

Реактив	Объем	Конечная концентрация
Трис-буфер (10×, pH 7.5) – Трис-основание 0.198 M, NaCl 1.51 M; pH 7.5 доводили 1 M HCl	5 мл	1×
ЭДТА (0.5 M)	100 мкл	0.001 M
Тритон X100 10%	5 мл	1%
Фенилметансульфонилфторид (ФМСФ) 10 mM в этаноле	1 мл	0.2 mM
H ₂ O	38.9 мл	

и алкилирования, содержащий 1% (масс-объемный) деоксихолата натрия (ДХН), 100 мМ трис-буфера (pH 8.5), 10 мМ трис-(2-карбоксиэтил)фосфина (ТКЭФ) и 20 мМ 2-хлороацетамида, добавляли к образцам биомассы. Образцы нагревали до 95°C и выдерживали 10 мин. Далее образцы охлаждали, добавляли объем, равный объему каждого образца, 1% (по массе) раствора трипсина в 100 мМ трис-буфере (pH 8.5). Образцы выдерживали при 37°C в течение ночи, после чего подкисляли 1% трифторуксусной кислотой (ТФУ) для связывания с полистирендивинилсульфонатом с обращенной фазой. 20 мкг образца загружали на три наконечника-колонок, добавляли равный объем этилацетата, после чего колонки центрифугировали при 400 g. После отмывания колонок с помощью 100 мкл смеси 1% ТФУ с этилацетатом и последующего отмывания 0.2% ТФУ, пептиды элюировали в 50 мкл элюирующего раствора, содержащего 50% ацетонитрила, 45% воды и 5% аммония. Собранный материал высушивали под вакуумом и хранили при –80°C. Перед анализом пептиды растворяли в 2% растворе ацетонитрила в 0.1% ТФУ и обрабатывали ультразвуком в ультразвуковой ванне в течение 2 мин.

Для масс-спектрометрии образцы загружали в самодельные колонки 20 × 0.1 мм, заполненные сорбентом Intersil ODS3F (“GL Sciences”, Япония) в загрузочном буфере (2% ацетонитрила, 98% воды, 0.1% ТФУ) при скорости потока 10 мкл/мин. Пептиды разделяли при комнатной температуре на колонках из плавленого кремнезема размером 300 × 1 мм, заполненных наполнителем ReproSil-Pur (“Dr. Maisch”, Германия; Kovalchuk et al., 2019), и собирали в эмиттер, изготовленный с использованием пуллера P2000 Laser Puller (“Sutter”, Atlanta, США). Обращенно-фазовую хроматографию выполняли с использованием системы Ultimate 3000 Nano LC (“ThermoFisher”, США), которая была соединена с масс-спектрометром Q Exactive Plus Orbitrap (“ThermoFisher”, США) через источник наноэлектрораспыления (“ThermoFisher”, США). Пептиды помещали в загрузочный раствор (98% 0.1%-ной (об./об.) муравьиной кислоты, 2% (об./об.) ацетонитрила) и элюировали с использованием линейного градиента: 3–35% раствор Б (0.1% (об./об.) муравьиная кислота, 80% (об./об.) ацетонитрил) в течение 105 мин; 35–55% Б в течение 18 мин, 55–99% Б в течение 6 с, 99% Б в течение 10 мин, 99–2% Б в течение 6 с при скорости потока 500 нл/мин. После каждого градиента колонку повторно заполняли раствором А (0.1% (об./об.) муравьиной кислоты, 2% (об./об.) ацетонитрила) в течение 10 мин. Параметры масс-спектрометрии-1 были следующими: разрешение 70К, диапазон сканирования 350–2000; максимальное время инъекции – 30 мс; целевая автоматическая регулировка усиления (APU), 3 × 10⁶. Ионы выделяли в пределах окна 1.4 *m/z* (масса к заряду) с предпочтительным

совпадением пептидов и исключением изотопов. Динамическое исключение было установлено на 30 с. Фрагментация масс-спектрометрии-2 выполнялась в режиме HCD с разрешением 17.5К с энергией столкновения HCD (высокоэнергетическая диссоциация, вызываемая столкновениями ионов; higher-energy collisional dissociation) 29%, максимальным временем инъекции 80 мс, целевым значением APU 1 × 10⁵. Другие настройки: исключение начислений – не назначено, 1, >7.

Необработанные спектры обрабатывали с помощью MaxQuant 1.6.6.0 (Tyanova et al., 2016a) и Perseus (Tyanova et al., 2016b). Анализ в MaxQuant выполняли с набором параметров по умолчанию, включая специфичность трипсин/р-протеазы, максимум 2 пропущенных расщепления, окисление метионина, ацетилирование N-конца белка и дезамидирование NQ в качестве переменных модификаций и карбамидометилирование цистеина в качестве фиксированной модификации, максимум 5 модификаций на каждый пептид, 1% совпадений между пептидами и показатель частоты ложных открытий (false discovery rate, FDR). Все запуски были проанализированы как независимые эксперименты и обработаны в Perseus.

В Perseus результаты групп белков были отфильтрованы на наличие примесей, на наличие обратных последовательностей, отброшены результаты “идентифицированы только по определенному участку”. Использовались только белки со значениями maxLFQ как минимум в 3 из 7 анализов на жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии. Для них недостающие значения были рассчитаны из нормального распределения с шириной параметра сигма-распределения интенсивности 0.3 и смещением центра распределения интенсивности вниз на 1.8.

Анализ протеома *in silico*. Частичную визуализацию белковых кластеров осуществляли с использованием онлайн-ресурса Protein-Protein Interaction Networks Functional Enrichment Analysis STRING (https://string-db.org/cgi/input?sessionId=bJepuA5XwxFl&input_page_show_search=off). Онлайн-анализ белков проводился с использованием базы данных UniProt (<https://www.uniprot.org/>) и белка NCBI BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>).

Статистическая обработка результатов. Опыты проводили в трех независимых повторах. Статистическую обработку результатов вели с помощью программного обеспечения GraphPad PRISM 8.3.0. Для проверки достоверности различий использовали множественный *t*-критерий с дополнительным параметром “SD assuming (more power)”. Коррекцию с учетом средней доли ложных отклонений гипотезы (false discovery rate, FDR) проводили с использованием встроенной функции “two-stage step-up integrated method of Benjamini, Krieger and

Yekutieli” (Benjamini et al., 2006). Статистически значимо изменившимся считали количество тех белков, которые воспроизводимо изменялись одинаковым образом (количество уменьшалось или увеличивалось) во всех статистических повторениях. Поскольку, как было показано ранее, при воздействии гормона количество белков может изменяться на небольшую величину, но при этом статистически воспроизводимо (Gannesen et al., 2023), а также поскольку эффекты гормонов зачастую являются небольшими количественно, но статистически значимыми (Gannesen et al., 2021; Дювенжи и соавт., 2022), было принято считать значимым любое статистически достоверное различие.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование изменений белкового состава планктонных клеток *S. epidermidis* в зависимости от времени культивирования. Вначале сравнивали 72-часовые планктонные культуры с 24-часовыми без добавления гормона. В 72-ч планктонных было обнаружено 28 белков в измененном количестве относительно 24-ч культур, среди которых 16 белков были в пониженном количестве, а 12 — в повышенном (табл. S1). Среди белков в пониженном количестве были различные ферменты; кластеризация с помощью онлайн-сервиса STRING (рис. 1.) позволила выявить два предположительных кластера белков (рис. 1А).

Первый кластер — это потенциально связанные друг с другом белки неизвестной функции — предположительные Zn-зависимые дегидрогеназы и PhnB-подобные белки. Второй кластер включал в себя белок S9 малой субъединицы рибосом и фактор инициации трансляции If-3, который связывается с 30S-субъединицей, сдвигая равновесие от целых рибосом в сторону отдельных субъединиц и увеличивая количество готовых для инициации малых субъединиц рибосом. Среди белков в повышенном количестве в 72-ч контрольных образцах каких-либо кластеров обнаружено не было (рис. 1Б), при этом в основном были представлены ферменты синтазы и транспортные белки, а также белок холодового шока CspA.

При культивировании планктонных культур в присутствии CNP количество белков, которое изменилось в ходе культивирования, увеличилось относительно контрольных образцов и составило 35, из которых 16 были в пониженном количестве, а 19 — в повышенном (табл. S1). Интересно, что среди этих белков только 6 (два в пониженной и 4 в повышенной) совпадали с таковыми в контролях (отмечены стрелками ↓ в табл. S1), что говорит о серьезных изменениях, вызываемых гормоном. STRING-анализ выявил три кластера белков в пониженной концентрации

(рис. 1В). Первый из них (отмечен цифрой 3) состоит из белка рибосом L7/L12, формирующего стебелек на рибосоме, облегчающий взаимодействие с ГТФ-связанными факторами трансляции, и белка DltC — переносчика остатков D-аланила (как правило, переносит его на липотейхоевые кислоты). Второй кластер (цифра 4 на рис. 1В) включает в себя белки экскреции других белков, которые также, вероятно, участвуют в кворум-сенсинге. Наконец, третий кластер (цифра 5) состоит из белков, участвующих в метаболизме липидов-триглицеридов. Таким образом, CNP влияет на экспорт белков, синтез белков и метаболизм липидов в планктонных клетках *S. epidermidis*. Если говорить о белках, количество которых увеличилось в ходе длительного культивирования, то стоит отметить появление большего количества белков процессинга нуклеиновых кислот. Также выявлены кластеры белков синтеза фолата и циклофилинподобных белков (рис. 1Г). Интересно также, что почти в 100 раз повышается содержание в клетках лизостафина, количество которого не изменялось в контрольных образцах. Таким образом, возможно, в присутствии гормона стафилококк накапливает лизостафин в клетках, что может быть связано со снижением количества белков-экспортеров. CNP, вероятно, может понижать конкурентные свойства стафилококка, вынуждая его накапливать весь лизостафин внутри клеток, что может быть объяснением повышения роста *Cutibacterium acnes* в сообществе с *S. epidermidis*, показанного ранее (Ovcharova et al., 2023), однако данная гипотеза нуждается в непосредственной экспериментальной проверке.

Исследование изменений белкового состава биопленок *S. epidermidis* в зависимости от времени культивирования. Исследование биопленок без добавления гормона показало изменение количества 28 белков, из которых количество 11 снижалось, а 17 — повышалось в 72-ч биопленках по сравнению с 24-ч биопленками (табл. S2). При этом, только три изменившихся белка (один в пониженном количестве и два в повышенном) совпадали с таковыми в планктонных культурах, что лишний раз доказывает важность развития биопленочного фенотипа для метаболизма микроорганизмов. Количественному изменению подверглись самые различные по функциям белки, в основном ферменты и транспортные белки. STRING-кластеризация выявила среди белков в понизившемся количестве только кластер транспортных белков, включающий уже наблюдавшийся ранее в планктонных культурах в присутствии CNP транспортный белок SecD (кластер обозначен цифрой 1 на рис. 2А).

Однако при этом не наблюдали накопления лизостафина в клетках. Среди белков в увеличенном количестве был обнаружен кластер

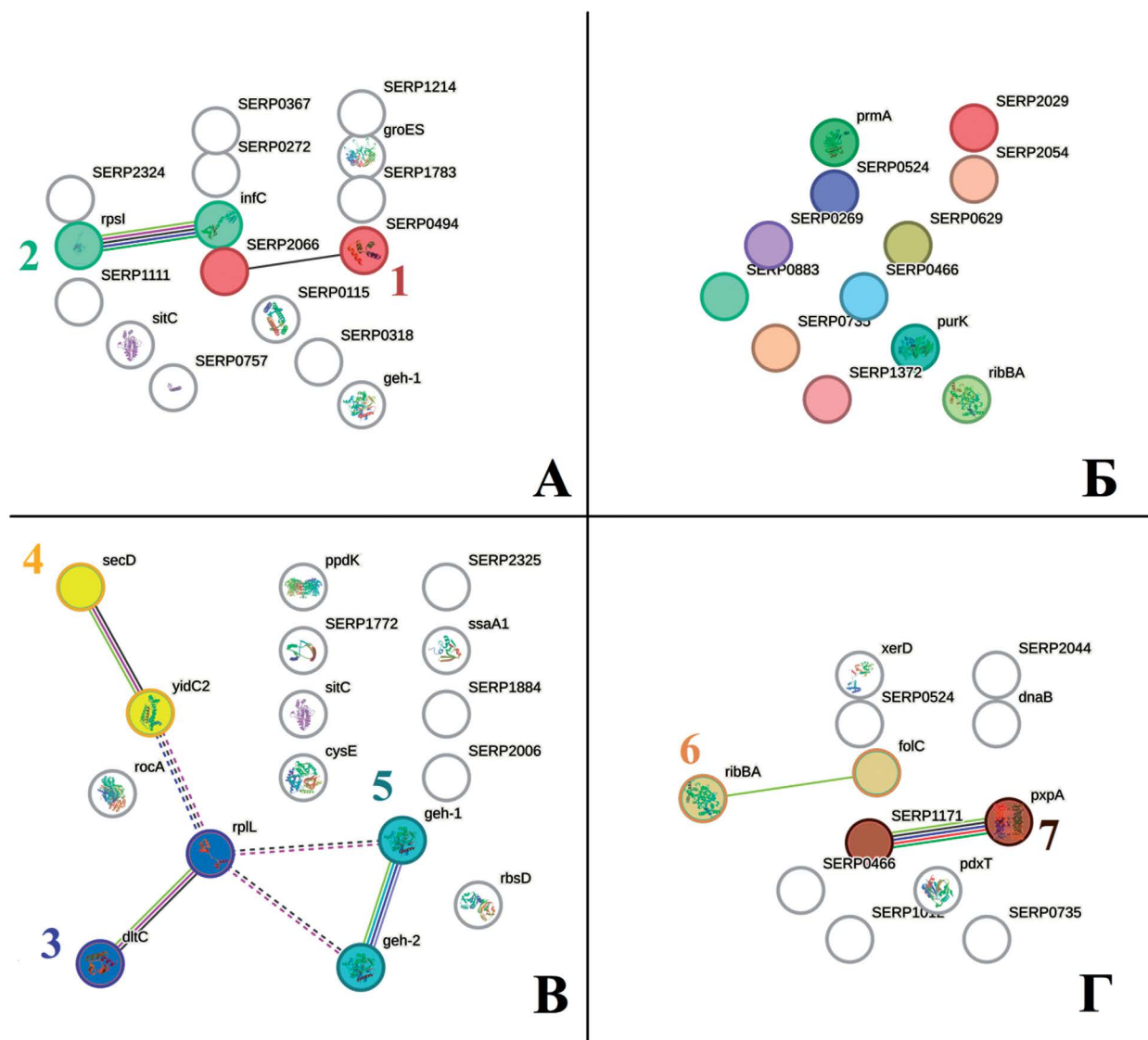


Рис. 1. Изменения белковых профилей планктонных культур в зависимости от времени культивирования. А, Б – контрольные образцы без добавления гормона CNP; В, Г – образцы с добавлением гормона CNP. А, В – белки в пониженном количестве в 72-ч планктонных культурах по сравнению с 24-ч культурами; Б, Г – белки в повышенном количестве в 72-ч планктонных культурах по сравнению с 24-ч культурами. 1 – кластер предполагаемых Zn-зависимых дегидрогеназ и PhnB-подобных белков; 2 – кластер синтеза белков: рибосомального белка S9 и фактора инициации трансляции IF-3; 3 – кластер переносчика D-аланила и рибосомного белка L7/L12; 4 – кластер экскреции белков и, возможно, кворум-сенсинга; 5 – кластер метаболизма липидов (триглицеридов); 6 – кластер белков биосинтеза фолата; 7 – кластер циклофилиноподобных белков семейства MRA-NP.

3,4-дигидрокси-2-бутанон-4-фосфатсинтазы/ГТФ-циклогидролазы II и гуанозин-монофосфатредуктазы (обозначен цифрой 2 на рис. 2Б). Таким образом, потенциально в биопленках *S. epidermidis* без добавления гормона CNP с увеличением времени культивирования также изменяется процесс экскреции белков и метаболизм гуанозин-содержащих фосфатов.

В присутствии CNP, в отличие от планктонных культур, число изменившихся в количестве белков

в биопленках *S. epidermidis* было существенно меньше – всего 19, из которых 4 – в увеличенном количестве в 72-ч биопленках. При этом 8 белков совпадали с таковыми в планктонных культурах, выращенных в присутствии CNP (табл. S2). Интересно, что в биопленках все совпавшие с “планктонными” белки были в пониженном количестве, тогда как в планктонных культурах белок, содержащий домен DUF262, был в увеличенном количестве после 72 ч инкубации. Все эти факты также

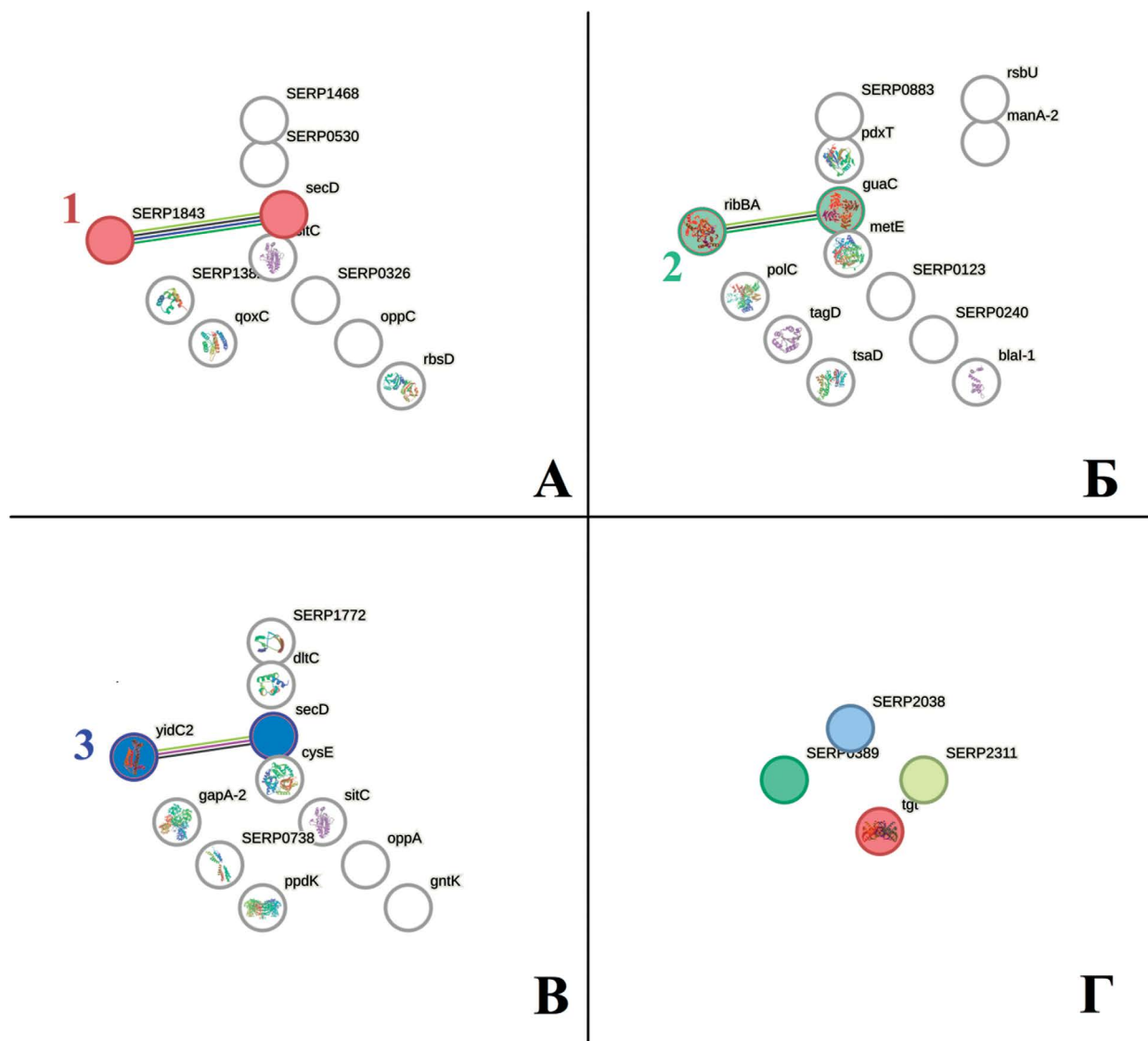


Рис. 2. Изменения белковых профилей биопленок *S. epidermidis* в зависимости от времени культивирования. А, Б – контрольные образцы без добавления гормона CNP; В, Г – образцы с добавлением гормона CNP. А, В – белки в пониженном количестве в 72-ч биопленках по сравнению с 24-ч биопленками; Б, Г – белки в повышенном количестве в 72-ч биопленках по сравнению с 24-ч. 1 – кластер экскреции белков; 2 – кластер 3,4-дигидрокси-2-бутанон-4-фосфатсинтазы/ГТФ-циклогидролазы II и гуанозин-монофосфатредуктазы; 3 – кластер экскреции белков.

показывают глобальный эффект гормона CNP на рост *S. epidermidis*. По аналогии с планктонными культурами, среди пониженных в количестве белков обнаружен кластер экскреции белков (обозначен цифрой 3 на рис. 2В), что позволяет отнести этот процесс к универсальным мишеням CNP у *S. epidermidis*, независимо от фенотипа. Однако при этом не наблюдали накопления лизостафина в 72-ч биопленках в отличие от планктонных культур. Среди белков в повышенных количествах не обнаружено связей, объединяющих их в кластеры (рис. 2Г). В целом изменялось количество

самых различных белков, в основном различных ферментов и транспортных белков.

Сравнение белковых профилей планктонных культур и биопленок. После определения изменений белковых профилей в планктонных культурах и биопленках, связанных со временем культивирования, исследовали различия между планктонными культурами и биопленками. Вначале изучили 24-ч образцы (рис. 3).

Сравнение контрольных образцов биопленок с планктонными культурами показало различие в относительном количестве 38 белков, из которых

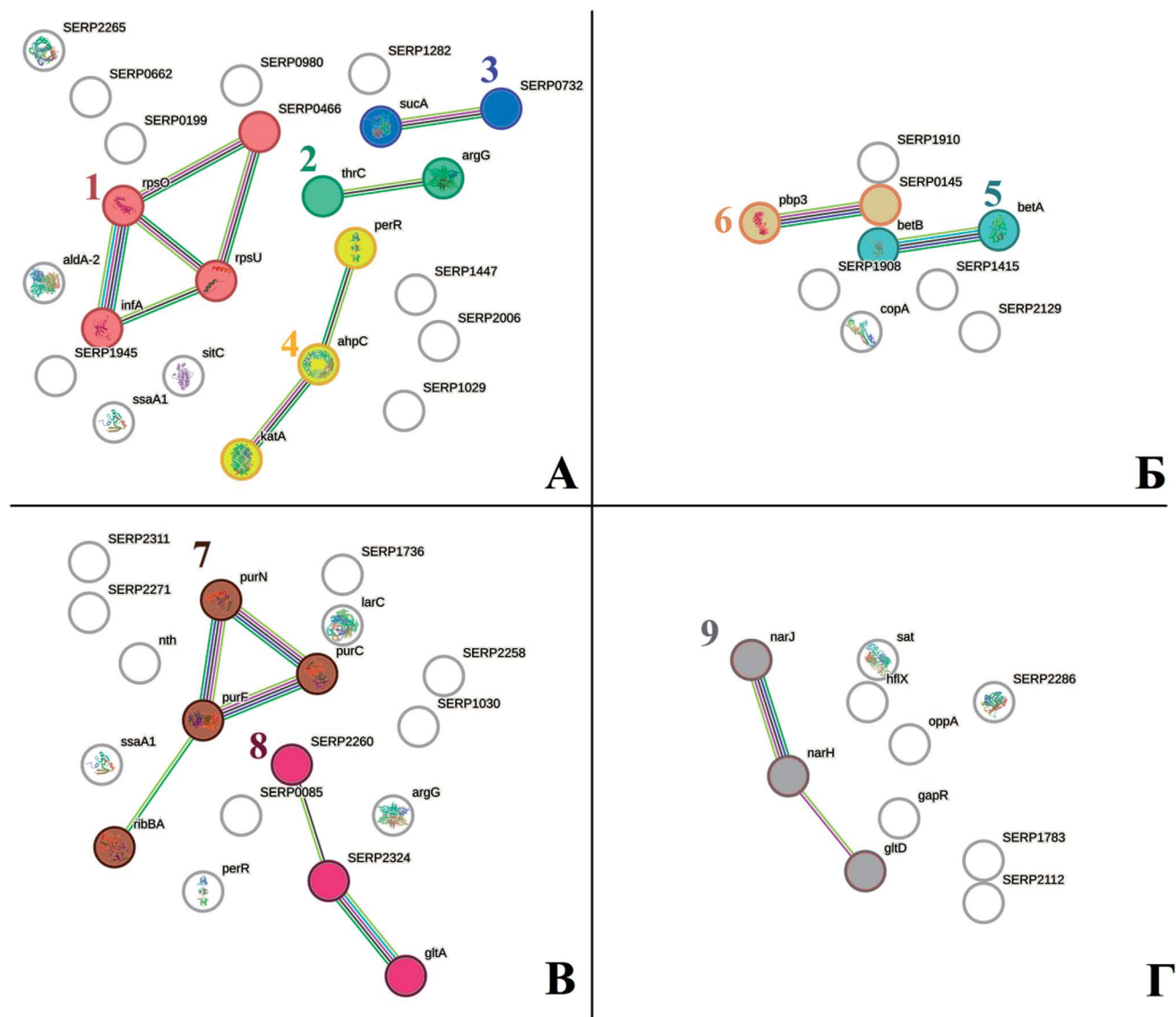


Рис. 3. Изменения белкового состава биопленок *S. epidermidis* по сравнению с планктонными культурами после 24 ч культивирования. А, Б – контрольные образцы; В, Г – образцы в присутствии CNP. А, В – белки в уменьшенном количестве в биопленках по сравнению с планктонными культурами; Б, Г – белки в увеличенном количестве в биопленках по сравнению с планктонными культурами. 1 – кластер синтеза белков и рибосом; 2 – кластер синтеза треонина и аргинина; 3 – кластер белков ЦТК; 4 – кластер белков антиоксидантной защиты; 5 – кластер метаболизма треонина, серина и глицина; 6 – белки клеточной стенки и деления; 7 – кластер белков синтеза пуринов и вторичных метаболитов; 8 – кластер белков ЦТК; 9 – кластер белков метаболизма нитрата.

28 были в уменьшенном количестве, 10 – в увеличенном (табл. S3), что в целом характеризует как минимум частичное замедление метаболизма в биопленках, подтверждая, таким образом, общие характеристики беспленочного фенотипа. Интересно, что транспортный белок Q5HRA3, понижавшийся в 72-ч планктонных культурах по сравнению с 24-ч, понижался и в 24-ч биопленках. Это может свидетельствовать о схожести старых планктонных культур с биопленками в том, что, вероятно,

при старении культур в них происходят некоторые сходные с “био пленочными” процессы. При этом если белка холодового шока CspA в 72-ч планктонных культурах становилось больше, то в 24-ч биопленках по сравнению с 24-ч планктонными культурами его, напротив, было меньше. В целом, в рамках данных периодов культивирования нельзя сказать, что 72-ч планктонные культуры сильно приближались по фенотипическим свойствам к биопленкам. Так, в биопленках явно замедлялись процессы

синтеза белков (кластер 1 на рис. 3А), синтез некоторых аминокислот (треонина и аргинина, кластер 2 на рис. 3А), работа цикла трикарбоновых кислот (кластер 3 на рис. 3А), а также понижалось количество белков антиоксидантной защиты (кластер 4 на рис. 3А). При этом увеличивалось количество белков метаболизма треонина, серина и глицина (кластер 5 на рис. 3Б), и, по-видимому, изменялись процессы синтеза и устойчивость клеточных стенок, что выражалось в увеличении белка деления DivIC и пенициллин-связывающего белка Phb3, который в том числе участвует в синтезе пептидогликана (кластер 6 на рис. 3Б). Кроме того, поскольку этого белка становится больше в клетках биопленок *S. epidermidis*, вероятно, биопленки 24-часовые стафилококка становятся более устойчивыми к действию пенициллинов по сравнению с планктонными культурами. Таким образом, увеличение количества этого белка может быть одним из конкретных механизмов устойчивости биопленок *S. epidermidis* к β -лактамам.

Далее мы проанализировали влияние CNP на различия между планктонными культурами и биопленками после 24 ч культивирования (дополнительные материалы, табл. S4). В отличие от контрольных образцов, изменения затронули 28 белков, из которых 18 были в меньшем количестве в биопленках, а 10 — в большем. Интересно, что набор измененных белков совершенно не содержит повторяющихся с обнаруженными в контрольных образцах. При этом среди белков в уменьшенном количестве был обнаружен кластер белков синтеза пуринов и вторичных метаболитов (кластер 7 на рис. 3В), а также кластер белков ЦТК (кластер 8 на рис. 3В), однако последний содержит три других белка, отличных от таковых в контрольных образцах. Среди белков в увеличенном количестве был обнаружен кластер белков метаболизма нитрата, в том числе дыхательная нитрогеназа (кластер 9 на рис. 3Г). Это может свидетельствовать о повышенной интенсивности анаэробного дыхания в биопленках в присутствии CNP по сравнению с планктонными культурами.

Сравнение 72-ч биопленок относительно планктонных культур показало значительные изменения в метаболизме *S. epidermidis*, произошедшие в течение длительного культивирования. При определении изменений в контрольных образцах было выявлено, что число белков в измененном количестве в биопленках относительно планктонных культур всего 18, из которых 4 — в увеличенном количестве (дополнительные материалы, табл. S3). Большинство из измененных белков приходилось на различные ферменты и транспортные белки, а также среди сниженных белков обнаружен фрагмент фактора элонгации Ef-Tu. При этом совпадений с 24-ч образцами обнаружено не было. Среди белков в сниженном количестве был обнаружен

кластер 2-оксоизовалератдегидрогеназы E3 и глутаматдегидрогеназы (кластер 1 на рис. 4А).

Белки в повышенном количестве не формировали кластеры, среди них, вероятно, стоит отметить цинк-зависимую алкогольдегидрогеназу и ди-ацетилредуктазу, формирующую ацетоин.

В присутствии CNP метаболизм 72-ч биопленок и планктонных культур кардинально менялся. Во-первых, число измененных белков составило 50, из которых 41 — в пониженном количестве (дополнительные материалы, табл. S4). Во-вторых, только один белок, а именно E5FXR0 фрагмент фактора элонгации Ef-Tu, повторялся в наборе измененных белков в образцах с CNP и в контрольных, что говорит, в целом, о потенциально замедленной трансляции в биопленках независимо от присутствия гормона. При этом CNP в среде приводил к появлению большого количества различий в белковых профилях (рис. 4В, 4Г). Так, среди белков в сниженном количестве был обнаружен кластер 3,4-дигидрокси-2-бутанон-4-фосфатсинтазы/ГТФ-циклогидролазы II и гуанозин-монофосфатредуктазы (кластер 2 на рис. 4В), который был в повышенном количестве в 72-ч планктонных культурах относительно 24-ч в присутствии CNP. Таким образом, эти белки каким-то образом реагируют на присутствие гормона в среде. Затем были понижены кластер белков кворум-сенсинга на основе фенол-растворимых модулинов (кластер 3 на рис. 4В) синтеза пуринов через фолат (кластер 4 на рис. 4В), белки синтеза тиамина (кластер 5 на рис. 4В) и метаболизма глицеролипидов (кластер 6 на рис. 4В). Большой кластер из 9 белков ЦТК и метаболизма углерода (кластер 7 на рис. 4В) был в сниженном количестве, что в совокупности с предыдущими кластерами позволяет предполагать значительное замедление метаболизма биопленок стафилококка относительно планктонных культур в присутствии CNP. При этом среди белков в повышенном количестве в биопленках обнаружен кластер из 4 белков метаболизма нитрата, в т.ч. дыхательной нитрогеназы (кластер 8 на рис. 4Г), что позволяет предположить интенсификацию анаэробного дыхания. Гипотетически (нуждается в экспериментальном подтверждении), это может означать переключение с брожения на дыхание, однако каким образом это может быть сопряжено с замедлением ЦТК, остается неясным. Наконец, важно отметить также сильное снижение количества лизостафина в биопленках по сравнению с планктонными культурами в присутствии гормона. Учитывая, что в планктонных клетках количество лизостафина в присутствии CNP увеличивалось при длительном культивировании, вероятно, CNP каким-то образом регулирует антибактериальную активность *S. epidermidis*, увеличивая ее именно в планктонных клетках, но не в биопленках при

Таблица 2. Белки, меняющие свою концентрацию при воздействии CNP в планктонных культурах *S. epidermidis*; ↑ — увеличение, ↓ — уменьшение концентрации

ID	Название	Кратность изменения, разы	MS/MS счет	Значение Q	Молекулярный вес, кДа
24 ч культивирования					
Q5HPP9	Белок, содержащий тиамин-связывающий домен	0.07↓	180	0	10.876
Q5HR66	Белок, содержащий домен DUF402	24.15↑	11	0.000771	23.697
72 ч культивирования					
A0A829LY46	Пиримидиннуклеозид-фосфорилаза	0.02↓	1	0	46.226
Q5HRT4	Малая субъединица глутаматсинтазы	0.11↓	20	0	54.709
Q5HQD8	Белок, содержащий домен DUF2187	0.12↓	39	0	7.0089
A0A8I0WAQ6	Компонент E1 α-субъединицы пируватдегидрогеназы	9.19↑	45	0	41.514
A0A829LRQ6	Неохарактеризованный белок	12.02↑	16	0.005682	88.742
Q5HDW7	Белок uS17 малой субъединицы рибосом	36.04↑	5	0	10.175

в присутствии гормона CNP, а также, чтобы соотнести результаты проверки экспрессии генов, полученные ранее (Ovcharova et al., 2023), провели сравнение белковых профилей контрольных образцов и образцов с CNP планктонных культур и биопленок. В планктонных культурах после 24 ч культивирования изменялось количество двух белков (табл. 2), при этом эти белки не соответствовали генам, экспрессия которых снижается в присутствии CNP, как было показано ранее (Ovcharova et al., 2023).

Один из белков способен связывать тиамин, его количество снижалось в присутствии гормона, что отчасти согласуется с данными, полученными при сравнении 72-ч биопленок с планктонными культурами в присутствии CNP. По-видимому, биосинтез тиамина каким-то образом регулируется CNP у *S. epidermidis*. Функция второго белка неизвестна, однако его количество повышалось в присутствии гормона более чем в 20 раз. В 72-ч планктонных культурах происходило больше изменений под действием гормона: три белка уменьшались в количестве, а три — повышались, при этом все они обладают разными функциями, и затруднительно определить причину данного изменения. Это является следствием мультитаргетного воздействия CNP на клетки и также, по-видимому, результатом процессов второго и более порядка относительно добавления CNP (изменения, непосредственно спровоцированные гормоном, вероятно, могли вызывать каскады реакций в клетках, что приводило к изменению концентрации различных белков).

Суточные биопленки были более восприимчивы к действию гормона, чем планктонные культуры. В совокупности с описанными выше данными

это позволяет предположить, что CNP действует преимущественно на биопленки, что подтверждается ранее полученными данными (Ovcharova et al., 2023). Как и в случае с планктонными культурами, белки различных функций были затронуты гормоном, однако пять белков были схожи с таковыми, которые изменялись в 72-ч биопленках по сравнению с планктонными культурами в присутствии CNP (табл. 3).

Примечательно, что белки D4FK92 и D2JC70 были в увеличенном количестве под действием CNP в 24-ч биопленках по сравнению с контрольными биопленками, тогда как при сравнении планктонных культур и биопленок после 72 ч культивирования количество этих белков в биопленках было меньше. Вероятно, эти белки могут быть каким-то образом задействованы в ответе клеток *S. epidermidis* на присутствие гормона. При сравнении 72-ч биопленок в присутствии CNP с 72-ч биопленками без гормона только один белок был в измененном (уменьшенном) количестве — пируватфосфатдикиназа PpdK. Он входит в состав кластера белков ЦТК. Вероятно, данный белок является ключевым белком, который может быть косвенно или напрямую связан с акцептированием CNP в клетках *S. epidermidis*.

Говоря в целом о влиянии гормона CNP на *S. epidermidis*, можно утверждать, что эффект CNP на планктонные культуры и биопленки *S. epidermidis* в анаэробных условиях сложен и неоднозначен. Обобщающая схема эффектов приведена на рис. 5.

Однозначно трудно определить, что конкретно является мишенью действия гормона, поскольку изменения, вызываемые CNP, носят, судя по всему, глобальный характер, учитывая большие

Таблица 3. Белки, меняющие свою концентрацию в биопленках *S. epidermidis* под воздействием CNP; ↑ – увеличение, ↓ – уменьшение концентрации; ↑↓ – белки, которые обнаружены при сравнении 72-ч планктонных культур и биопленок в присутствии CNP

ID	Название	Кратность изменения, разы	MS/MS счет	Значение Q	Молекулярный вес, кДа
24 ч культивирования					
Q5HGH6	Белок uS2 малой субъединицы рибосом	0.11↓	53	0	29.395
D4FL23	Белок, содержащий домен DUF4064	0.14↓	7	0	22.143
A0A4Y7VUY2↑↑	Альдегидалькоголь-дегидрогеназа	0.16↓	1855	0	95.659
A0A8I0WBA0↑↑	Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа	0.16↓	142	0	36.148
D2JC70↑↑	Белок, содержащий домен DUF262	5.32↑	12	0.002874	73.392
D4FK92↑↑	Пептид субстрат-связывающего белка ABC-транспортера 5	11.37↑	21	0	61.386
A0A8I0WB17	Триптофан-тРНК-лигаза	12.77↑	28	0	37.278
A0A8I1BDW7	Минирибонуклеаза 3	15.86↑	5	0	14.88
A0A829LRQ6	Неохарактеризованный белок	50.85↑	16	0.005682	88.742
72 ч культивирования					
D4FKZ3↑↑	Пируватфосфатдикиназа	0.09↓	435	0	98.1

различия в составе белков, которые изменяются при переходе от планктонного образа существования к биопленочному. При этом непосредственно сам по себе CNP меняет относительно небольшое число белков, если сравнивать обработанные образцы с необработанными (планктонные культуры с планктонными культурами и биопленки с биопленками). Кроме того, эффект гормона зависит от времени инкубации. Однако, несмотря на общую сложность ответа *S. epidermidis* на присутствие гормона в среде, можно обозначить одну важную закономерность: в присутствии гормона ярче проявлялась разница между планктонными культурами и биопленками. Это выражалось как в большем количестве белков, изменявшихся при переключении фенотипа с планктонного на биопленочный, так и в большем количестве функциональных кластеров белков. Необходимо отметить, несмотря на относительно небольшое количество белков, которые изменяются при действии CNP в планктонных культурах и биопленках, более обширные изменения при фенотипическом переходе дают дополнительное подтверждение направленности действия CNP именно на биопленки и их формирование. Это коррелирует с результатами предыдущей работы (Ovcharova et al., 2023), в которой показано отсутствие эффекта CNP на оптическую плотность планктонной культуры стафилококка и одновременное подавление роста биопленок. Поскольку в присутствии CNP в биопленках *S. epidermidis* потенциально как минимум отчасти замедляется

работа ЦТК, синтеза пуринов и других процессов, по-видимому, CNP не оказывает подавляющего эффекта на рост планктонной биомассы и уже сформированных биопленок (в пользу последнего говорит достаточно небольшое количество измененных белков), но замедляет формирование биопленок из планктонной культуры. На основании сравнения планктонных культур и биопленок в присутствии CNP можно также предположить, что, вероятно, при воздействии гормона на *S. epidermidis* в формирующихся в присутствии CNP биопленках происходит некое переключение катаболических процессов в сторону нитратного дыхания. Также весьма интересно, что при длительном культивировании планктонных культур в клетках *S. epidermidis* накапливается лизостафин. Связано ли это с нарушением экспорта пептидов или по другой причине, — предстоит изучать в будущем, однако в биопленках при этом в присутствии CNP лизостафина гораздо меньше, чем в планктонных клетках. Может ли это каким-либо образом быть связано с уменьшением конкурентных свойств эпидермального стафилококка, показанного ранее в отношении *S. acnes*, нужно исследовать отдельно, поскольку более между образцами подобной разницы обнаружено не было. Тем не менее, возможно, при росте биопленок из планктонных культур в присутствии гормона это может быть одним из механизмов понижения конкурентных свойств *S. epidermidis*, вызываемых NP. Наконец, поскольку в большинстве случаев в присутствии гормона так или иначе изменяются белки, связанные с ЦТК,

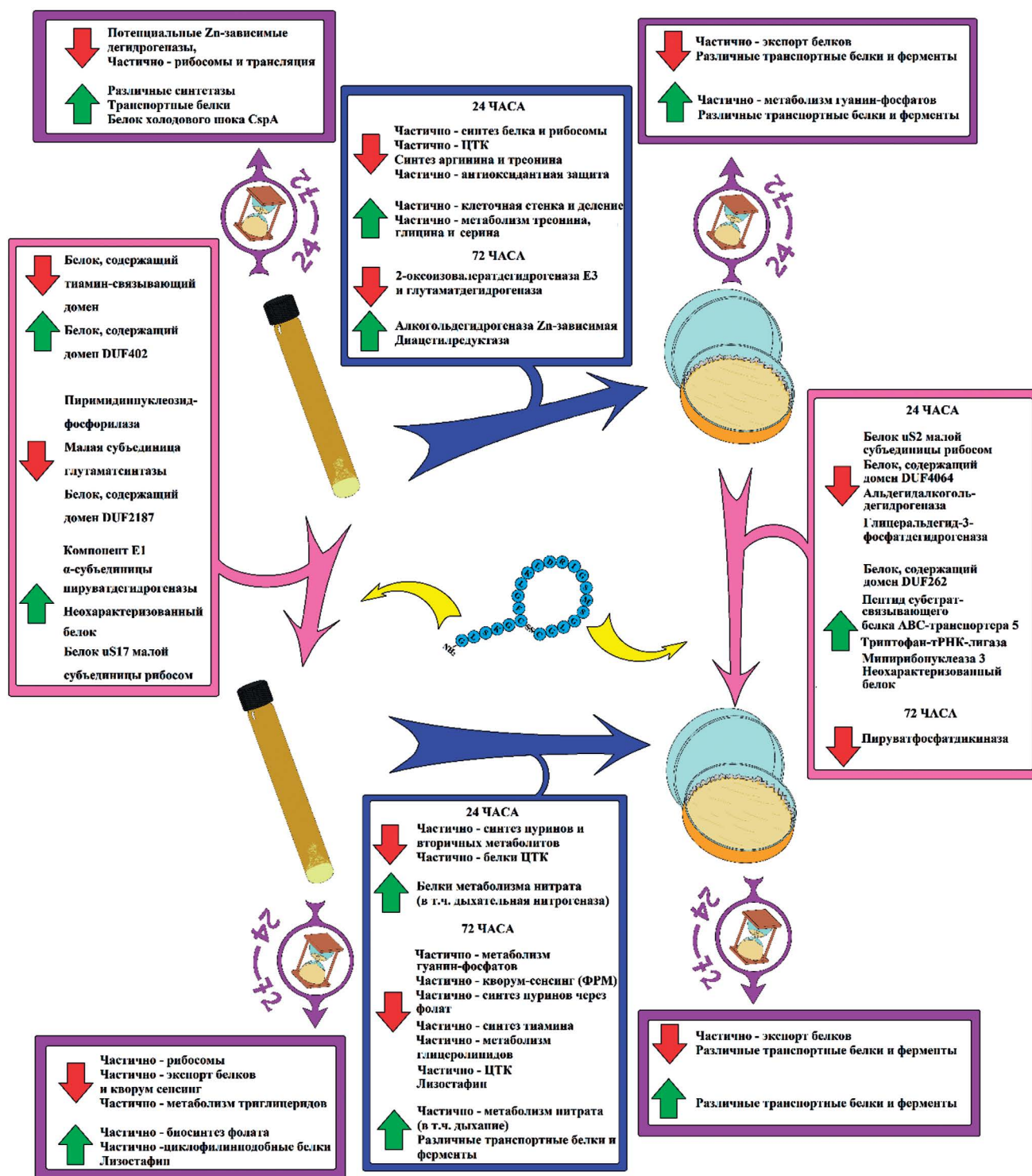


Рис. 5. Обобщающая схема, иллюстрирующая эффекты CNP на белковый состав планктонных культур и биопленок *S. epidermidis*, а также различия в белковых профилях между планктонными культурами и биопленками стафилококка.

вероятно, этот процесс является одной из мишеней действия гормона наряду с транспортом и синтезом белков и аминокислот.

Подводя итог, стоит отметить, что вопрос механизма действия CNP на *S. epidermidis* остается неясным и требует дальнейшего изучения.

Большое количество измененных белков и, что важно, отсутствие корреляции между экспрессией генов (Ovcharova et al., 2023) и измененными белками как минимум в исследованной временной точке говорит, во-первых, о потенциально мультитаргетном действии гормона. Во-вторых, это свидетельствует об эффекте CNP, по всей видимости, на транскрипционном, трансляционном и, вероятно, даже посттрансляционном уровнях. По крайней мере одним из механизмов действия CNP на *S. epidermidis* может являться взаимодействие гормона с N-ацетомурамоил-L-аланинамидазой — белком, на 38.74% сходным по структуре с амидазой *AmiC P. aeruginosa* (согласно анализу, проведенному с помощью NCBI Protein BLAST). Ранее было предсказано, что *AmiC* псевдомонад структурно сходна с рецептором натрийуретического пептида NRP-C (Rosay et al., 2015), а также показано взаимодействие *AmiC* с остеокрином — агонистом рецепторов натрийуретических пептидов человека (Louis et al., 2023). Таким образом, обладая белком, сходным по структуре, *S. epidermidis* может воспринимать CNP подобно псевдомонадам, что тем не менее требует дальнейшего исследования.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят коллектив лаборатории молекулярной экологии и филогеномики бактерий (зав. лаб. С.Н. Дедыш) и персонально С.Э. Белову, А.А. Иванову и И.Ю. Ошкина за любезное предоставление доступа к прибору FastPrep и помощь в разрушении биомассы клеток и биопленок.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 19-74-10071). Работа В.К. Плакунова выполнена частично за счет средств Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

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

- Ганнесен А.В., Лезуатье О., Нетрусов А.И., Плакунов В.К., Фейоле М.Ж. Регуляция натрийуретическими пептидами формирования моновидовых и бинарных биопленок бактерий микробиоты кожи *Staphylococcus epidermidis* и *Staphylococcus aureus* // Микробиология. 2018. Т. 87. С. 469–482.
- Gannesen A.V., Lesouhaitier O., Netrusov A.I., Plakunov V.K., Feuilloy M.G. Regulation of formation of monospecies and binary biofilms by human skin microbiota components, *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*, by human natriuretic peptides // Microbiology (Moscow). 2018. V. 87. P. 597–609.
- Дювенжи Е.В., Неволлина Е.Д., Мартыанов С.В., Журина М.В., Калмантаева О.В., Макарова М.А., Бочкова Е.А., Фирстова В.В., Плакунов В.К., Ганнесен А.В. Бинарные биопленки *Staphylococcus aureus* 209P и *Cytococcus schroeteri* H01: дуалистическая роль китоккокков и изменения клеточной адгезии в присутствии натрийуретического пептида а-типа // Микробиология. 2022. Т. 91. С. 597–612.
- Diuvengi E.V., Nevolina E.D., Mart'yanov S.V., Zhurina M.V., Kalmantaeva O.V., Makarova M.A., Botchkova E.A., Firstova V.V., Plakunov V.K., Gannesen A.V. Binary biofilms of *Staphylococcus aureus* 209P and *Cytococcus schroeteri* H01: dualistic role of kytococci and cell adhesion alterations in the presence of the A-type natriuretic peptide // Microbiology (Moscow). 2022. V. 91. P. 563–576.
- Benjamini Y., Krieger A.M., Yekutieli D. Adaptive linear step-up procedures that control the false discovery rate // Biometrika. 2006. V. 93. P. 491–507.
- Gannesen A.V., Lesouhaitier O., Racine P.J., Barreau M., Netrusov A.I., Plakunov V.K., Feuilloy M.G.J. Regulation of monospecies and mixed biofilms formation of skin *Staphylococcus aureus* and *Cutibacterium acnes* by human natriuretic peptides // Front. Microbiol. 2018. V. 9. Art. 2912.
- Gannesen A.V., Ziganshin R.H., Ovcharova M.A., Nevolina E.D., Klimko A.I., Mart'yanov S.V., Plakunov V.K. Epinephrine affects ribosomes, cell division, and catabolic processes in *Micrococcus luteus* skin strain C01: revelation of the conditionally extensive hormone effect using orbitrap mass spectrometry and proteomic analysis // Microorganisms. 2023. V. 11. Art. 2181.
- Ikeda K., Ikeda T., Onizuka T., Terashi H., Fukuda T. C-type natriuretic peptide concentrations in the plasma and cerebrospinal fluid of patients with subarachnoid hemorrhage // Crit. Care. 2000. V. 5. P. 37–40.
- Kalaycı-Yüksek F., Gümüş D., Anğ-Küçük M. Hormones can influence antibiotic susceptibilities even in mono- and co-culture conditions // Acta Biologica Marisensis. 2021. V. 4. P. 39–49.
- Kalaycı-Yüksek F., Gümüş D., Güler V., Uyanık-Öcal A., Anğ-Küçük M. Progesterone and estradiol alter the growth, virulence and antibiotic susceptibilities

- of *Staphylococcus aureus* // New Microbiol. 2023. V. 46. P. 43–51.
- Kovalchuk S.I., Jensen O.N., Rogowska-Wrzesinska A. FlashPack: fast and simple preparation of ultra-high-performance capillary columns for LC-MS // Mol. Cell. Proteomics. 2019. V. 18. P. 383–390.
- Kulak N.A., Pichler G., Paron I., Nagaraj N., Mann M. Minimal, encapsulated proteomic-sample processing applied to copy-number estimation in eukaryotic cells // Nat. Methods. 2014. V. 11. P. 319–324.
- Louis M., Tahrioui A., Tremlett C.J., Clamens T., Lepince J., Lefranc B., Kipnis E., Grandjean T., Bouffartigues E., Barreau M., Defontaine F., Cornelis P., Feuilloley M.G.J., Harmer N.J., Chevalier S., Lesouhaitier O. The natriuretic peptide receptor agonist osteocrin disperses *Pseudomonas aeruginosa* biofilm // Biofilm. 2023. V. 5. Art. 100131.
- Lumsden N.G., Khambata R.S., Hobbs A.J. C-type natriuretic peptide (CNP): cardiovascular roles and potential as a therapeutic target // Curr. Pharm. Des. 2010. V. 16. P. 4080–4088.
- Lugman A. The orchestra of human bacteriome by hormones // Microb. Pathog. 2023. P. 106125.
- Ovcharova M.A., Geraskina O.V., Danilova N.D., Botchkova E.A., Mart'yanov S.V., Feofanov A.V., Plakunov V.K., Gannesen A.V. Atrial natriuretic peptide affects skin commensal *Staphylococcus epidermidis* and *Cutibacterium acnes* dual-species biofilms // Microorganisms. 2021. V. 9. Art. 552.
- Ovcharova M.A., Schelkunov M.I., Geras'kina O.V., Makarova N.E., Sukhacheva M.V., Mart'yanov S.V., Nevolina E.D., Zhurina M.V., Feofanov A.V., Botchkova E.A., Plakunov V.K., Gannesen A.V. C-type natriuretic peptide acts as a microorganism-activated regulator of the skin commensals *Staphylococcus epidermidis* and *Cutibacterium acnes* in dual-species biofilms // Biology. 2023. V. 12. Art. 436.
- Potter L.R., Yoder A.R., Flora D.R., Antos L.K., Dickey D.M. Natriuretic peptides: their structures, receptors, physiologic functions and therapeutic applications // cGMP: Generators, effectors and therapeutic implications. Handbook of experimental pharmacology / Eds. Schmidt H.H.H.W., Hofmann F., Stasch J.P. V. 191. Berlin, Heidelberg: Springer, 2009. P. 341–366. https://doi.org/10.1007/978-3-540-68964-5_15
- Rosay T., Bazire A., Diaz S., Clamens T., Blier A.S., Mijouin L., Hoffmann B., Sergent J.A., Bouffartigues E., Boireau W., Vieillard J., Hulen C., Dufour A., Harmer N.J., Feuilloley M.G.J., Lesouhaitier O. *Pseudomonas aeruginosa* expresses a functional human natriuretic peptide receptor ortholog: involvement in biofilm formation // MBio. 2015. V. 6. 4. Art. 10.1128/mbio.01033-15.
- Tyanova S., Temu T., Cox J. The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics // Nat. Protoc. 2016a. V. 11. P. 2301–2319.
- Tyanova S., Temu T., Sinicyn P., Carlson A., Hein M.Y., Geiger T., Mann M., Cox J. The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote) omics data // Nat. Methods. 2016b. V. 13. P. 731–740.
- Veron W., Lesouhaitier O., Pennanec X., Rehel K., Leroux P., Orange N., Feuilloley M.G.J. Natriuretic peptides affect *Pseudomonas aeruginosa* and specifically modify lipopolysaccharide biosynthesis // FEBS J. 2007. V. 274. P. 5852–5864.

EXPERIMENTAL ARTICLES

Changes in the Protein Profiles of Planktonic Cultures and Biofilms of *Staphylococcus epidermidis* under Anaerobic Conditions in the Presence of the Hormone CNP

A. V. Gannesen^{1, *}, R. H. Ziganshin², M. A. Ovcharova¹, A. M. Mosolova¹,
N. A. Loginova¹, E. V. Diuvenji¹, E. D. Nevolina¹, S. V. Mart'yanov¹, V. K. Plakunov¹

¹FRC "Fundamentals of biotechnology" of RAS, Moscow, 119071, Russia

²Shemyakin-Ovchinnikov Institute of bioorganic chemistry of RAS, Moscow, 117997, Russia

*e-mail: andrei.gannesen@gmail.com

Natriuretic peptides (NP) are able to affect biofilms of human commensal microorganisms, including representatives of the genus *Staphylococcus*, however, the literature lacks data on the molecular changes caused by these hormones at the posttranslational level. In this regard, the present work shows for the first time that C-type natriuretic peptide (CNP) induces large changes in protein profiles of *Staphylococcus aureus* cells and biofilms. The presence of the hormone leads to a more pronounced difference in protein profiles between planktonic cells and biofilms when compared to control pairs of samples. The main processes affected are TCA cycle, protein transport, purine synthesis (decrease in the amount of the

corresponding proteins in biofilms) and nitrate metabolism (increase in the amount of nitrogenases and other proteins in biofilms). It is necessary to mention separately the decreased amount of lysostaphin in biofilms compared to planktonic cultures when exposed to CNP. This may be one of the potential mechanisms of the recently shown reduction of competitive properties of *S. epidermidis* in the community with other microorganisms, which is induced by the presence of CNP in the medium. In addition, the results of the study strengthen the hypothesis that, as in the case of other human hormones, the action of CNP on *S. epidermidis*, is multitargeted. One of the likely mechanisms of the hormone's action may be the disruption of the transition from planktonic culture to biofilm, which can be assumed without suppressing cell growth, which needs further verification.

Keywords: *Staphylococcus epidermidis*, hormones, natriuretic peptides, C-type natriuretic peptide, biofilms, microbial endocrinology, proteomics, orbitrap mass-spectrometry

УДК 579.66+663.18

БИОВЫЩЕЛАЧИВАНИЕ МЕДНО-ЦИНКОВОГО КОНЦЕНТРАТА ПРИ РАЗНЫХ ТЕМПЕРАТУРНЫХ РЕЖИМАХ

© 2024 г. А. Г. Булаев^{а, *}, А. В. Артыкова^а, Ю. А. Елкина^а, А. В. Колосов^а,
А. В. Нечаева^а, А. В. Белецкий^а, В. В. Кадников^а, В. С. Меламуд^а, А. В. Марданов^а

^аФИЦ “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071, Россия

*e-mail: bulaev.inmi@yandex.ru

Поступила в редакцию 03.06.2024 г.

После доработки 14.06.2024 г.

Принята к публикации 17.06.2024 г.

Целью данной работы было изучение процесса биовыщелачивания мышьяксодержащего полиметаллического концентрата, содержащего 16.0% Cu, 5.3% Zn и 1.7% As, в разных условиях. Были изучены зависимость выщелачивания цветных металлов от температуры процесса (45 и 55°C) и использования в качестве источников углерода для микробной популяции биореакторов CO₂ и мелассы, а также различия в составе микробных популяций, формирующихся в разных условиях. Было показано, что повышение температуры способствовало увеличению выщелачивания как меди, так и цинка. При более высокой температуре (55°C) применение дополнительных источников углерода значительно влияло на извлечение металлов, тогда как при 45°C извлечение металлов незначительно различалось в разных вариантах эксперимента. Изучение микробных популяций биореакторов показало, что и изменение температуры, и дополнительные источники углерода влияли на микробные популяции, которые сформировались в процессе биовыщелачивания. При использовании диоксида углерода при 45°C общая численность клеток микроорганизмов была в 1.4 раза выше, чем в других вариантах эксперимента, а при 55°C – в 8 раз. Кроме того, наблюдались изменения в соотношениях между микроорганизмами микробных популяций. При 45°C в микробных популяциях преобладали железоокисляющие гетеротрофные археи р. *Ferroplasma*, гетеротрофные археи р. *Cuniculiplasma*, сероокисляющие автотрофные бактерии р. *Acidithiobacillus*, миксотрофные железо- и сероокисляющие бактерии р. *Sulfobacillus*. При 55°C в микробных популяциях преобладали бактерии р. *Sulfobacillus* и железоокисляющие бактерии р. *Leptospirillum*, при этом использование диоксида углерода привело к доминированию бактерий р. *Sulfobacillus*, доля последовательностей фрагментов генов 16S рРНК которых составляла 99.9%.

Ключевые слова: биовыщелачивание, полиметаллические сульфидные концентраты, медь, цинк, ацидофильные микроорганизмы, метабаркодинг

DOI: 10.31857/S0026365624060082

Для получения цветных металлов (главным образом меди) биовыщелачивание используется достаточно широко, но в промышленном масштабе обычно применяется кучное биовыщелачивание бедных медных руд, содержащих вторичные сульфидные минералы меди, такие как ковеллин (CuS) и халькозин (Cu₂S), которые относительно легко подвергаются выщелачиванию (Johnson, Roberto, 2023; Vera Véliz et al., 2023). Реже для получения цветных металлов применяются процессы биовыщелачивания в реакторах с механическим перемешиванием (stirred tank reactor bioleaching, STRB), так как такие процессы требуют больших затрат по сравнению с кучным биовыщелачиванием. Поэтому процессы окисления в биореакторах обычно применяются для переработки упорных золотосодержащих концентратов,

что обеспечивает высокую рентабельность применения технологий реакторного биоокисления (Mahmoud et al., 2017; Belyi, Tupikina, 2023; van Niekerk et al., 2023). На данный момент существует ограниченный опыт применения биовыщелачивания в реакторах для получения цветных металлов, например, биовыщелачивание бедного кобальтсодержащего пиритного концентрата (Morin, d’Hugues, 2007), никелевого концентрата, содержащего мышьяк (Gericke et al., 2023), медного концентрата с высоким содержанием цинка (Gericke et al., 2009).

Причиной использовать реакторное биоокисление, а не пирометаллургические технологии для переработки концентратов, как цветных металлов, так и золота, зачастую является либо присутствие в концентрате токсичных примесей,

таких как мышьяк (Gericke et al., 2023; van Niekerk et al., 2023), либо высокое содержание нескольких металлов (например, и меди, и цинка) в силу особенностей минералогии руды, которые делают невозможным получение высококачественных концентратов меди и цинка с низким содержанием попутных компонентов (Gericke et al., 2009).

Высококачественные медные концентраты, получаемые из сульфидных руд, обычно содержат халькопирит (CuFeS_2) — наиболее распространенный медьсодержащий сульфидный минерал, не содержат большого количества примесей и поэтому могут эффективно перерабатываться пирометаллургическими методами без высоких экологических рисков (Watling, 2006). По этой причине для медных концентратов такого типа фактически отсутствует практическая необходимость поиска альтернативных технологий для их переработки. При этом существует проблема переработки некоторых сульфидных медных и полиметаллических (медно-цинковых и др.) руд, специфический минеральный состав которых либо не позволяет получать концентраты, пригодные для пирометаллургической переработки, либо вынуждает перерабатывать руды с дополнительными затратами. Например, это могут быть руды и концентраты с высоким содержанием мышьяка, полученные из сульфидных руд, содержащих теннантит ($\text{Cu}_{12}\text{As}_4\text{S}_{13}$) и энаргит (Cu_3AsS_4). Их переработка требует применения специальных систем газоочистки во избежание выбросов высокотоксичных летучих As_2O_3 и As_4O_6 (Filippou et al., 2007; Diaz et al., 2018). Кроме того, некоторые полиметаллические руды с высоким содержанием мышьяка не могут быть эффективно переработаны из-за мелкозернистого срастания минералов меди и цинка с пиритом (Васильева, Бодуэн, 2023). Таким образом, для переработки некоторых типов медных руд и получаемых из них концентратов перспективным является разработка новых технологий переработки, в частности, гидрометаллургических, которые позволяют извлекать целевые и попутные компоненты в раствор, избегая образования токсичных газовых выбросов (например, оксидов мышьяка) (Filippou et al., 2007; Васильева, Бодуэн, 2023). Поэтому потенциально перспективным методом для переработки медных концентратов с высоким содержанием вредных примесей (цинка и мышьяка) может являться и биовыщелачивание, в том числе реакторное (Diaz et al., 2018).

Нужно отметить, что процессы биовыщелачивания таких минералов, как халькопирит и сфалерит (ZnS), достаточно хорошо изучены. В частности, показано, что скорость биовыщелачивания халькопирита в значительной степени зависит от температуры и возрастает при ее увеличении (Rodriguez et al., 2003a; Hedrich et al., 2018). Сфалерит легче подвергается биовыщелачиванию по сравнению с халькопиритом и другими минералами меди

(Jyothi et al., 1989), а при биовыщелачивании концентратов, содержащих сфалерит и минералы меди (халькопирит, теннантит), цинк выщелачивается быстрее по сравнению с медью (Bulaev et al., 2020; Елкина и соавт., 2021). Данных о биовыщелачивании таких минералов, как энаргит и теннантит, относительно немного. В частности, данные о влиянии температуры на биовыщелачивание мышьяк-содержащих минералов (энаргита, теннантита) (Munoz et al., 2006; Елкина и соавт., 2020) являются спорными. В работе (Munoz et al., 2006) сравнивали биовыщелачивание энаргита при 35 и 68°C, и было показано, что скорость биовыщелачивания меди возрастала при увеличении температуры. В нашей предыдущей работе (Елкина и соавт., 2020) мы проводили сравнительные исследования биовыщелачивания халькопирита, энаргита и теннантита при температурах 40–60°C. Скорость выщелачивания меди из халькопирита зависела от температуры, достигая максимума при температурах 55–60°C, тогда как в случае биовыщелачивания меди из теннантита и энаргита при увеличении температуры не наблюдалось возрастания скорости выщелачивания меди.

В работе (Roberto, Arévalo Lara, 2023) был обобщен опыт полупромышленных испытаний по кучному биовыщелачиванию руды, содержащей 0.87% Cu (при этом 81% меди содержался в энаргите, а остальная часть — в основном, в халькозине и ковеллине). Было показано, что биовыщелачивание позволило извлечь в раствор до 95% меди из вторичных сульфидных минералов и до 60% меди из энаргита, что указывает на относительную упорность энаргита к биовыщелачиванию.

В работах (Oyama et al., 2020; Okibe et al., 2022) исследовали реакторное биовыщелачивание (при 45°C) концентратов, содержащих энаргит и пирит в различных соотношениях, в присутствии активированного угля. Было показано, что в условиях, которые обеспечивали относительно низкий *Eh* среды (присутствие активированного угля либо относительно низкое содержание пирита), выщелачивание меди увеличивалось. Таким образом, было показано, что снижение *Eh* среды ниже определенного уровня позволяет ускорить выщелачивание меди из энаргита, что ранее было показано и для халькопирита (Nakazawa et al., 1998). В работе (Kondo et al., 2024) исследовали аналогичные закономерности для концентрата, содержащего теннантит, проводя биовыщелачивание в колбах и в реакторе при 45°C. Было показано, что присутствие активированного угля при выщелачивании теннантита также позволило в некоторой степени увеличить извлечение меди, однако эффект различался при проведении эксперимента в разных условиях. При этом в работе (Bulaev et al., 2019) было показано, что зависимость выщелачивания теннантита и энаргита от присутствия хлорид-иона в среде

отличалась от зависимости выщелачивания халькопирита: биовыщелачивание меди из халькопирита ускорялось в присутствии 100 мМ хлорида, тогда как выщелачивание меди из теннантита и энрагита ингибировалось в присутствии хлорид-иона.

Таким образом, анализ работ по биовыщелачиванию минералов теннантита и энрагита, а также концентратов, содержащих данные минералы, показал, что биовыщелачивание является перспективным методом для переработки таких концентратов, однако имеющаяся в литературе информация по зависимости скорости биовыщелачивания мышьяк-содержащих минералов меди является неполной, а зачастую противоречивой.

Ранее в наших работах было показано, что различные источники углерода могут влиять на биоокисление пирит-арсенопиритовых концентратов при повышенной температуре (Bulaev, Boduen, 2022; Bulaev et al., 2023).

Целью данной работы было изучение процесса биовыщелачивания мышьяк-содержащего полиметаллического концентрата, содержащего теннантит, халькопирит и сфалерит, в разных условиях. Была изучена зависимость выщелачивания цветных металлов от температуры процесса (45 и 55°C) и использования в качестве источников углерода для микробной популяции биореакторов CO₂ и мелассы. В данной работе исследовали влияние

на биовыщелачивание медного концентрата источников углерода, поскольку они также могут увеличивать скорости биовыщелачивания меди и цинка.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В экспериментах использовали сульфидный концентрат, содержащий 16.0% меди, 5.3% цинка, 1.7% мышьяка, 28.0% железа, 33.2% сульфидной серы. Основными минералами концентрата были халькопирит (CuFeS₂), теннантит (Cu₁₂As₄S₁₃), сфалерит (ZnS), пирит (FeS₂), а также кварц (SiO₂) (рисунок).

Процесс биоокисления концентрата проводили в непрерывном режиме в лабораторных реакторах объемом 2.5 л при следующих параметрах: аэрация – 5 л/мин, скорости вращения турбинной мешалки – 500 об./мин, температура в разных вариантах эксперимента: 45 и 55°C. Плотность пульпы (Т : Ж) составляла 1 : 10 (100 г концентрата на 1000 мл жидкой среды). Время пребывания в непрерывном режиме составляло 10 сут.

Для проведения экспериментов была использована жидкая питательная среда, содержащая минеральные соли (г/л): (NH₄)₂SO₄ – 0.750, KCl – 0.050, MgSO₄ × 7H₂O – 0.125, K₂HPO₄ – 0.125,

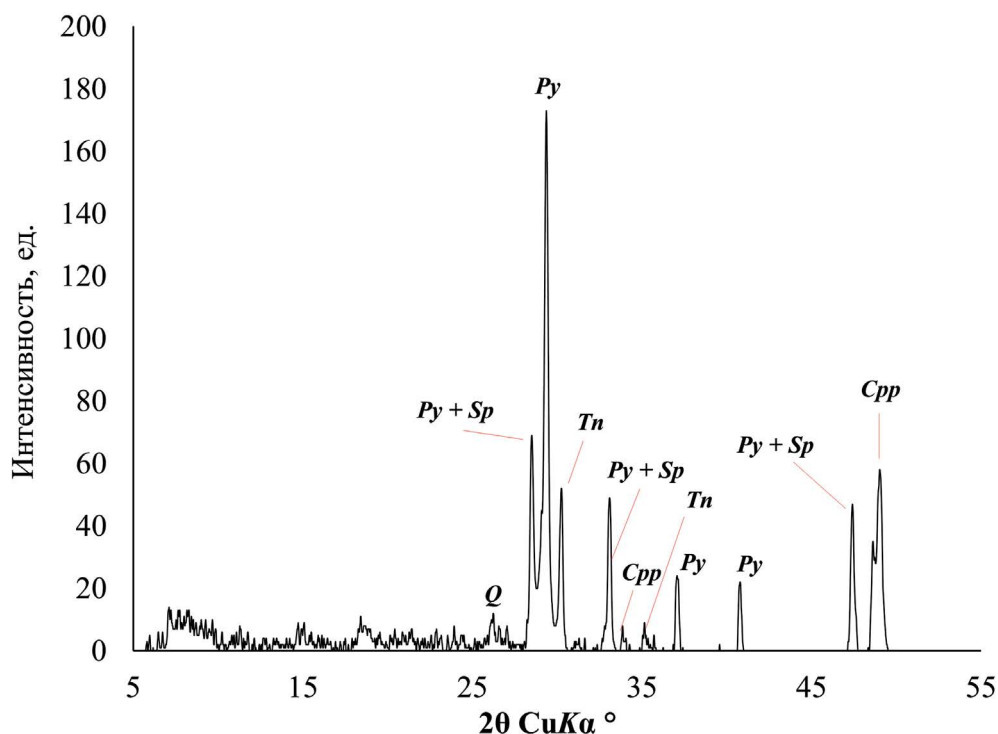


Рисунок. Результаты анализа минерального состава концентрата рентгенографическим фазовым методом (дифрактометр ДРОН-2.0 (‘Буревестник’, Россия), Cu-Kα); Cpp – халькопирит, Q – кварц, Py – пирит, Sp – сфалерит, Tn – теннантит.

дистиллированная вода — 1.0 л. Начальный pH устанавливали, добавляя в среду 5 мл/л концентрированной серной кислоты. После внесения концентрата в среду пульпу выдерживали 1 сут без инокулята для стабилизации pH.

Для определения влияния дополнительных источников углерода на процесс биоокисления использовали диоксид углерода и мелассу. В контрольный реактор не вносили каких-либо дополнительных источников углерода; в данном случае источником углерода служил диоксид углерода, который поступал с воздухом при аэрации. В пульпу первого реактора осуществляли подачу CO₂ (примерно 0.01 л/мин) с помощью редукторов с ротаметром У-30П (“Brima”, КНР). В пульпу второго вносили 0.02% мелассы (в начале эксперимента, а также при проведении процесса в непрерывных условиях).

В качестве инокулята использовали микробную культуру, которую выращивали в реакторе, аналогичном описанному выше, в периодическом режиме при 45°C. Инокулят вносили в реакторы в таком объеме, чтобы начальная численность клеток микроорганизмов в жидкой фазе составляла 1×10^8 кл./мл. Состав инокулята представлен в табл. 1 (раздел “Результаты и обсуждение”).

Для анализа активности процесса биовыщелачивания отбирали пробы жидкой фазы пульпы реакторов. Во всех отобранных пробах измеряли pH, окислительно-восстановительный потенциал (*Eh*), содержание двух- и трехвалентного железа, меди и цинка. Содержание ионов железа определяли трилонометрическим титрованием. Концентрацию ионов меди и цинка определяли с помощью атомно-адсорбционного спектрометра PerkinElmer 3100 (“PerkinElmer”, США). По усредненной концентрации ионов металлов (меди и цинка) в жидкой фазе в проточном режиме рассчитывали степень извлечения металлов в жидкую фазу, что является основным параметром, который позволяет сравнить эффективность процесса биовыщелачивания в различных условиях.

Количественный учет микроорганизмов проводили методом прямого счета клеток в световом микроскопе Ampival ($\times 1600$) (“Carl Zeiss”, Германия) с фазово-контрастной приставкой.

Процесс биовыщелачивания проводили последовательно при каждой температуре. Эксперимент по биовыщелачиванию начинали при температуре 45°C. После инокуляции проводили адаптацию микробной популяции к концентрату. Для этого после инокуляции начинали процесс биовыщелачивания в периодическом режиме, проводя мониторинг параметров жидкой фазы. Процесс проводили в периодическом режиме до тех пор, пока не происходила стабилизация параметров жидкой фазы (переставал снижаться pH, переставали расти *Eh*, концентрации ионов железа и численность клеток микроорганизмов). Далее начинали проводить процесс

в непрерывном режиме. После стабилизации параметров в непрерывном режиме и времени, необходимым для смены объема пульпы, начинали сбор биокека (твердых остатков биоокисления). Далее переходили к проведению эксперимента по биовыщелачиванию при 55°C. Для этого температуру пульпы в реакторе поднимали до 55°C и проводили адаптацию микробной популяции в периодическом режиме таким же образом, как при 45°C, а затем проводили биоокисление при 55°C в непрерывном режиме.

В ходе работы определяли таксономический состав микробных сообществ, сформированных в разных условиях в биореакторах. Препарат метагеномной ДНК выделяли с помощью Power Soil DNA Isolation Kit (“MO BIO Laboratories Inc.”, США). Состав сообщества прокариот определяли на основании анализа последовательностей варибельного региона V3–V4 гена 16S рРНК, амплифицированного с помощью ПЦР с использованием праймеров PRK341F (5'-CCTACGGGRBGCASCAG-3') и PRK806R (5'-GGACTACYVGGGTATCTAAT-3') (Frey et al., 2016). ПЦР-фрагменты были баркодированы с помощью Nextera XT Index Kit v.2 (“Illumina”, США) и очищены с использованием Agencourt AMPure beads (“Beckman Coulter”, США). Концентрация полученных ПЦР продуктов была определена с помощью Qubit dsDNA HS Assay Kit (“Invitrogen”, США). Затем ПЦР-фрагменты были смешаны в эквимольных количествах и секвенированы на Illumina MiSeq (2 $\times$ 300 нт с обоих концов). Парные чтения были объединены с использованием FLASH v.1.2.11 (Magoc, Salzberg, 2011). Полученные последовательности были кластеризованы в операционные таксономические единицы (ОТЕ) при 97% идентичности с помощью программы Usearch (Edgar, 2010); низкокачественные чтения, химерные и единичные последовательности были удалены при кластеризации.

Таксономическая идентификация ОТЕ была выполнена по базе SILVA v.138 с использованием алгоритма VSEARCH (Rognes et al., 2016). Всего было получено 740256 чтений. Полученные последовательности были депонированы в базе данных NCBI Sequence Read Archive (SRA) в рамках проекта PRJNA976529. Об изменении относительной численности разных групп микроорганизмов в популяциях судили по изменению доли последовательностей фрагментов генов 16S рРНК, относящихся к той или иной группе.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные результаты показали, что применение дополнительных источников углерода в разной степени повлияло на процесс биовыщелачивания при 45 и 55°C (табл. 1–4).

Таблица 1. Доля последовательностей фрагментов генов 16S рРНК (%) ацидофильных микроорганизмов в микробных популяциях биореакторов

Группа микроорганизмов	Инокулят	45°C						55°C					
		Контроль		CO ₂		Меласса		Контроль		CO ₂		Меласса	
		Начало проточного режима	Окончание проточного режима	Начало проточного режима	Окончание проточного режима	Начало проточного режима	Окончание проточного режима	Начало проточного режима	Окончание проточного режима	Начало проточного режима	Окончание проточного режима	Начало проточного режима	Окончание проточного режима
<i>Ferroplasma</i>	2.66	21.85	12.40	5.05	42.54	45.33	16.84	12.59	0.93	15.05	0.01	8.70	2.95
<i>Acidiplasma</i>	0.00	0.01	0.00	0.45	0.00	0.04	0.00	0.21	0.00	0.00	0.00	0.00	0.10
<i>Cuniculiplasma</i>	10.61	65.56	31.89	5.09	38.59	37.60	33.94	7.69	0.41	0.96	0.03	5.94	5.03
“ <i>Candidatus</i> <i>Carboxiplasma</i> <i>ferriphilum</i> ” (A-plasma)	0.01	1.47	1.60	0.00	0.65	6.58	0.37	4.35	0.24	0.27	0.00	1.65	1.08
<i>Acidithiobacillus</i>	62.84	5.07	0.48	1.15	5.36	6.07	9.86	1.86	0.17	0.63	0.00	4.14	6.31
<i>Acidiferrobacter</i>	0.01	0.02	0.00	0.51	0.00	0.00	0.03	0.05	0.00	0.02	0.00	0.14	0.00
<i>Acidiphilium</i>	0.00	0.02	0.00	0.33	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.53	0.00
<i>Sulfobacillus</i>	22.83	4.80	53.53	2.43	12.56	3.48	38.52	24.46	45.01	79.85	99.88	25.84	39.17
<i>Leptospirillum</i>	0.03	0.02	0.01	1.53	0.04	0.38	0.13	31.66	40.85	2.44	0.05	31.51	44.05
<i>Ferrimicrobium</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.11	0.00

В периодическом режиме при 45°C биовыщелачивание проводили в течение 25 сут. Использование CO₂ и мелассы позволило извлечь в 1.9 и 1.8 раза больше меди соответственно а также в 1.8 раза больше цинка, чем в контроле (концентрации меди составили 7.88, 7.37 и 4.10 г/л; концентрации цинка – 4.53, 4.46 и 2.48 г/л соответственно) (табл. 2). Кроме того, в жидкой фазе пульпы реакторов, в которых использовались дополнительные источники углерода, также были выше концентрации ионов железа.

В непрерывном режиме различия в выщелачивании меди и цинка были менее значительными (табл. 3). Наименьшая концентрация меди и цинка была в случае использовании мелассы – 4.01 и 2.86 г/л соответственно. В контроле концентрация меди и цинка в проточном режиме составила 4.37 и 2.82 г/л. При этом наибольшие концентрации меди и цинка были в пульпе реактора, в котором использовали CO₂ в качестве источника углерода – 4.49 и 3.39 г/л.

Таким образом, при 45°C использование CO₂ повлияло на извлечение металлов в непрерывном режиме, однако влияние было незначительным в случае меди, тогда как на извлечение цинка влияние диоксида углерода было более значительным. Извлечение меди в контроле, при использовании

CO₂ и мелассы в непрерывном режиме составило 27.3, 28.1 и 25.1 %; а цинка – 53.2, 64.0 и 54.9% соответственно (табл. 4).

Нужно отметить, что при 45°C во всех экспериментах численность микроорганизмов была высокой, pH был низким (1.1–1.2), для его поддержания не требовалось внесения в среду серной кислоты, Eh жидкой фазы пульпы был выше 800 мВ, а ионы двухвалентного железа в пульпе практически отсутствовали. Эти параметры косвенно свидетельствуют о высокой окислительной активности микробных популяций, однако выщелачивание меди и цинка было не очень высоким в непрерывном режиме.

После проведения биовыщелачивания в непрерывном режиме при 45°C, микробные популяции адаптировали в периодическом режиме к температуре 55°C на протяжении 15 сут. Для этого из реакторов было слито 50% пульпы и заменено на соответствующий объем жидкой среды и навеску концентрата. Несмотря на то, что за период адаптации во всех вариантах увеличилась концентрация в среде как меди, так и цинка, а также суммарная концентрация ионов железа, концентрация ионов Fe³⁺ либо почти не увеличилась, либо даже снизилась (в контрольном варианте) (табл. 2). При этом концентрация ионов Fe²⁺ увеличилась во всех

Таблица 2. Параметры жидкой фазы биореакторов при проведении биовыщелачивания в периодическом режиме

Температура, °C	Источник углерода	Этап эксперимента	pH	Eh, мВ	Концентрация, г/л					Численность микроорганизмов, кл./мл × 10 ⁷
					Fe ³⁺	Fe ²⁺	Fe _{сумм}	Cu	Zn	
45	Контроль	Начало	1.48	652	2.24	2.31	4.55	2.72	2.63	10.0
		Окончание	1.04	803	16.80	0.00	16.80	4.10	2.48	85.1
	CO ₂	Начало	1.48	654	1.82	1.96	3.78	2.39	2.43	10.0
		Окончание	1.32	780	18.20	0.14	18.34	7.88	4.53	5.0
	Меласса	Начало	1.48	655	1.89	2.66	4.55	2.56	2.59	10.0
		Окончание	1.06	839	21.98	0.00	21.98	7.37	4.46	223.7
55	Контроль	Начало	1.26	750	9.52	0.14	9.66	1.65	1.06	50.6
		Окончание	1.46	667	6.72	5.60	12.32	6.02	4.10	1.7
	CO ₂	Начало	1.14	790	12.60	0.42	13.02	2.05	1.49	71.3
		Окончание	1.13	753	13.72	4.20	17.92	6.01	2.84	10.7
	Меласса	Начало	1.26	766	10.92	0.70	11.62	1.75	1.26	52.7
		Окончание	1.24	739	10.22	4.20	14.42	5.31	2.79	5.6

Таблица 3. Параметры жидкой фазы биореакторов при проведении биовыщелачивания в непрерывном режиме

Температура, °C	Источник углерода	pH	Eh, мВ	Концентрация, г/л					Численность микро- организмов, кл/мл × 10 ⁷	Расход H ₂ SO ₄ , кг/тону концентра
				Fe ³⁺	Fe ²⁺	Fe _{сумм}	Cu	Zn		
45	Контроль	1.20 ± 0.03	825 ± 14	16.39 ± 1.09	0.00	16.39 ± 1.09	4.37 ± 0.50	2.82 ± 0.33	101.2 ± 20.9	0
	CO ₂	1.10 ± 0.05	840 ± 12	19.52 ± 0.87	0.00	19.52 ± 0.87	4.49 ± 0.20	3.39 ± 0.22	142.6 ± 26.5	0
	Меласса	1.18 ± 0.04	833 ± 12	17.29 ± 0.76	0.00	17.29 ± 0.76	4.01 ± 0.27	2.86 ± 0.17	105.3 ± 17.8	0
55	Контроль	1.78 ± 0.17	601 ± 3	2.39 ± 1.52	7.04 ± 1.17	9.43 ± 2.48	6.90 ± 0.89	3.09 ± 0.43	0.9 ± 0.1	66.7
	CO ₂	1.60 ± 0.15	730 ± 14	8.24 ± 0.68	0.63 ± 0.51	8.87 ± 0.53	5.76 ± 0.23	4.84 ± 0.20	7.3 ± 2.1	150.0
	Меласса	2.01 ± 0.28	631 ± 13	4.14 ± 1.61	4.47 ± 1.83	8.61 ± 2.85	8.35 ± 0.56	3.05 ± 0.26	0.9 ± 0.2	116.0

Таблица 4. Извлечение меди и цинка в жидкую фазу при проведении биовыщелачивания в непрерывном режиме

Температура, °С	Источник углерода	Cu	Zn
45	Контроль	27.29 ± 3.10	53.19 ± 6.18
	CO ₂	28.07 ± 1.28	63.98 ± 4.13
	Меласса	25.08 ± 1.68	53.88 ± 3.30
55	Контроль	43.10 ± 3.58	58.33 ± 8.20
	CO ₂	36.01 ± 1.45	91.39 ± 3.86
	Меласса	52.21 ± 3.52	57.60 ± 4.92

реакторах. Это свидетельствует о том, что скорость биоокисления ионов железа при 55°С была ниже, чем скорость окисления минералов при взаимодействии с ионами Fe³⁺, что, в свою очередь, приводило к накоплению ионов Fe²⁺ в среде.

При 55°С в непрерывном режиме степень извлечения металлов во всех вариантах была выше, чем при 45°С, при этом влияние разных источников углерода на процесс биовыщелачивания было значительнее, чем при 45°С. Нужно также отметить, что эффект на выщелачивание меди и цинка различался. Так, в непрерывном режиме при 55°С концентрация меди составляла в контроле 6.90 г/л; при использовании CO₂ – 5.76 г/л; при использовании мелассы – 8.35 г/л. Влияние источников углерода на выщелачивание цинка полностью отличалось от влияния на выщелачивание меди, концентрация цинка в контроле составила 3.09 г/л; при использовании CO₂ – 4.84 г/л; при использовании мелассы – 3.05 г/л. Извлечение меди в контроле, при использовании CO₂ и мелассы в непрерывном режиме составило 43.1, 36.0 и 52.2%, тогда как извлечение цинка составило 58.3, 91.4 и 57.6% соответственно (табл. 4). Таким образом, использование диоксида углерода позволило значительно увеличить выщелачивание цинка, как по сравнению с другими реакторами при проведении процесса биовыщелачивания при 55°С, так и по сравнению с экспериментами при 45°С. Несмотря на это, выщелачивание меди при 55°С при использовании диоксида углерода снижалось. Выщелачивание меди при 55°С было максимальным при использовании мелассы, что отличалось от результатов, полученных при 45°С.

При 55°С во всех вариантах эксперимента активность процесса окисления восстановленных соединений серы была очевидно ниже, чем при 45°С: поддержание pH во всех реакторах требовало внесения серной кислоты, при этом значения pH были выше, чем при более низкой температуре; Eh жидкой фазы пульпы был выше 730 мВ при использовании CO₂ и 600–630 мВ в других вариантах. Общие концентрации ионов железа были

примерно в 2 раза ниже, чем при 45°С (табл. 3), что может быть связано как с более низкой степенью окисления железосодержащих сульфидных минералов, так и с выпадением в осадок нерастворимых соединений железа при повышении температуры и значения pH. Несмотря на указанные выше косвенные признаки низкой активности микроорганизмов, выщелачивание меди и цинка при 55°С происходило активно.

Анализ микробных популяций позволяет подтвердить выводы, сделанные на основании анализа процесса биовыщелачивания. В периодическом режиме при 45°С общая численность клеток микроорганизмов в жидкой фазе отличалась значительно в конце процесса. Нужно отметить, что в варианте, где использовали диоксид углерода, численность клеток была низкой, несмотря на то что параметры жидкой фазы свидетельствовали об активном окислении концентрата (табл. 2). Возможно, что к моменту отбора пробы микробная популяция уже находилась в стационарной фазе, что привело к снижению численности клеток микроорганизмов. При проведении процесса биовыщелачивания при 45°С в непрерывном режиме средняя численность клеток микроорганизмов была практически одинаковой в контроле, а также в реакторе, в котором в среду вносили мелассу, тогда как при использовании диоксида углерода она была в 1.4 раза выше (табл. 3).

Популяции, которые сформировались при проведении биовыщелачивания в периодическом режиме при 45°С различались количественными соотношениями между группами микроорганизмов (табл. 1), о чем судили по соотношениям между последовательностями фрагментов генов 16S рРНК, принадлежащих разным группам бактерий и архей. Во всех случаях преобладало несколько групп ацидофильных микроорганизмов (табл. 5): железоокисляющие гетеротрофные археи р. *Ferroplasma*, гетеротрофные археи р. *Cuniculiplasma*, сероокисляющие автотрофные бактерии р. *Acidithiobacillus*, миксотрофные железо- и сероокисляющие бактерии р. *Sulfobacillus*.

Кроме того, в контроле и микробной популяции реактора, в котором использовали мелассу в качестве источника углерода, присутствовали некультивируемые археи “*Candidatus Carboxiplasma ferriphilum*” (A-plasma), которые, вероятно, способны к окислению железа и нуждаются в органическом источнике углерода. В варианте, где использовали диоксид углерода в качестве источника углерода, в популяции, которая сформировалась в периодическом режиме при 45°С, последовательности ацидофильных микроорганизмов составляли 16.54%, а значительная часть последовательностей принадлежала родам гетеротрофных микроорганизмов, среди которых неизвестны ацидофилы. Это может подтверждать вывод о том, что в данном случае на момент отбора проб для анализа

Таблица 5. Свойства групп ацидофильных микроорганизмов, выявленных в микробных популяциях биореакторов

Группа	Способность к окислению		Углеродный метаболизм	Отношение к температуре	Примечание	Источник
	Fe ²⁺	Восстановленные соединения серы				
<i>Ferroplasma</i>	+	—	Миксо- и гетеротрофы	Мезофилы, умеренные термофилы		Dopson, Okibe, 2023
<i>Acidiplasma</i>	+	+	Гетеротрофы	Умеренные термофилы		Bulaev, 2020; Dopson, Okibe, 2023
<i>Cuniculiplasma</i>	—	—	Гетеротрофы	Мезофил		Dopson, Okibe, 2023
“ <i>Candidatus Carboxiplasma ferriphilum</i> ” (A-plasma)	+	—	Гетеротрофы	Нет данных	Свойства описаны на основе анализа метагенома	Bulaev et al., 2023
<i>Acidithiobacillus</i>	+	+	Авто- и миксотрофы	Мезофилы, умеренные термофилы	Известен один умеренно-термофильный вид <i>A. caldus</i> , который способен только к окислению соединений серы	Hallberg, Lindström, 1994; Dopson, Okibe, 2023
<i>Acidiferrobacter</i>	+	+	Автотрофы	Мезофилы		Dopson, Okibe, 2023
<i>Acidiphilium</i>	—	+	Гетеротрофы	Мезофилы		Dopson, Okibe, 2023
<i>Sulfobacillus</i>	+	+	Миксотрофы	Мезофилы, умеренные термофилы		Dopson, Okibe, 2023
<i>Leptospirillum</i>	+	—	Автотрофы	Мезофилы		Dopson, Okibe, 2023
<i>Ferrimicrobium</i>	+	—	Гетеротрофы	Мезофилы		Dopson, Okibe, 2023

микробная популяция уже перешла в стационарную фазу, что привело к элиминации ацидофильных микроорганизмов и снижению общей численности микроорганизмов.

При переходе к непрерывному режиму в микробных популяциях произошли изменения. В популяции биореактора, в который подавали диоксид углерода, доля ацидофильных микроорганизмов значительно (в несколько раз) увеличилась, при этом преобладающие группы ацидофильных микроорганизмов фактически не изменились. Микробные популяции двух других биореакторов также претерпели количественные изменения, тогда как преобладающие группы микроорганизмов сохранялись. Нужно отметить, что и в контрольном реакторе, и при использовании мелассы преобладали железо- и сероокисляющие бактерии р. *Sulfobacillus*, а также железоокисляющие археи р. *Ferroplasma*, причем

при переходе к непрерывному режиму доля бактерий р. *Sulfobacillus* в обоих случаях увеличивалась на порядок, а доля архей р. *Ferroplasma* снижалась в 1.8 и 2.7 раза соответственно. Популяции отличались долей бактерий р. *Acidithiobacillus*, которая на порядок сократилась в контрольном варианте, но увеличилась при использовании мелассы и диоксида углерода. Большинство известных представителей р. *Acidithiobacillus* являются автотрофами, но некоторые способны к миксотрофии, что предположительно может объяснять увеличение их доли в популяции при использовании мелассы (табл. 5) (Hallberg, Lindström, 1994). Нужно отметить, что во всех популяциях значительной была доля гетеротрофных архей р. *Cuniculiplasma*.

При адаптации микробных популяций к повышению температуры до 55°C их состав значительно изменялся. Нужно отметить, что во всех вариантах

значительно снижалась общая численность микроорганизмов (от 6.5 до 2.9 раза). Наименее значительным снижением было в реакторе, в котором использовали диоксид углерода, а наиболее значительным — в контрольном реакторе. К окончанию адаптации микробных популяций в периодическом режиме при 55°C общая численность клеток микроорганизмов в жидкой фазе пульпы значительно различалась и наиболее высокой была в варианте с использованием диоксида углерода (табл. 2).

Соотношения между основными группами микроорганизмов также изменились: доля архей *Ferroplasma* и *Cuniculiplasma* во всех случаях снижалась (за исключением доли *Ferroplasma*, которая не снизилась в контрольном варианте). С учетом снижения фактической численности микроорганизмов это означало очень значительное снижение численности данных микроорганизмов. Высокой оставалась доля бактерий р. *Sulfobacillus*, которая в контроле и при использовании мелассы снижалась, а при использовании диоксида углерода увеличивалась более чем в 6 раз и стала наиболее значительной в данной популяции (79.9%) (табл. 1). Интересно отметить, что во всех случаях увеличивалась и становилась значительной доля железоокисляющих автотрофных бактерий р. *Leptospirillum*, большая часть известных представителей которого являются мезофилами, неспособными расти при температуре 55°C (табл. 5). Доля бактерий р. *Acidithiobacillus* снизилась в популяции реактора, в который подавали диоксид углерода, но увеличилась в контроле и при использовании мелассы.

При переходе к непрерывному режиму биовыщелачивания при 55°C тенденции в изменении микробных популяций были аналогичны изменениям, которые наблюдались в периодическом режиме. Численность микроорганизмов снизилась, при этом в варианте эксперимента при использовании диоксида углерода численность снизилась незначительно (в 1.5 раза), оставаясь самой высокой по сравнению с другими реакторами (табл. 3). В контрольном варианте и при использовании мелассы численность микроорганизмов при переходе в непрерывный режим становилась низкой (0.9×10^7 кл./мл). В популяции реактора, в который подавали диоксид углерода, практически все группы микроорганизмов элиминировались, а доля бактерий р. *Sulfobacillus* увеличивалась до 99.9%. Так как известные представители данного рода являются умеренно-термофильными бактериями, способными к окислению соединений серы и железа, они очевидно играли основную роль в окислении сульфидных минералов в данном случае. Увеличение доли в популяции бактерий р. *Sulfobacillus* при повышении температуры процесса и использовании диоксида углерода в качестве источника углерода было показано в наших предыдущих работах (Bulaev, Boduen,

2022; Bulaev et al., 2023). Нужно отметить, что доля последовательностей бактерий р. *Sulfobacillus* была высокой и в других популяциях (39–45%), однако, так как численность микроорганизмов в данных популяциях была низкой, очевидно, что численность данных бактерий при использовании диоксида углерода была высокой. Высокой в контроле и при использовании мелассы была доля бактерий р. *Leptospirillum*, что трудно объяснить, если основываться на свойствах большей части известных представителей данного рода. Нужно отметить, что аналогичное увеличение в популяции доли бактерий р. *Leptospirillum* при повышении температуры до 50°C и использовании мелассы было показано в нашей предыдущей работе (Bulaev et al., 2023). Вероятно, что на основании полученных в данной и предыдущей работах результатов можно предположить, что в пульпе присутствовали представители вида *L. thermoferrooxidans* (Головачева и соавт., 1992), способные расти при относительно высоких температурах в условиях проведения процессов биовыщелачивания в непрерывном режиме. При использовании мелассы при 55°C в непрерывном режиме в популяции была относительно высока доля бактерий р. *Acidithiobacillus* (как и в других режимах).

При анализе полученных в данной работе результатов можно заметить ряд закономерностей, которые были выявлены в ряде наших предыдущих работ по влиянию источников углерода на процесс биоокисления сульфидных концентратов. Так, в работах (Bulaev, Boduen, 2022; Bulaev et al., 2023) было показано, что повышение температуры может оказывать негативный эффект на биоокисление пирит-арсенопиритных сульфидных концентратов, в том числе приводя к снижению численности микроорганизмов в микробных популяциях, осуществляющих такие процессы. При этом применение диоксида углерода и мелассы в качестве источника углерода позволяло увеличивать интенсивность окисления пирит-арсенопиритных концентратов при температурах 45–50°C. Использование дополнительных источников углерода приводило к увеличению численности микроорганизмов, а также к изменению соотношений между разными группами микроорганизмов в популяциях.

Влияние условий биовыщелачивания на извлечение металлов, которое наблюдалось в данной работе, может быть объяснено свойствами минералов концентрата и особенностями закономерностей их выщелачивания. Увеличение степени выщелачивания меди в раствор при увеличении температуры может объясняться хорошо известным фактом, что скорость биовыщелачивания халькопирита зависит от температуры, возрастая с ее увеличением (Rodriguez et al., 2003a; Hedrich et al., 2018). Значительное увеличение степени выщелачивания сфалерита при температуре 55°C

и использовании диоксида углерода может объясняться закономерностями, выявленными в работе (Rodriguez et al., 2003b): скорость биовыщелачивания сфалерита в значительной степени зависит от повышения температуры, но при этом скорость выщелачивания цинка в значительной степени лимитируется слоем элементарной серы, которая образуется как промежуточный продукт окисления сфалерита и откладывается на поверхности. Удаление серы, в свою очередь, в большей степени происходит за счет активности микроорганизмов, которая зависела от источника углерода. Значительное увеличение извлечения меди в раствор при использовании мелассы может объясняться относительно низким *Eh* среды в данном варианте эксперимента, что могло увеличить скорость выщелачивания халькопирита (Masaki et al., 2018).

Сопоставление результатов данной работы с нашим предыдущим исследованием (Elkina et al., 2022) позволяет сделать заключение о том, что влияние различных условий (в частности, температуры) на биовыщелачивание меди из сульфидных концентратов может зависеть от соотношения между содержанием различных минералов меди в конкретном концентрате. В данной работе исследовали процесс биовыщелачивания меди из концентрата, который содержал около 7.7% теннантита и 33.5% халькопирита, а в работе (Elkina et al., 2022) проводили эксперименты в сходных методических условиях с концентратом, аналогичным по качественному минеральному составу, но с другим соотношением минеральных фаз — 5.3% халькопирита и 7.7% теннантита, т.е. отличающимся относительно низким содержанием халькопирита. Исследовали биовыщелачивание концентрата в диапазоне температур 40–60°C, при этом было показано, что наибольшая степень извлечения меди была достигнута при температуре 45–50°C, а повышение температуры до 55–60°C приводило к снижению выщелачивания меди; при 60°C выщелачивание повышалось при использовании диоксида углерода, тогда как при более низких температурах извлечение меди слабо зависело от использования дополнительных источников углерода (Elkina et al., 2022). Это соответствует закономерности, выявленной в работе (Елкина и соавт., 2020), где было показано, что в температурном диапазоне 40–60°C скорость биовыщелачивания халькопирита зависела в большей степени от температуры, тогда как скорость выщелачивания теннантита в меньшей степени определялась температурой.

Таким образом, в данной работе при исследовании процесса биовыщелачивания мышьяксодержащего полиметаллического концентрата, содержащего халькопирит, теннантит и сфалерит, при разных температурах и с использованием разных источников углерода было показано, что применение разных источников углерода и повышение температуры

позволяет интенсифицировать процесс биовыщелачивания меди и цинка. При этом сопоставление полученных результатов с результатами, полученными в предыдущих работах, показывает, что такие эффекты могут определяться соотношением сульфидных минералов в концентрате. Наблюдаемый эффект исследованных факторов на процесс биовыщелачивания во многом определяется их воздействием на микробную популяцию, которая осуществляет процесс биовыщелачивания, так как при изменении условий процесса наблюдались изменения в составе микробных популяций биореакторов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда, проект № 21-64-00019.

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

- Булаев А.Г. Биоокисление пирротина умеренно-термофильными ацидофильными микроорганизмами // Микробиология. 2020. Т. 89. С. 511–521.
- Bulaev A.G. Pyrrhotite biooxidation by moderately thermophilic acidophilic microorganisms // Microbiology (Moscow). 2020. V. 89. P. 510–519.
- Васильева А.А., Бодуэн А.Я. Минералогические особенности и способы переработки медных цинк-содержащих концентратов // Известия Томского политехнического университета. Инжиниринг георесурсов. 2023. Т. 334. № 3. С. 61–72.
- Головачева Р.С., Голышина О.В., Каравайко Г.И., Дорофеев А.Г., Пивоварова Т.А., Черных Н.А. Новая железоокисляющая бактерия *Leptospirillum thermoferrooxidans* sp. nov. // Микробиология. 1992. Т. 61. С. 1056–1065.
- Golovacheva R.S., Golyshina O.V., Karavaiko G.I., Dorofeev A.G., Pivovarova T.A., Chernykh N.A. A new iron oxidizing bacterium *Leptospirillum thermoferrooxidans* sp. nov. // Microbiology (Moscow). 1992. V. 61. P. 744–750.
- Елкина Ю.А., Мельникова Е.А., Меламуд В.С., Булаев А.Г. Биовыщелачивание теннантита и энаргита

- умеренно-термофильными ацидофильными микроорганизмами // Микробиология. 2020. Т. 89. С. 419–431.
- Elkina Y.A., Melnikova E.A., Melamud V.S., Bulaev A.G. Bioleaching of enargite and tennantite by moderately thermophilic acidophilic microorganisms // Microbiology (Moscow). 2020. V. 89. P. 413–424.
- Елкина Ю.А., Меламуд В.С., Булаев А.Г. Биовыщелачивание медно-цинкового концентрата с высоким содержанием мышьяка // Микробиология. 2021. Т. 90. С. 90–99.
- Elkina Y.A., Melamud V.S., Bulaev A.G. Bioleaching of a copper-zinc concentrate with high arsenic content // Microbiology (Moscow). 2021. V. 90. P. 78–86.
- Belyi A.V., Tupikina O.V. Biooxidation of gold ores in Russia and Kazakhstan // Biomining Technologies / Eds. Johnson D.B., Bryan C.G., Schlömann M., Roberto F.F. Cham: Springer, 2023. P. 191–208.
- Bulaev A., Boduen A. Carbon sources as a factor determining the activity of microbial oxidation of sulfide concentrate at elevated temperature // Minerals. 2022. V. 12. Art. 110.
- Bulaev A., Kadnikov V., Elkina Y., Beletsky A., Melamud V., Ravin N., Mardanov A. Shifts in the microbial populations of bioleach reactors are determined by carbon sources and temperature // Biology. 2023. V. 12. Art. 1411.
- Bulaev A., Melamud V., Boduen A. Bioleaching of non-ferrous metals from arsenic-bearing sulfide concentrate // Solid State Phenom. 2020. V. 299. P. 1064–1068.
- Bulaev A., Elkina Yu., Melnikova E., Melamud V. Effect of sodium chloride on copper bioleaching from sulfide minerals and concentrates // SGEM. 2019. V. 19. Is. 1.3. P. 799–804.
- Diaz J.A., Serrano J., Leiva E. Bioleaching of arsenic-bearing copper ores // Minerals. 2018. V. 8. Art. 215.
- Dopson M., Okibe N. Biomining microorganisms: diversity and *modus operandi* // Biomining Technologies / Eds. Johnson D.B., Bryan C.G., Schlömann M., Roberto F.F. Cham: Springer, 2023. P. 89–110.
- Edgar R.C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST // Bioinform. 2010. V. 26. P. 2460–2461. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq461>
- Elkina Y., Nechaeva A., Artykova A., Kolosoff A., Bugubayeva A., Melamud V., Mardanov A., Bulaev A. Continuous bioleaching of arsenic-containing copper-zinc concentrate and shift of microbial population under various conditions // Minerals. 2022. V. 12. Art. 592.
- Filippou D., St-Germain P., Grammatikopoulos T. Recovery of metal values from copper-arsenic minerals and other related resources // Miner. Proc. Extr. Metall. Rev. 2007. V. 28. P. 247–298.
- Frey B., Rime T., Phillips M., Stierli B., Hajdas I., Widmer F., Hartmann M. Microbial diversity in European alpine permafrost and active layers // FEMS Microbiol. Ecol. 2016. V. 92. Art. fw018. <https://doi.org/10.1093/femsec/fw018>
- Hedrich S., Joulain C., Graupner T., Schippers A., Guézennec A.-G. Enhanced chalcopryrite dissolution in stirred tank reactors by temperature increase during bioleaching // Hydrometallurgy. 2018. V. 179. P. 125–131.
- Gericke M., Neale J.W., van Staden P.J. A Mintek perspective of the past 25 years in minerals bioleaching // J. S. Afr. Inst. Min. Metall. 2009. V. 109. P. 567–585.
- Gericke M., Neale J.W., Mänttä P. Biomining in Finland: commercial application of heap and tank bioleaching technologies for nickel recovery // Biomining Technologies / Eds. Johnson D.B., Bryan C.G., Schlömann M., Roberto F.F. Cham: Springer, 2023. P. 209–228.
- Hallberg K.B., Lindström E.B. Characterization of *Thiobacillus caldus* sp. nov., a moderately thermophilic acidophile // Microbiology (Reading). 1994. V. 140. P. 3451–3456.
- Johnson D.B., Roberto F.F. Evolution and current status of mineral bioprocessing technologies // Biomining Technologies / Eds. Johnson D.B., Bryan C.G., Schlömann M., Roberto F.F. Cham: Springer, 2023. P. 1–13.
- Jyothi N., Sudha K.N., Natarajan K.A. Electrochemical aspects of selective bioleaching of sphalerite and chalcopryrite from mixed sulphides // Int. J. Miner. Process. 1989. V. 27. P. 189–203.
- Kondo S., Hayashi K., Phann I., Okibe N. Bioleaching of tennantite concentrate: influence of microbial community and solution redox potential // Front. Microbiol. 2024. V. 14. Art. 1339549.
- Magoc T., Salzberg S.L. FLASH: Fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies // Bioinform. 2011. V. 27. P. 2957–2963. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr507>
- Mahmoud A., Cezac P., Hoadley A.F.A., Contaminea F., D'Hugues P. A review of sulfide minerals microbially assisted leaching in stirred tank reactors // Int. Biodegradation. Biodegr. 2017. V. 119. P. 118–146.
- Masaki Y., Hirajima T., Sasaki K., Miki H., Okibe N. Microbiological redox potential control to improve the efficiency of chalcopryrite bioleaching // Geomicrobiol. J. 2018. V. 3. P. 648–656.
- Morin D.H.R., d'Hugues P. Bioleaching of a cobalt-containing pyrite in stirred reactors: a case study from laboratory scale to industrial application // Biomining / Eds. Rawlings D.E., Johnson D.B. Berlin: Springer, 2007. P. 35–55.
- Munoz J.A., Blazquez M.L., Gonzalez F., Ballester A., Acevedo F., Gentina J.C., Gonzalez P. Electrochemical study of enargite bioleaching by mesophilic and thermophilic microorganisms // Hydrometallurgy. 2006. V. 84. P. 175–186.
- Nakazawa H., Fujisawa H., Sato H. Effect of activated carbon on the bioleaching of chalcopryrite concentrate // Int. J. Mineral Proc. 1998. V. 55. P. 87–94.
- Okibe N., Hayashi K., Oyama K., Shimada K., Aoki Y., Suwa T., Hirajima T. Bioleaching of enargite/

- pyrite-rich “dirty” concentrate and arsenic immobilization // *Minerals*. 2022. V. 12. Art. 449.
- Oyama K., Shimada K., Ishibashi J., Sasaki K., Miki H., Okibe N. Catalytic mechanism of activated carbon-assisted bioleaching of enargite concentrate // *Hydrometallurgy*. 2020. V. 196. Art. 105417.
- Roberto F.F., Arévalo Lara H. Heap bioleaching of an enargite-dominant ore body // *Biomining Technologies* / Eds. Johnson D.B., Bryan C.G., Schlömann M., Roberto F.F. Cham: Springer, 2023. P. 177–190.
- Rodriguez Y., Ballester A., Blazquez M.L., Gonzalez F., Munoz J.A. New information on the chalcopyrite bioleaching mechanism at low and high temperature // *Hydrometallurgy*. 2003a. V. 71. P. 47–56.
- Rodriguez Y., Ballester A., Blazquez M.L., Gonzalez F., Munoz J.A. New information on the sphalerite bioleaching mechanism at low and high temperature // *Hydrometallurgy*. 2003b. V. 71. P. 57–66.
- Rognes T., Flouri T., Nichols B., Quince C., Mahé F. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics // *PeerJ*. 2016. V. 4. Art. e2584. <https://doi.org/10.7717/peerj.2584>
- van Niekerk J.A., van Buuren C.B., Olivier J.W. Bio-processing of refractory gold ores: the BIOX, MesOTHERM, and ASTER processes // *Biomining Technologies* / Eds. Johnson D.B., Bryan C.G., Schlömann M., Roberto F.F. Cham: Springer, 2023. P. 67–88.
- Vera Véliz M., Videla Leiva A., Martínez Bellange P. Copper bioleaching operations in Chile: towards new challenges and developments // *Biomining Technologies* / Eds. Johnson D.B., Bryan C.G., Schlömann M., Roberto F.F. Cham: Springer, 2023. P. 163–176.
- Watling H.R. The bioleaching of sulphide minerals with emphasis on copper sulphides – a review // *Hydrometallurgy*. V. 2006. V. 84. P. 81–108.

EXPERIMENTAL ARTICLES

Bioleaching of Copper-Zinc Concentrate at Different Temperatures

A. G. Bulaev^{1,*}, A. V. Artykova¹, Yu. A. Elkina¹, A. V. Kolosov¹, A. V. Nechaeva¹,
A. V. Beletski¹, V. V. Kadnikov¹, V. S. Melamud¹, A. V. Mardanov¹

¹FRC “Fundamentals of Biotechnology” of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia
*e-mail: bulaev.inmi@yandex.ru

The goal of this work was to study the process of bioleaching of arsenic-containing polymetallic concentrate containing 16.0% Cu, 5.3% Zn and 1.7% As, under different conditions. The dependence of the leaching of non-ferrous metals on temperature (45 and 55°C) and the use of CO₂ and molasses bioreactors as carbon sources for the microbial population, as well as differences in the composition of microbial populations formed in different conditions were studied. Increasing temperatures led to the increase leaching of both copper and zinc. However, at a higher temperature (55°C), the use of additional carbon sources significantly affected the extraction of metals, while at 45°C, the extraction of metals did not differ significantly between different experimental variants. A study of the microbial populations of bioreactors showed that both temperature changes and additional carbon sources influenced the microbial populations that formed during the bioleaching process. When using carbon dioxide at 45°C, the total number of microbial cells was 1.4 times higher than in other variants, and at 55°C, it was 8 times higher. In addition, changes in the relationships between microorganisms in microbial populations were observed. At 45°C, microbial populations were dominated by iron-oxidizing heterotrophic archaea of the genus *Ferroplasma*, heterotrophic archaea of the genus *Cuniculiplasma*, sulfur-oxidizing autotrophic bacteria of the genus *Acidithiobacillus*, mixotrophic iron- and sulfur-oxidizing bacteria of the genus *Sulfobacillus*. At 55°C, the microbial populations were dominated by bacteria of the genus *Sulfobacillus* and iron-oxidizing bacteria of the genus *Leptospirillum*. The use of carbon dioxide led to the dominance of bacteria of the genus *Sulfobacillus*: the proportion of 16S rRNA gene fragment sequences of this genus was 99.9%.

Keywords: bioleaching, polymetallic sulfide concentrates, copper, zinc, acidophilic microorganisms, metabarcoding

УДК 579.222.3

ОБРАЗОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ СИБИРСКИМИ ШТАММАМИ *CORDYCEPS MILITARIS*

© 2024 г. Т. В. Антипова^{a, b, *}, В. П. Желифонова^a, Б. П. Баскунов^a,
Ю. А. Литовка^{c, d}, М. М. Патрушева^{c, d}, В. Б. Кешелава^e, Е. С. Михайлов^{f, g},
И. Н. Чистяков^h, И. Н. Павлов^{c, d}

^aИнститут биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, ФИЦ ПНЦ БИ РАН,
Пушино, 142290, Россия

^bВсероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, Санкт-Петербург, 196608, Россия

^cИнститут леса им. В.Н. Сукачева СО РАН, Красноярск, 660036, Россия

^dСибирский государственный университет науки и технологий им. М.Ф. Решетнева, Красноярск, 660037, Россия

^eИнститут биологического приборостроения РАН, ФИЦ ПНЦ БИ РАН, Пушино, 142290, Россия

^fФилиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
Пушино, 142290, Россия

^gПушинский филиал ФГБОУ ВО “Российский биотехнологический университет”, Пушино, 142290, Россия

^hООО “Пушинские биотехнологии”, Пушино, 142290, Россия

*e-mail: tatantip@rambler.ru

Поступила в редакцию 27.03.2024 г.

После доработки 23.05.2024 г.

Принята к публикации 23.05.2024 г.

Штаммы грибов, выделенные в Красноярском крае из погибших гусениц сибирского шелкопряда *Dendrolimus sibiricus* Tschetverikov, обнаруженных в подстилке и кроне *Abies sibirica* Ledeb., на основании морфологических и генетических методов были отнесены к виду *Cordyceps militaris*. Штаммы являются высокоактивными продуцентами биологически активных соединений, таких как полисахариды (ПС), аденозин и кордизинин В. Кордизинин В был впервые обнаружен у вида *C. militaris*. Установлено, что на продукцию ПС большее влияние оказал способ выращивания грибов, чем углеродный субстрат. Наибольшая продукция ПС (6.0–6.7 г/л) и нуклеозидов (390 мг/л) у *C. militaris* 11-5 наблюдалось при глубинном культивировании на сахарозе при использовании абиопептида. При изучении биосинтеза ПС в процессе роста гриба установлено, что синтезированные ПС потребляются культурой при снижении концентрации углеродного субстрата в среде и, по-видимому, служат запасными источниками углерода.

Ключевые слова: кордицепс, нуклеозиды, аденозин, кордизинин В, полисахариды, ферментация

DOI: 10.31857/S0026365624060099

Cordyceps militaris – энтомопатогенный гриб, который известен как один из древних лекарственных средств Тибета и Китая (Kontogiannatos et al., 2021; Cui, 2015). *C. militaris* паразитирует внутри личинок или куколок чешуекрылых насекомых и образует плодовые тела на насекомых-хозяевах (Olatunji et al., 2018). Грибы этого вида являются популярными нутрицевтиками, которые используются в кулинарии в виде экстрактов, ферментированного порошка и настоек (Jędrejko et al. 2022). В последнее время появились данные об использовании этого гриба в качестве кормовой добавки в животноводстве и птицеводстве (Chen et al., 2020). Поиск и изучение новых

штаммов *C. militaris* представляет интерес из-за их биологически активных соединений, которые нашли применение в фармакологии (Jędrejko et al., 2021). Среди лечебных свойств *C. militaris* известна гипогликемическая, гипополипидемическая, противовоспалительная, противоопухолевая, антибактериальная, противогрибковая, противовирусная, противомаларийная, нейропротекторная, антиоксидантная и иммуномодулирующая активности (Zhang et al., 2019; Das et al., 2021). Из плодовых тел, мицелия и культуральной жидкости этих грибов были выделены различные биологические активные соединения: полисахариды, нуклеозиды (аденозин,

кордицепин (3'-дезоксиаденозин), гуанозин), эргостерин, пептиды, статины и пр. (Das et al., 2021; Miao et al., 2022; Qu et al., 2022).

Полисахариды (ПС), накапливающиеся в культуральной жидкости, являются одними из основных водорастворимых биоактивных компонентов *C. militaris* (Miao et al., 2022). По сравнению с другими соединениями ПС *C. militaris* изучены недостаточно. Из-за различных условий выращивания и особенностей штаммов *C. militaris* моносахаридный состав и их молярные соотношения в ПС непостоянны, что усложняет установление их структуры (Yang et al., 2020). Экспериментальные данные показывают, что ПС *Cordyceps* spp. обладают широким спектром действия, включая противоопухолевую, противовирусную, иммуностимулирующую, гипохолестеринемическую, гипогликемическую и антиоксидантную активности (Liu et al., 2015).

Вид *C. militaris* широко распространен в Северной и Южной Америке, Европе и Азии. На территории РФ встречается часто в Приморском крае, реже в центральных и южных регионах Европейской части страны. В западной Сибири штаммы *C. militaris* были изолированы в Иркутской, Новосибирской областях, на юге Байкала (Огарков и соавт., 2012; Kryukov et al., 2018). Этот гриб обычно растет на куколках, реже на личинках или взрослых насекомых из отрядов *Arachnida*, *Coleoptera*, *Lepidoptera*, *Hymenoptera*, *Hemiptera*, *Orthoptera*, *Diptera* и *Isoptera*. Аскоматы *C. militaris* изменчивы по форме и размерам, что связано с типом доступного для роста грибов источника пищи, а также размером хозяина и количеством образовавшихся стром.

В природе грибы *C. militaris* растут медленно, их рост ограничен определенной территорией, а плодовые тела трудно обнаружить из-за небольших размеров (0.8–7 см высотой и 2–6 мм шириной в верхней части) (Евлахова, 1974). В Китае из-за чрезмерной эксплуатации под угрозой находятся ресурсы дикого *C. militaris*, поэтому широкое использование его в качестве лекарственного средства запрещено. Для преодоления этого ограничения были разработаны технологии крупномасштабного искусственного выращивания культур *C. militaris* в виде плодовых тел и мицелия (Shih et al., 2007; Jiapeng et al., 2014; Kang et al., 2014). Существующие возможности улучшения коммерческого выращивания *C. militaris* связаны с выбором подходящего штамма и оптимизацией питательной среды.

На территории Нижне-енисейского лесничества Красноярского края в 2017 г. из погибших гусениц сибирского шелкопряда *Dendrolimus sibiricus* Tschetverikov, обнаруженных в подстилке и кроне *Abies sibirica* Ledeb., нами были выделены три новых изолята энтомопатогенных грибов.

Целью работы было определение таксономического положения изолятов; изучение и идентификация биологически активных соединений, продуцируемых штаммами, и установление оптимальных условий их образования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Штаммы и условия культивирования. Объектами исследования были три штамма *C. militaris* (L.) Fr. (1818) (*Cordycipitaceae*, *Hypocreales*, *Hypocreomycetidae*, *Sordariomycetes*, *Ascomycota*, *Fungi*) 11-3, 11-4, 11-5 из коллекции чистых культур лаборатории лесных культур, микологии и фитопатологии Института леса им. В.Н. Сукачева ФИЦ КНЦ СО РАН (Красноярск, Россия). Штаммы были выделены в 2017 г. из гусениц *D. sibiricus*. После поверхностной стерилизации 75%-м этанолом с последующим промыванием стерильной водой и подсушиванием между двумя слоями стерильной фильтровальной бумаги гусениц раскладывали во влажные камеры, а также на поверхность 2% мальт-экстракт агар (МЭА) с 0.5% танина и среды Чапека. Посевы инкубировали 7 сут при 25°C. Из мицелия, выросшего непосредственно из тела насекомого, изолировали чистые культуры грибов. Морфологические особенности колоний изучали на МЭА, картофельно-сахарозном агаре (КСА) и среде SNA (глюкоза – 0.2 г, сахароза – 0.2 г, KNO₃ – 1.0 г, KH₂PO₄ – 1.0 г, MgSO₄ × 7H₂O г, KCl – 0.5 г, дистиллированная вода 1 л; Nirenberg, 1990) на 7 и 14 сут роста. Микроструктуры оценивали методами светлопольной микроскопии с использованием микроскопа Nikon Eslipse Ci (“Nicon”, Япония). Видовую идентификацию штаммов подтверждали молекулярно-генетическими методами – секвенированием участков генетических маркеров ITS и TEF 1-alpha с использованием оборудования ЦКП “Инновационные технологии защиты растений” Всероссийского научно-исследовательского института защиты растений (Санкт-Петербург–Пушкин, РФ). Последовательность по ITS штамма 11-3 Siberia внесена в GenBank под номером SUB14449092 SH PP794588.

Штаммы выращивали в пробирках на скошенном глюкозо-картофельном агаре (ГКА) при 25°C и хранили при 4°C. Влияние температуры культивирования на скорость роста штаммов определяли в чашках Петри с ГКА при температурах 15, 25, 28 и 37°C. Оптимальную температуру выращивания оценивали по радиальной скорости роста колоний.

Влияние двух источников углерода на рост культур и биосинтез биологически активных соединений (БАС) изучали при глубинном или

поверхностном культивировании штаммов *C. militaris* в двух средах, содержащих по 50 г/л глюкозы или сахарозы и 10 г/л триптона. Изучение влияния пяти разных источников азота на процесс роста и биосинтеза БАС было проведено при глубинном культивировании штамма *C. militaris* 11-5 в присутствии 50 г/л глюкозы. Среда содержала 10 г/л триптона (“Difco”, США), 10 г/л гидролизата казеина (“Difco”, США), 5 г/л глутамата, 6 г/л NaNO_3 или 40 мл абиопептида (ООО “А-Био”, РФ). Концентрации других компонентов в средах составили (г/л дистиллированной воды): дрожжевой экстракт (“Difco”, США) – 9.0; KH_2PO_4 – 1.0; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.9; KCl – 0.01; $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.01; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.01. Грибы выращивали в колбах (750 мл): глубинно в 200 мл среды на шейкере (220 об./мин) в течение 12 сут или в стационарных условиях с 400 мл среды в течение 35 сут. Температура культивирования составляла $24 \pm 1^\circ\text{C}$. Среда засеивали 5–7-суточным мицелием, выращенным глубинно в 2%-ом мальт-экстракте (“Difco”, США).

Изучение накопления ПС и потребления углеводов в процессе роста *C. militaris* 11-5. Гриб выращивали в 5 л ферментере Minifors (“Infors HT”, Швейцария) с 3.5 л среды, содержащей 50.0 г/л сахарозы и 40 мл/л абиопептида. Концентрация других компонентов указана выше. Ферментер засеивали 5–7 сут культурой, выращенной глубинно в колбах (750 мл) с 200 мл вышеописанной среды на шейкере (200 об./мин) при 24°C . Посевная доза инокулята составила 10 об. % (сухая масса мицелия 1.4 г/л). Силиконовый пеногаситель Silicone anti-foam M-30 (“Serva”, США) вносили в концентрации 0.1%. При культивировании гриба температуру в ферментере поддерживали на уровне $24 \pm 1^\circ\text{C}$, а pH среды – 5.0 ± 0.2 периодическим внесением 5%-го раствора NaOH. Отбор проб проводили два раза в сутки. В пробах определяли концентрацию биомассы, углеводов и внеклеточных ПС, также проводили микроскопирование культуры и контроль на присутствие посторонней микрофлоры.

Определение биомассы. Мицелий отделяли от культуральной жидкости фильтрованием через бумажный фильтр (Белая лента, РФ) и навеску биомассы высушивали до постоянного веса при температуре 105°C .

Определение углеводов. Углеводы в среде определяли спектрофотометрически антроновым методом при λ 625 нм (Рое, 1955). Расчет содержания углеводов проводили по калибровочной кривой, построенной по глюкозе.

Идентификация нуклеозидов. Внутриклеточные нуклеозиды выделяли из мицелия, высушенного до постоянного веса при температуре 60°C , трехкратной экстракцией метанолом. Внеклеточные нуклеозиды выделяли из фильтрата культуральной

жидкости трехкратной экстракцией хлороформом. Растворители удаляли в вакууме. Экстракты анализировали методом ТСХ на пластинках силикагеля 10×10 см (Silica gel 60 F₂₅₄, “Merck”, Германия) в системе этилацетат–метанол–вода (100 : 15 : 10) (Thuy et al., 2023). Соединения обнаруживали по поглощению в УФ-свете при 254 нм. Нуклеозиды выделяли препаративной ТСХ на пластинках силикагеля (Silica gel F₂₅₄, “Merck”, Германия) в системе растворителей. Идентификацию выделенных соединений осуществляли на основе сравнения данных УФ-спектроскопии и масс-спектрометрии с литературными источниками. Подробную информацию о структуре соединений получали при анализе МС/МС спектров при энергии коллизии 20–40 %. УФ-спектры соединений в метаноле получали на спектрофотометре UV-160A (“Shimadzu”, Япония). Масс-спектры соединений регистрировали на квадрупольном масс-спектрометре LCQ Advantage MAX (“Thermo Finnigan”, Германия), используя одноканальный шприцевой насос для прямого ввода образца в камеру для химической ионизации при атмосферном давлении.

Количественное определение нуклеозидов. К навеске биомассы (200 мг) добавляли 4 мл 50% этанола и выдерживали при температуре 60°C в течение 1 ч. Экстракты в пяти повторностях наносили на пластину силикагеля в объеме 5 мкл и хроматографировали в системе растворителей. В качестве стандарта использовали кордицепин (“Sigma”, США), который наносили на пластины в аналогичном объеме в нескольких концентрациях. Анализ хроматограмм осуществляли с последующим их сканированием в денситометре (“SORBFIL”, РФ). Концентрацию нуклеозидов в полученных экстрактах определяли с помощью программы Sorbfil TLC View.

Количественное определение внеклеточных и внутриклеточных полисахаридов. К 5 мл фильтрата культуральной жидкости добавляли 30 мл 96% этанола и выдерживали 12–15 ч при 4°C . Полученный осадок отделяли центрифугированием в течение 15 мин при 6000 об./мин. Осадок суспендировали в 0.3 N NaOH и выдерживали на водяной бане в течение 30 мин при температуре 60°C (Li et al., 2021). Общее количество сахаров в препарате ПС определяли по методу с фенолсерной кислотой (Dubois et al., 1956). Для этого к 1 мл раствора добавляли 0.5 мл 5% фенола и 2.5 мл H_2SO_4 (конц.) и выдерживали на кипящей водяной бане в течение 20 мин. Полученный раствор анализировали на спектрофотометре при 490 нм. Расчет вели, используя калибровочную кривую, построенную по раствору глюкозы в различных концентрациях.

Для определения внутриклеточных ПС к навеске биомассы (200 мг) добавляли 5 мл H_2O (дист.)

и выдерживали в кипящей водяной бане в течение 30 мин. Раствор фильтровали через бумажный фильтр, осадок промывали. Фильтрат анализировали по методу, указанному выше.

Расчет основных характеристик роста и биосинтеза ПС (Перт, 1978):

Удельную скорость роста гриба (μ , ч⁻¹) рассчитывали по формуле: $\mu = ((\lg x - \lg x_0) / t) \times 2.3$;

Скорость потребления субстрата культурой (q_s , г/г·ч): $q_s = (s - s_0) / x \times t$;

Удельную скорость образования продукта культурой (q_p , г/г·ч): $q_p = (p - p_0) / x \times t$;

Экономический коэффициент (Y_s): $Y_s = x - x_0 / s - s_0$, где x_0 — концентрация биомассы в начальный момент времени; x — концентрация биомассы в конечный момент времени; s_0 — концентрация субстрата в начальный момент времени; s — концентрация субстрата в конечный момент времени; p_0 — концентрация продукта в начальный момент времени; p — концентрация продукта в конечный момент времени; t — время.

Статистический анализ. Статистический анализ проводили с использованием стандартных методов, обеспеченных программой Microsoft Office Excel 2013. Анализы биомассы, ПС проводили не менее трех раз, нуклеозидов — не менее пяти раз. Их содержание представлено в виде

среднего арифметического значения $\pm$ стандартная ошибка. Доверительные интервалы не превышали $\pm 5\%$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Морфология штаммов *C. militaris*. Исследуемые штаммы, выделенные из гусениц *Dendrolimus sibiricus* (рис. 1а), характеризовались схожими морфологическими признаками. На МЭА культуры грибов формировали округлые выпуклые колонии светло-сливочного цвета порошистой структуры за счет обильного спороношения; при старении культур иногда появлялся экссудат светло-желтого цвета; реверс бледно-желтый или светло-коричневый (рис. 1б).

На КСА колонии более приземистые, пушистые, слегка припорошенные, мицелий белого цвета (рис. 1в), но при старении культуры появляется слабый сливочный оттенок. Реверс окрашен в различные оттенки желтого (рис. 1г). У штамма 11-3 реверс бледно-желтый, у 11-4 светло-коричневый, у 11-5 — ярко-желтый. Оптимальная температура роста штаммов *C. militaris* составила 25°C; при 28°C рост отсутствовал. Наибольшую скорость роста отмечена у штамма 11-5 *C. militaris* (2.5 мм/сут);

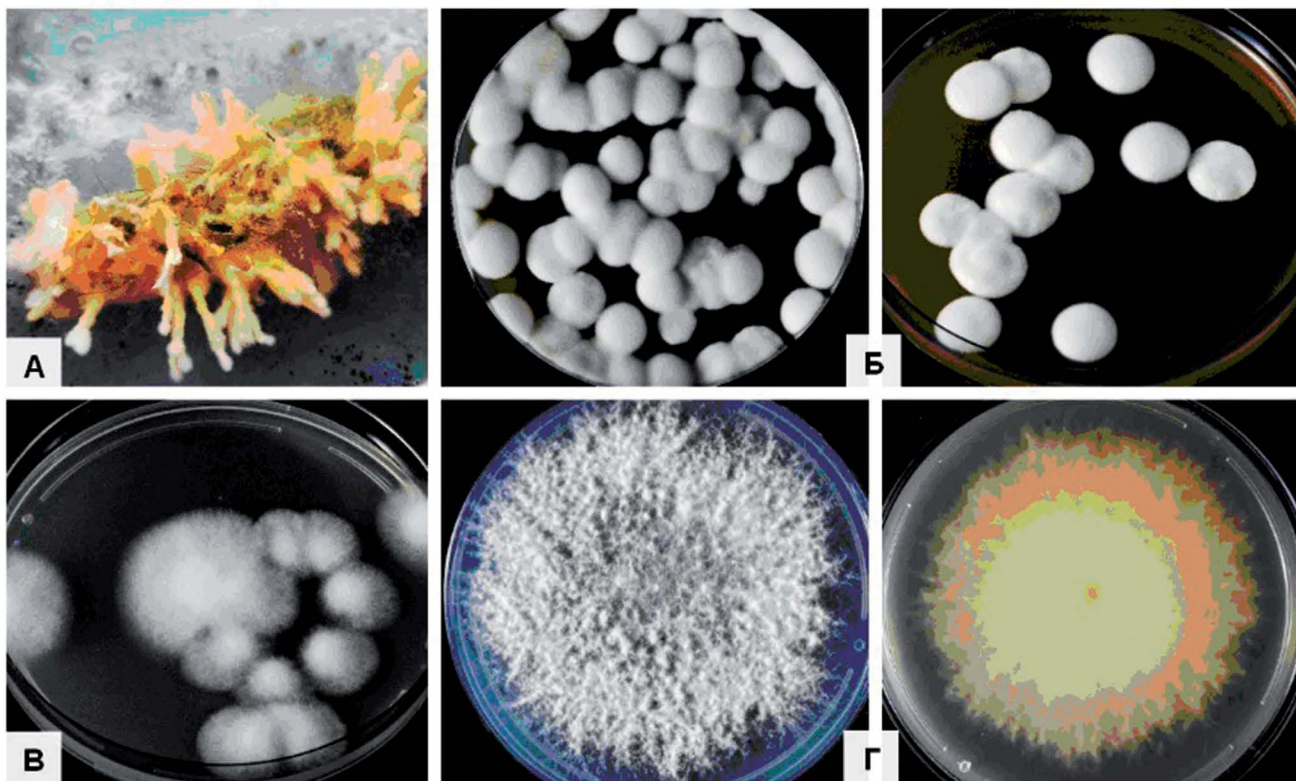


Рис. 1. Морфология колоний *C. militaris* 11-3: а — мицелий гриба на гусенице *Dendrolimus sibiricus*; б — колонии на МЭА; в — колонии на КСА (7 сут); г — колонии (слева) и реверс колонии (справа) при старении культуры на КСА (14 сут).

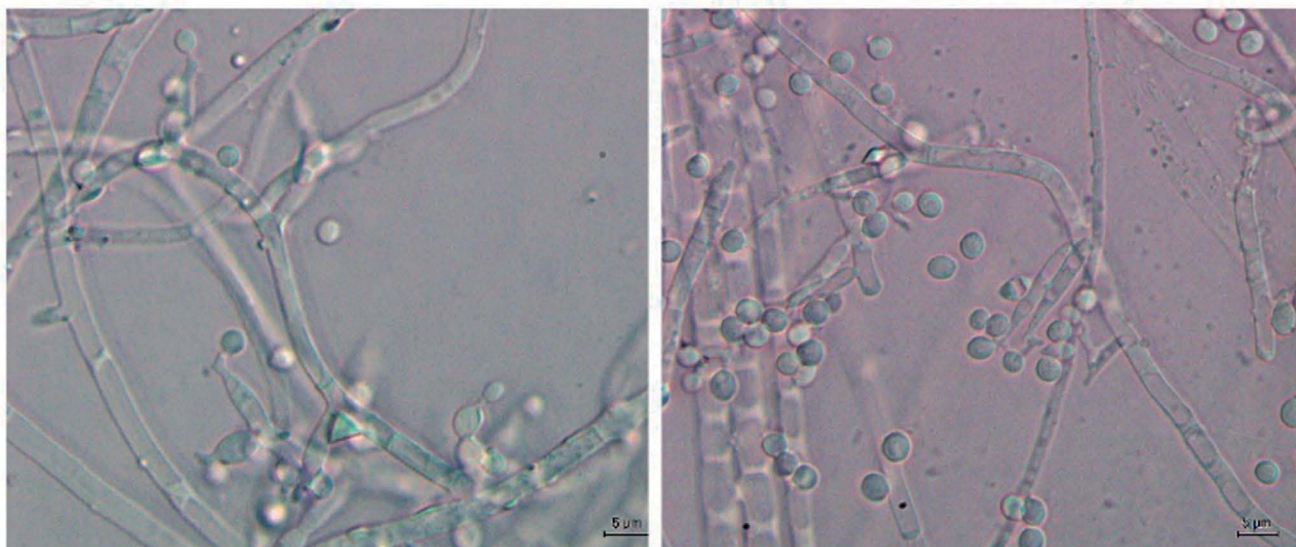


Рис. 2. Бесполое размножение штамма *C. militaris* 11-3 на среде SNA (7 сут).

скорость роста штаммов 11-3 и 11-4 была ниже на 30 и 12% соответственно.

Вегетативный мицелий анаморфной формы *C. militaris* представлен разветвленными, равномерно септированными гифами 1.5–3 мкм в диаметре, которые в отдельных случаях формировали мицелиальные тяжи. Фиалиды расположены одиночно или пучками на разном уровне, бутылковидной формы с утолщением у основания, размером 10–30 × 1.5–2.3 мкм. Верхняя конидия эллиптическая или коротко цилиндрическая размером 3.2–6.0 × 3.0 мкм, другие шаровидные диаметром 2.3–3.0 мкм (рис. 2).

По результатам молекулярно-генетических исследований с использованием праймеров ITS и TEF-1α штамм 11-3 был отнесен к виду *C. militaris* (рис. 3).

На филогенетическом дереве, построенном на основе метода максимального правдоподобия (ML) для штамма 11-3 и последовательностей *C. militaris* из NCBI GenBank с использованием праймеров TEF-1α, штамм попадает в обособленную кладу (рис. 3б). На основании сравнения макро- и микроморфологических признаков все исследуемые штаммы были отнесены к виду *C. militaris*.

Идентификация нуклеозидов. Анализ экстрактов из биомассы трех штаммов показал наличие метаболита 1 с R_f 0.55 и метаболита 2 с R_f 0.63, при этом стандарт кордицепина имел R_f 0.60 (рис. 4).

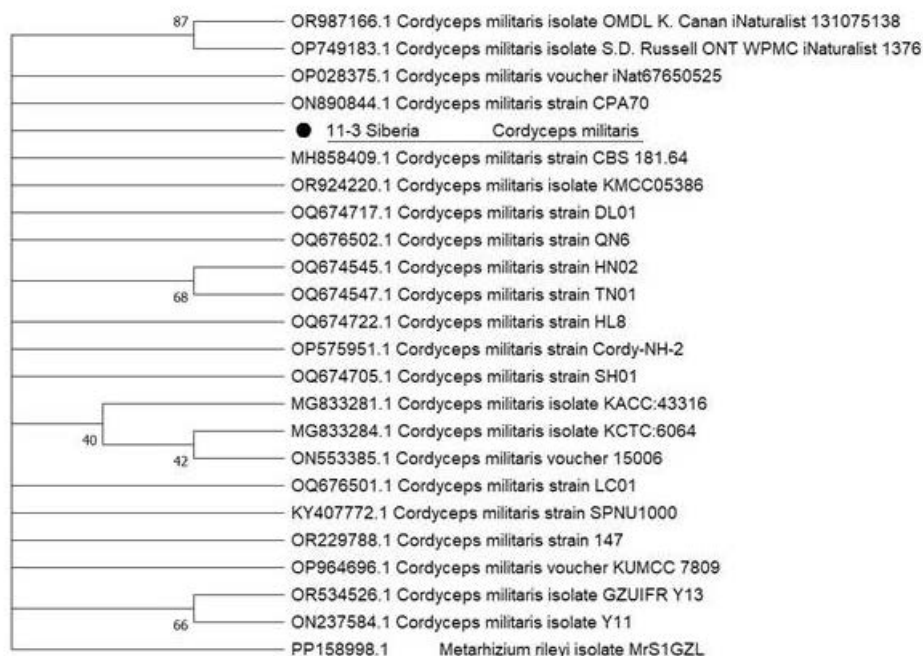
УФ-спектр метаболитов имел близкие значения максимальных полос поглощения: метаболит 1 при $\lambda_{\max}$ 211, 260 нм, метаболит 2 при $\lambda_{\max}$ 209, 261 нм, а стандарт кордицепина $\lambda_{\max}$ 211, 259 нм. Молекулярный ион метаболита 1 в положительных ионах имел массу 268 (M + H)⁺, при этом в МС/

МС спектре преобладал фрагментный ион с m/z 136, соответствующий катиону аденина. Молекулярный ион стандарта кордицепина показал массу 252 (M + H)⁺, а МС/МС содержал аналогичный фрагментный ион с m/z 136. На основании этих полученных данных метаболит 1 был идентифицирован как аденозин. Метаболит 2 имел положительный молекулярный ион 282 (M + H)⁺, который также содержал ион с m/z 136, что соответствовало по литературным данным кордизинину В (2-метиладенозин) (Yang et al., 2011).

Аденозин является основным нуклеозидом, накапливаемым *Cordyceps* spp. Он выполняет важную роль в биохимических процессах в организме, таких как передача энергии (АТФ и АДФ) и сигналов в клетках. В ответ на стресс или ранение аденозин проявляет в основном цитопротекторное действие, защищая ткани от повреждения в случаях гипоксии, ишемии или судорог (Kitakaze, Hori, 2000; Nakav et al., 2008). Аденозин опосредует свои эффекты через активацию рецепторов, связанных с G-белком, а именно A₁, A_{2A}, A_{2B} и A₃ (Gessi et al., 2014). В частности, в клетках кожи этот эндогенный нуклеозид, действуя на один или несколько рецепторов, может участвовать в защите и восстановлении поврежденной ткани. Кроме того, сообщается, что аденозин подавляет рост опухолевых клеток посредством активации различных внешних и внутренних сигнальных путей. В обоих путях аденозин активирует каспазы митохондриально-зависимым и/или независимым образом (Yang et al., 2007).

Кордизинин В впервые был выделен из мицелия *C. sinensis* (Yang et al., 2011). Как аденозин, так и кордизинин В показали индуцирующую CRE-опосредованную транскрипцию в клетках PC 12,

(a)



(б)

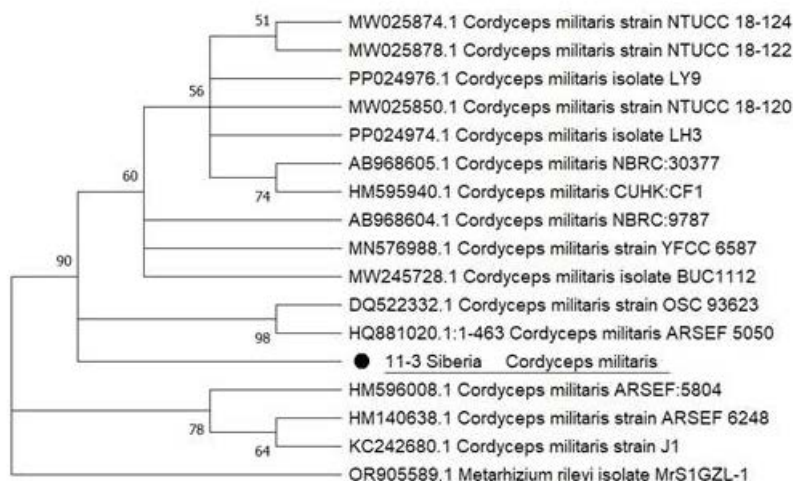


Рис. 3. Филогенетическое дерево на основе метода максимального правдоподобия (ML) для штамма 11-3 (Siberia) и последовательностей *C. militaris* из NCBI GenBank: а – с использованием праймеров ITS (бутстреп-значения более 40% указаны рядом с кластерами); б – с использованием праймеров TEF-1α (бутстреп-значения более 50% указаны рядом с кластерами). В качестве внешней группы использовали *Metarhizium rileyi*.

что важно в лечении нарушения памяти при болезни Альцгеймера (Ohizumi et al., 2021). Это действие, по крайней мере частично, является результатом активации аденозиновых рецепторов A_1 , A_{2A} и A_{2B} .

Известный для *C. militaris* кордицепин (3'-дезоксиаденозин) у изученных штаммов не был обнаружен. Кордицепин представляет собой соединение широкого спектра действия, обладающее

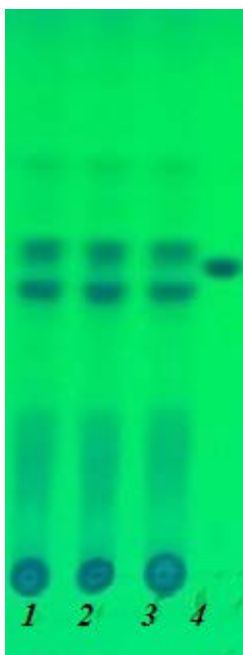


Рис. 4. Хроматограмма экстрактов под УФ-светом ($\lambda = 254$ нм) из биомассы штаммов *C. militaris*: 1 – 11-3; 2 – 11-4; 3 – 11-5; 4 – стандарт кордицепина.

противовоспалительной, болеутоляющей, противоопухолевой, антибактериальной, антивирусной и инсектицидной активностью (Liu et al., 2015). Известно, что биосинтез кордицепина начинается с аденозина и протекает последовательно путем фосфорилирования, дефосфорилирования и восстановления. В геноме продуцирующего кордицепин *C. militaris* было идентифицировано четыре гена кордицепинсинтетазы *cns1-cns4*. По данным разных авторов содержание кордицепина в мицелии у штаммов *C. militaris* может колебаться от следовых количеств до 8570 мг/л, а в плодовых телах от 0.6 до 77.4 мг/г (Kontogiannatos et al., 2021). Такую изменчивость в продукции кордицепина объясняют штаммовыми различиями. Геном штаммов *C. militaris* оказывает влияние как на способность образовывать плодовые тела, так и на способность к биосинтезу кордицепина (Kontogiannatos et al., 2021). Отсутствие биосинтеза кордицепина у исследованных штаммов может быть связано с неактивным состоянием генов кордицепинсинтетазы *cns1-cns4*.

Таким образом, изученные сибирские штаммы *C. militaris* являются продуцентами двух нуклеозидов – аденозина и кордизинина В. Следует отметить, что наличие у *C. militaris* кордизинина В, как одного из основных метаболитов, обнаружено впервые.

Влияние способа культивирования и различных источников углерода и азота на образование БАС штаммами *C. militaris*. В табл. 1 приведены

показатели роста, биосинтеза ПС и нуклеозидов при глубинном и поверхностном культивировании сибирских штаммов *C. militaris* в средах с глюкозой или сахарозой.

Можно видеть, что урожай биомассы на сахарозе был выше по сравнению с глюкозой, независимо от способа выращивания штаммов. Нуклеозиды (аденозин и кордизинин В) были идентифицированы только в мицелии. Их содержание было выше при росте на сахарозе по сравнению с глюкозой и в зависимости от штамма и способа выращивания колебалось от 60 до 399 мг/л. Во всех пробах соотношение аденозина к кордизинину В было примерно одинаково.

ПС образовывались как в среде культивирования штаммов, так и в мицелии. На продукцию ПС большее влияние оказывал способ выращивания грибов, чем углеродный субстрат. При глубинном культивировании штаммов 11-3, 11-4 и 11-5 накопление суммарных ПС было в 1.4, 1.7 и 2.5 раза выше по сравнению с поверхностным. При этом доля внеклеточных ПС при глубинном культивировании, независимо от природы углевода, составляла 85–90%, а при поверхностном была ниже – 46–67% от суммы ПС.

Источник углерода является одним из наиболее важных питательных веществ для биосинтеза ПС. Отходы сельского хозяйства, такие как рисовые отруби, барда, картофельная декстроза и другие побочные продукты могут применяться в качестве источника углерода для ферментации *Cordyceps* (Chen et al., 2016). Ферменты гриба модифицируют сложные углеводы до моносахаридных остатков, которые используются в биосинтезе полисахаридов. Глюкоза и сахароза являются самыми распространенными и благоприятными источниками углерода для роста биомассы и производства ПС в большинстве микробных ферментаций (Mao et al., 2005; Radchenkova et al., 2011; Wu et al., 2014). Максимальное значение концентрации ПС 5.7 г/л было получено при культивировании штамма *C. militaris* в среде, содержащей 40 г/л глюкозы и 10 г/л дрожжевого экстракта (Wang et al., 2019). Сравнение полученных нами данных с литературными показало, что изученные штаммы являются высокоактивными продуцентами ПС. Их суммарное содержание у штамма 11-5 при глубинном культивировании на сахарозе достигало 6.0–6.7 г/л по сравнению с известными у *C. militaris* – от 0.4 до 5.7 г/л (Yang et al., 2020).

Большое количество исследований для увеличения продукции ПС грибами *C. militaris* посвящено источникам азота и соотношению С : N в среде культивирования (Yang et al., 2020). При выращивании *C. militaris* обычно используют как органические (пептоны, гидролизаты казеина, дрожжевой экстракт и др.), так и неорганические

Таблица 1. Показатели роста, биосинтеза ПС и нуклеозидов при глубинном и поверхностном выращивании штаммов *C. militaris* с разными углеводами

Показатели	Углевод	Культивирование штаммов					
		11-3		11-4		11-5	
		Глубинное	Поверх- ностное	Глубинное	Поверх- ностное	Глубинное	Поверх- ностное
Биомасса, г/л	Глюкоза	27.2 ± 1.5	13.9 ± 1.2	20.1 ± 1.3	29.5 ± 1.8	20.3 ± 1.4	20.7 ± 1.5
	Сахароза	28.1 ± 1.2	13.3 ± 0.9	23.1 ± 1.4	31.2 ± 1.5	27.5 ± 1.3	24.6 ± 1.4
Внеклеточные ПС, г/л	Глюкоза	4.8 ± 0.4	2.8 ± 0.3	3.7 ± 0.4	1.3 ± 0.2	4.6 ± 0.3	1.2 ± 0.1
	Сахароза	4.2 ± 0.8	2.8 ± 0.3	4.8 ± 0.7	1.8 ± 0.3	5.1 ± 1.2	1.1 ± 0.3
Внутриклеточные ПС, г/л	Глюкоза	0.9 ± 0.1	1.4 ± 0.2	0.5 ± 0.1	1.2 ± 0.2	0.7 ± 0.1	1.1 ± 0.3
	Сахароза	0.8 ± 0.1	1.0 ± 0.2	0.4 ± 0.1	1.2 ± 0.3	0.9 ± 0.2	1.3 ± 0.2
Сумма полисахаридов, г/л	Глюкоза	5.7	4.2	4.2	2.5	5.4	2.3
	Сахароза	5.0	3.8	5.2	3.0	6.0	2.4
Аденозин, мг/л	Глюкоза	122 ± 12	35 ± 4	141 ± 11	162 ± 15	100 ± 16	101 ± 14
	Сахароза	171 ± 13	33 ± 6	141 ± 17	209 ± 23	118 ± 15	165 ± 34
Кордизинин В, мг/л	Глюкоза	101 ± 9	29 ± 2	90 ± 10	180 ± 21	63 ± 12	122 ± 19
	Сахароза	138 ± 21	27 ± 2	60 ± 12	190 ± 15	83 ± 12	145 ± 23
Сумма нуклеозидов, мг/л	Глюкоза	223	64	231	342	163	223
	Сахароза	309	60	201	399	201	310

источники азота (аммоний и нитрат). Влияние пяти источников азота на рост и биосинтез БАС изучали при глубинном культивировании штамма *C. militaris* 11-5 в среде с глюкозой. В исходных средах отношение C: N ~ 20: 1.

Из результатов табл. 2 можно видеть, что при использовании нитрата, гидролизата казеина, триптона и абиопептида урожай биомассы был в 1.3, 1.3, 1.3, 1.6 и 2 раза ниже, соответственно, по сравнению с глутаматом. Но глутамат, нитрат, гидролизат казеина не способствовали биосинтезу ПС культурой. Суммарное количество ПС на триптоне и абиопептиде было в 2–3 раза выше по сравнению с другими источниками азота. Содержание нуклеозидов было примерно в 2 раза выше в среде

с абиопептидом по сравнению с другими источниками азота. При использовании абиопептида культурой аденозин преобладал и составил 73% от суммы нуклеозидов. Таким образом, в нашем исследовании наибольшая продукция ПС и нуклеозидов штаммом *C. militaris* 11-5 наблюдалось при использовании абиопептида.

Динамика роста и накопления полисахаридов *C. militaris* 11-5. С целью выяснения особенностей роста и биосинтеза ПС было проведено культивирование штамма *C. militaris* 11-5 ферментере. Гриб выращивали в среде, содержащей сахарозу и абиопептид, в условиях лимита по кислороду: значения рО₂ находились около 1% от насыщения воздухом. Это было достигнуто небольшой

Таблица 2. Влияние источников азота на показатели роста, биосинтеза ПС и нуклеозидов *C. militaris* 11-5

Показатели	Источник азота				
	Глутамат	Нитрат натрия	Гидролизат казеина	Триптон	Абиопептид
Биомасса, г/л	33.2 ± 1.9	25.4 ± 1.4	24.8 ± 1.7	20.3 ± 1.7	17.0 ± 0.8
Внеклеточные ПС, г/л	2.5 ± 0.4	1.7 ± 0.3	2.5 ± 0.2	5.1 ± 0.5	6.0 ± 0.6
Внутриклеточные ПС, г/л	1.1 ± 0.3	0.3 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.9 ± 0.2	0.7 ± 0.1
Сумма ПС, г/л	3.6	2.0	2.9	6.0	6.7
Аденозин, мг/л	136 ± 21	144 ± 28	94 ± 17	100 ± 22	264 ± 23
Кордизинин В, мг/л	96 ± 13	118 ± 17	74 ± 12	122 ± 17	126 ± 19
Сумма нуклеозидов, мг/л	232	262	168	222	390

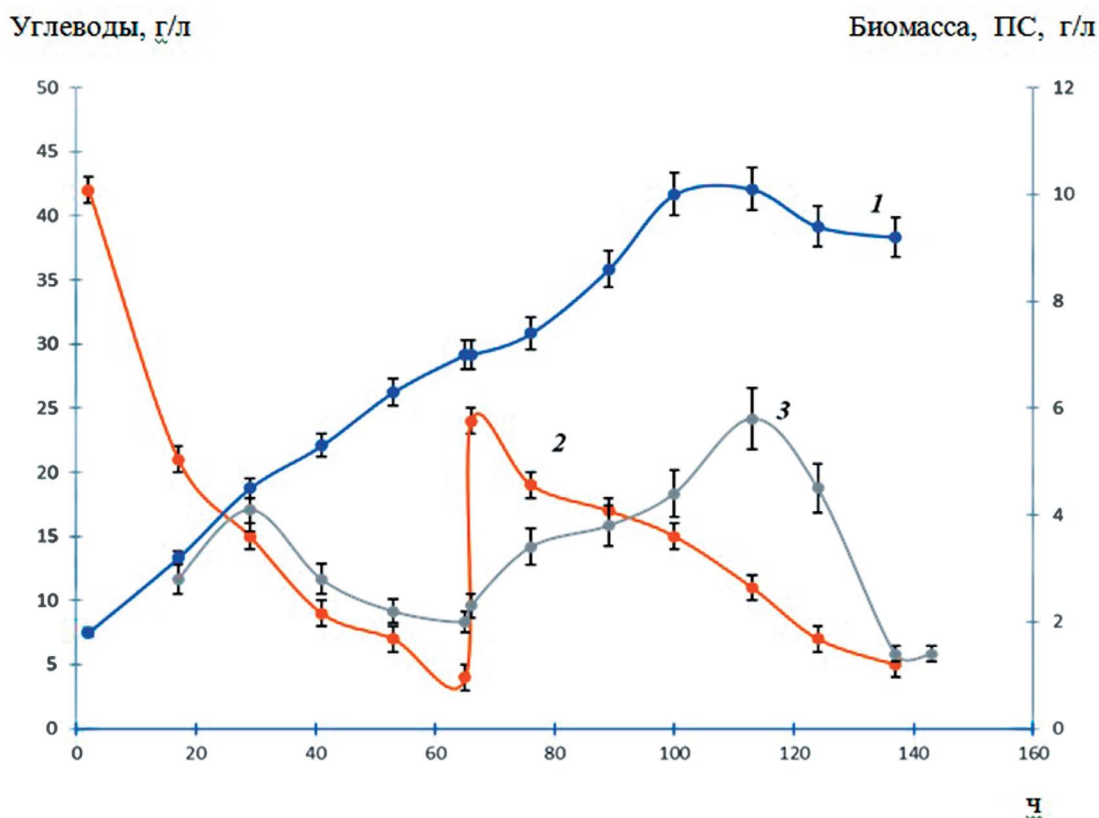


Рис. 5. Динамика роста, синтеза ПС и потребления углеводов *C. militaris* 11-5: 1 — биомасса, г/л; 2 — углеводы, г/л; 3 — ПС, г/л.

скоростью подачи воздуха (до 2 л/мин) и скоростью вращения мешалки до 400 об./мин. В процессе культивирования гриба, помимо глубинного роста, также наблюдался пристеночный (поверхностный) рост мицелия выше уровня среды. Культуральная суспензия была гомогенной и имела бледно желто-коричневый цвет. Вегетативный мицелий был представлен разветвленными равномерно септированными гифами до 3 мкм в диаметре, которые в отдельных случаях формировали мицелиальные тяжи. С 5 сут роста наблюдалось формирование фиалид и образование конидий. Далее происходило массовое прорастание этих конидий и дальнейший рост гиф.

На рис. 5 представлена динамика роста гриба, изменения концентрации углеводов и ПС в среде культивирования.

Можно видеть, что активный рост мицелия и потребление углеводов наблюдались до 41 ч. Затем происходило снижение этих показателей, что связано с уменьшением концентрации углеводов в среде до 4 г/л. При внесении сахарозы до 24 г/л на 65 ч культивирования активный рост и потребление субстрата грибом восстановилось. Таким образом, показано, что биосинтез внеклеточных ПС культурой зависел

от концентрации углеродного субстрата в среде. Биосинтез ПС наблюдался при концентрации углевода не ниже 10 г/л, а при дальнейшем снижении концентрации субстрата происходило потребление ПС культурой. Выход полисахаридов от потребленного субстрата ($Y_{\text{ПС/с}}$) составил 0.12. Максимальные удельные скорости роста (μ), потребления сахарозы ($q_{\text{сах}}$) и биосинтеза ПС ($q_{\text{ПС}}$) наблюдались в первые сутки роста и составили 0.038 ч⁻¹, 0.44 г/г·ч, 0.28 г/г·ч соответственно. Таким образом, в процессе культивирования гриба наблюдался двухфазный характер образования ПС, связанный с повторным внесением углевода в среду. Снижение концентрации ПС связано с низким уровнем углеводов в среде. По-видимому, ПС можно рассматривать как запасные источники углерода, которые начинают потребляться культурой при низких значениях концентрации углеродного субстрата в среде.

Таким образом, наше исследование показало, что сибирские штаммы *C. militaris*, выделенные в Красноярском крае из погибших гусениц сибирского шелкопряда *Dendrolimus sibiricus* Tschetverikov, отличаются от известных штаммов этого вида отсутствием биосинтеза кордицепина. Это может быть связано с неактивным

состоянием генов кордицепинсинтетазы *cns1-cns4*. Сибирские штаммы являются высокоактивными продуцентами биологически активных соединений, таких как полисахариды, аденозин и кордизинин В. Кордизинин В у вида *C. militaris* обнаружен впервые. Суммарное содержание полисахаридов при глубинном культивировании *C. militaris* 11-5 на сахарозе достигало 6.0–6.7 г/л, что сопоставимо с литературными данными. Следовательно, исследованные штаммы представляют интерес для биотехнологии. Полисахариды можно рассматривать как запасные источники углерода, которые начинают потребляться культурой, при недостаточной концентрации углеродного субстрата в среде. Исследование моносакхаридного состава полисахаридов еще предстоит изучить.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование проводилось в рамках Государственного задания и частично поддержано грантом РНФ № 23-26-00052 (<https://rscf.ru/project/23-26-00052>).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Евлахова А.А. Энтомопатогенные грибы. Л.: Наука, 1974. 260 с.
- Огарков Б.Н., Огарков О.Б., Огаркова Г.Р., Самусенок Л.В. Грибы рода *Cordyceps* (Fr.) Link em. Kabayasi et Mains из экосистем Южного Байкала как продуценты высоких концентраций иммунomodулятора кордицепина // Известия Иркутского государственного университета. Серия: Биология. Экология. 2012. Т. 5. № 2. С. 75–80.
- Перт С.Д. Основы культивирования микроорганизмов и клеток. М.: Мир, 1978. 331 с.
- Ashraf S.A., Elkhailifa A.E.O., Siddiqui A.J., Patel M., Awadelkareem A.M., Snoussi, M., Ashraf M.S., Adnan M., Hadi S. Cordycepin for health and wellbeing: a potent bioactive metabolite of an entomopathogenic medicinal fungus *Cordyceps* with its nutraceutical and therapeutic potential // *Molecules*. 2020. V. 25. Art. 2735.
- Chen X., Wu J.Y., Gui X.T. Production and characterization of exopolysaccharides in mycelial culture of *Cordyceps sinensis* fungus Cs-HK1 with different carbon sources // *Chin. J. Chem. Eng.* 2016. V. 24. P. 158–162.
- Chen X., Zhang Y., Ma W., Zhu Y., Wu X., Wang Zh. Effects of *Cordyceps militaris* polysaccharide on egg production, egg quality and caecal microbiota of layer hens // *J. World Poult. Res.* 2020. V. 10. P. 41–51.
- Cui J.D. Biotechnological production and applications of *Cordyceps militaris*, a valued traditional Chinese medicine // *Crit. Rev. Biotechnol.* 2015. V. 35. P. 475–484.
- Das G., Shin H.S., Leyva-Gómez G., Prado-Audelo M.L.D., Cortes H., Singh Y.D., Panda M.K., Mishra A.P., Nigam M., Saklani S., Chaturi P.K., Martorell M., Cruz-Martins N., Sharma V., Garg N., Sharma R., Patra J.K. *Cordyceps* spp.: a review on its immune-stimulatory and other biological potentials // *Front. Pharmacol.* 2021. V. 8. Art. 602364.
- Gessi S., Merighi S., Borea P.A. Targeting adenosine receptors to prevent inflammatory skin diseases // *Experim. Dermatol.* 2014. V. 23. P. 553–554.
- Jędrejko K.J., Lazur J., Muszyńska B. *Cordyceps militaris*: an overview of its chemical constituents in relation to biological activity // *Foods*. 2021. V. 10. Art. 2634.
- Jędrejko K., Kała K., Sułkowska-Ziaja K., Krakowska A., Zięba P., Marzec K., Szewczyk A., Sękara A., Pytko-Polończyk J., Muszyńska B. *Cordyceps militaris* – fruiting bodies, mycelium, and supplements: valuable component of daily diet // *Antioxidants (Basel)*. 2022. V. 11. Art. 1861.
- Jiapeng T., Yiting L., Li Z. Optimization of fermentation conditions and purification of cordycepin from *Cordyceps militaris* // *Prep. Biochem. Biotechnol.* 2014. V. 44. P. 90–106.
- Kang C., Wen T.C., Kang J.C., Meng Z.B., Li G.R., Hyde K.D. Optimization of large-scale culture conditions for the production of cordycepin with *Cordyceps militaris* by liquid static culture // *Sci. World J.* 2014. V. 2014. Art. 510627.
- Kim S.W., Hwang H.J., Xu C.P., Na Y.S., Song S.K., Yun J.W. Influence of nutritional conditions on the mycelial growth and exopolysaccharide production in *Paecilomyces sinclairii* // *Lett. Appl. Microbiol.* 2002. V. 34. P. 389–393.
- Kitakaze M., Hori M. Adenosine therapy: a new approach to chronic heart failure // *Expert Opin. Investig. Drugs*. 2000. V. 9. P. 2519–2535.
- Kontogiannatos D., Koutrotsios G., Xekalaki S., Zervakis G.I. Biomass and cordycepin production by the medicinal mushroom *Cordyceps militaris* – a review of various aspects and recent trends towards the exploitation of a valuable fungus // *J. Fungi (Basel)*. 2021. V. 7. Art. 986.

- Kryukov V.Yu., Tomilova O.G., Yaroslavtseva O.N., Wen T.C., Kryukova N.A., Polenogova O.V., Tokarev Y.S., Glupov V.V. Temperature adaptations of *Cordyceps militaris*, impact of host thermal biology and immunity on mycosis development // Fungal Ecol. 2018. V. 35. P. 98–107.
- Liu Y., Wang J., Wang W., Zhang H., Zhang X., Han C. The chemical constituents and pharmacological actions of *Cordyceps sinensis* // Evid. Based Complement. Alternat. Med. 2015. V. 2015. Art. 575063.
- Mao X.B., Eksriwong T., Chauvatcharin S., Zhong J.J. Optimization of carbon source and carbon/nitrogen ratio for cordycepin production by submerged cultivation of medicinal mushroom *Cordyceps militaris* // Process Biochem. 2005. V. 40. P. 1667–1672.
- Miao M., Yu W.Q., Li Y., Sun Y.L., Guo S.D. Structural elucidation and activities of *Cordyceps militaris* – derived polysaccharides: a review // Front. Nutrit. 2022. V. 9. Art. 898674.
- Nakav S., Chaimovitz C., Sufaro Y., Lewis E.C., Shaked G., Czeiger D., Zlotnik M., Douvdevani A. Anti-inflammatory preconditioning by agonists of adenosine A1 receptor // PLoS One. 2008. V. 3. Art. e2107.
- Nirenberg H.I. Recent advances in the taxonomy of *Fusarium* // Stud. Mycol. 1990. V. 32. P. 91–101.
- Ohizumi Y., Kawada M., Kamada M., Nakajima A., Kajima K., Uozumi N., Hara Y., Guo Y., Ishibashi M. Isolation of adenosine and cordysinin B from *Anredera cordifolia* that stimulates CRE-mediated transcription in PC12 cells // Planta Med. Int. Open. 2021. V. 8. P. e19–e24.
- Olatunji O.J., Tang J., Tola A., Auberon F., Oluwaniyi O., Ouyang Z. The genus *Cordyceps*: an extensive review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology // Fitoterapia. 2018. V. 129. P. 293–316.
- Qu S.L., Li S.S., Li D., Zhao P.J. Metabolites and their bioactivities from the genus *Cordyceps* // Microorganisms. 2022. V. 10. Art. 1489.
- Radchenkova N., Tomova A., Kambourova M.. Biosynthesis of an exopolysaccharide produced by *Brevibacillus thermoruber* 438 // Biotechnol. Biotechnol. Equip. 2011. V. 25. P. 77–79.
- Roe J.H. The determination of sugar in blood and spinal fluid with anthrone reagent // J. Biolog. Chem. 1955. V. 212. P. 335–343.
- Shih I.L., Tsai K-L., Hsieh Ch., Effects of culture conditions on the mycelial growth and bioactive metabolite production in submerged culture of *Cordyceps militaris* // Biochem. Engineer. J. 2007. V. 33. P. 193–201.
- Thuy D.T.P., Anh T.T.N., Thuy N.T.T., Intaparn P., Tapingkae T., Mai N.T. Simple and efficient method for the detection and quantification of cordycepin content in *Cordyceps* // Chiang Mai J. Sci. 2021. V. 48. P. 420–428.
- Wang C.C., Wu J.Y., Chang C.Y., Yu S.T., Liu Y.C. Enhanced exopolysaccharide production by *Cordyceps militaris* using repeated batch cultivation // J. Biosci. Bioeng. 2019. V. 127. P. 499–505.
- Wu J.Y., Leung P.H., Wang W.Q., Xu C.P. Mycelial fermentation characteristics and anti-fatigue activities of a Chinese caterpillar fungus, *Ophiocordyceps sinensis* strain Cs-HK1 (Ascomycetes) // Int. J. Med. Mushrooms. 2014. V. 16. P. 105–114.
- Yang D., Yaguchi T., Yamamoto H., Nishizaki T. Intracellularly transported adenosine induces apoptosis in HuH-7 human hepatoma cells by downregulating c-FLIP expression causing caspase-3/-8 activation // Biochem. Pharmacol. 2007. V. 73. P. 1665–1675.
- Yang Sh., Yang X., Zhang H. Extracellular polysaccharide biosynthesis in *Cordyceps* // Crit. Rev. Microbiol. 2020. V. 46. P. 359–380.
- Yang M.L., Kuo P.C., Hwang T.L., Wu T.S. Anti-inflammatory principles from *Cordyceps sinensis* // J. Nat. Prod. 2011. V. 74. P. 1996–2000.
- Zhang J., Wen Ch., Duan Y., Zhang H., Ma H. Advance in *Cordyceps militaris* (Linn) Link polysaccharides: isolation, structure, and bioactivities: a review // Int.J. Biol. Macromol. 2019. V. 132. P. 906–914.

EXPERIMENTAL ARTICLES

**Formation of Biologically Active Compounds
by Siberian *Cordyceps militaris* (L.) Fr. Strains**

**T. V. Antipova^{1, 2, *}, V. P. Zhelifonova¹, B. P. Baskunov¹,
Y. A. Litovka^{3, 4}, M. M. Patrusheva^{3, 4}, V. B. Keshelava⁵, E. S. Mikhaylov^{6, 7},
I. N. Chistiakov⁸, I. N. Pavlov^{3, 4}**

¹*G.K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms,
FRC Pushchino Centre for Biological Research, Russian Academy of Sciences, Pushchino, 142290, Russia*

²*All-Russian Institute of Plant Protection, Pushkin, 196608, Saint-Petersburg, Russia*

³*V.N. Sukachev Institute of Forest, FRC KSC, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences,
Krasnoyarsk, 660036, Russia*

⁴*Reshetnev Siberian State University of Science and Technology, Krasnoyarsk, 660037, Russia*

⁵*Institute for Biological Instrumentation of the Russian Academy of Sciences, Pushchino, 142290, Russia*

⁶*Branch of Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
Pushchino, 142290, Russia*

⁷*Fundamental Biotechnology Department, RosBioTech University at Pushchino, Pushchino, 142290, Russia*

⁸*OOO "Pushchino Biotechnologies", Pushchino, 142290, Russia*

**e-mail: tatantip@rambler.ru*

Fungal strains isolated in the Krasnoyarsk Territory from dead caterpillars of the Siberian silkworm *Dendrolimus sibiricus* Tschetverikov, found in the litter and crown of *Abies sibirica* Ledeb., based on morphological and genetic methods, were assigned to the species *Cordyceps militaris* (L.) Fr. The strains are highly active producers of bioactive compounds such as polysaccharides (PS), adenosine and cordysin B. Cordysin B was first discovered in the species *C. militaris*. It was found that the production of PS was more influenced by the method of growing mushrooms than by the carbon substrate. The highest production of PS (6.0–6.7 g/l) and nucleosides (390 mg/l) of *C. militaris* 11-5 was observed during submerged cultivation on sucrose using aminopeptide. When studying the biosynthesis of PS during the growth of the fungus, it was found that the synthesized PS are consumed by the culture when the concentration of the carbon substrate in the environment decreases and, apparently, serve as reserve sources of carbon.

Keywords: cordyceps, nucleosides, adenosine, cordysin B, polysaccharides, fermentation

УДК 579.222.3:579.264

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ ФЕНОМЕНА ПРОДУКЦИИ ПЕПТИДНЫХ ФАКТОРОВ АНТАГОНИЗМА СРЕДИ КОАГУЛАЗОНЕГАТИВНЫХ СТАФИЛОКОККОВ

© 2024 г. Т. В. Полюдова^{a, b, *}, Л. М. Лемкина^a, М. В. Антипьева^{a, b},
А. Л. Есаев^a, В. П. Коробов^a

^aИнститут экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, 614581, Россия

^bПермский государственный аграрно-технологический университет, Пермь, 614990, Россия

*e-mail: polyudova@iegm.ru

Поступила в редакцию 16.05.2024 г.

После доработки 21.06.2024 г.

Принята к публикации 27.06.2024 г.

Проведен скрининг коагулазонегативных стафилококков (КНС), выделенных с объектов окружающей среды клинических стационаров, на способность к продукции антибактериальных соединений. Показано, что штаммы КНС с выраженной антагонистической активностью выявляются с частотой около 1.4%. Антибактериальная активность отдельных штаммов КНС обусловлена выделением в окружающую среду низкомолекулярных пептидных соединений. Молекулярная масса трех выделенных пептидов составляла 2985, 2998 и 3004 Да. Выделяемый бактериями *Staphylococcus hominis* пептид содержит в своем составе необычную аминокислоту метиллантионин и может быть отнесен к бактериоцинам класса I — лантибиотикам. Антибактериальная активность выделенных пептидов проявляется в отношении грамположительных бактерий различных родов, филогенетически не родственных продуцентам.

Ключевые слова: антибактериальная активность, пептидные бактериоцины, коагулазонегативные стафилококки, лантибиотики, нозокомиальные стафилококки

DOI: 10.31857/S0026365624060109

В настоящее время во всем мире наблюдается повышенный интерес исследователей к бактериям-оппортунистам, которые являются нормальными обитателями тела здорового человека. Это вызвано не только стабильно высокой их ролью в развитии некоторых инфекционных процессов (Patil et al., 2024), но и необходимостью в понимании значения бактерий-симбионтов кожи в поддержании ее гомеостаза. Таковыми являются и коагулазонегативные стафилококки (КНС), которые доминируют среди микрофлоры госпитальных пространств, обладают повышенной антибиотикоустойчивостью и часто являются причиной нозокомиальных инфекций, возникающих у людей во время или после пребывания в стационаре (Pinheiro-Hubinger et al., 2021). Все чаще комменсальные стафилококки признаются полезными для здоровья кожи. Например, показано, что они модулируют иммунную защиту слизистых оболочек и могут напрямую воздействовать на патогенную микрофлору, т.е. выполняют пробиотические функции (Severn

et al., 2022). Будучи постоянными спутниками человека, КНС мигрируют вместе со своим хозяином, оставляющим “микробный след” в местах своего пребывания. Наибольшее разнообразие и постоянное присутствие стафилококков регистрируется в лечебных учреждениях, где нозокомиальные штаммы КНС проходят жесткий отбор под давлением антибиотиков и антисептиков. Существуют также и другие селективные факторы, способствующие успешному внутрибольничному и межбольничному распространению бактерий, — например, факторы адгезии и формирования биопленок, обуславливающие колонизацию биоматериалов, имплантов, катетеров и прочих абиотических поверхностей (Wojtyczka et al., 2014).

Одним из свойств, способствующих колонизации различных экологических ниш, является проявление антагонистической активности бактерий, обусловленной выделением в окружающую среду соединений, ингибирующих рост ближайшего микробного окружения. Коагулазонегативные стафилококки

с выраженной антагонистической активностью по отношению к бактериям-конкурентам обнаружены среди изолятов, выделенных от диких и домашних животных (Nascimento et al., 2005; Braem et al., 2014), из различных очагов инфекций человека (Kassem et al., 2021), а также из пищевых продуктов (Fernandez-Fernandez et al., 2022). Однако степень антагонистической активности стафилококков, заселяющих госпитальные пространства, до сих пор не проанализирована. Развитие в полимикробной среде бактерий с высокой антагонистической активностью может способствовать их распространению и доминированию за счет эффективного подавления ближайшего конкурентного окружения. Одним из инструментов этого процесса может являться секрета в окружающую среду низкомолекулярных катионных пептидов, обладающих, как правило, широким спектром ингибирующего действия (Bastos et al., 2009).

В настоящее время представляется, что бактериоциногенность у КНС является широко распространенным явлением. Бактериоцины стафилококков — это, в основном, пептиды, синтезируемые на рибосомах и обладающие высокой антимикробной активностью (Bastos et al., 2020). Экологический смысл феномена продукции факторов антагонизма может заключаться в преимуществе продуцента при заселении привлекательных ниш, поэтому они наиболее активны в отношении близкородственных продуцентов бактерий со схожими экологическими потребностями (Heilbronner et al., 2021).

Целью настоящей работы явилось изучение распространенности продукции низкомолекулярных антибактериальных соединений пептидной природы среди КНС, выделенных из госпитальных пространств.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

За период с 2007 по 2020 годы было исследовано 11350 штаммов КНС, выделенных из смывов с поверхностей различных абиотических объектов медицинских стационаров г. Перми с использованием селективной питательной среды на основе маннит-солевого агара (Charman medium, European pharm., USP) с добавлением желточной эмульсии. Идентификацию КНС с высокой антагонистической активностью проводили с помощью набора STAPHYtest 24 (“Lachema”, Чехия), а также с определением коагулазы (DrySpotTM Staphytest plus, “Thermo Fisher Scientific”, США) и чувствительности к новобиоцину (диски, “Erba Lachema”, Чехия).

В качестве тест-бактерий были использованы высокочувствительные к антибактериальным

соединениям бактерии *Staphylococcus cohnii* ВКМ 3165. Спектр антибактериальной активности (АБА) выделенных пептидов изучали на бактериях *Arthrobacter globiformis* ВКМ 193, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Corynebacterium ammoniagenes* ИЭГМ 1862, *Enterococcus faecalis* NCMB 13280, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Lactococcus lactis* NCDO 763, *Micrococcus luteus* ИЭГМ 391, *Micrococcus roseus* ВТ 394, *Mycobacterium smegmatis* mc2 155, *Pseudomonas fluorescens* ATCC 948, *Rhodococcus erythropolis* ИЭГМ 268, *Rhodococcus ruber* ИЭГМ 70, *Staphylococcus aureus* 209P, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Streptococcus pyogenes* NCIMB 1475. Бактерии выращивали до логарифмической фазы роста на жидкой среде Luria Broth (Atlas, 2000). Готовили суспензию, содержащую 10^6 КОЕ/мл, которую использовали для оценки чувствительности бактерий к антибактериальным пептидам.

Поиск продуцентов антибактериальных соединений среди изолятов КНС проводили при их выращивании в разработанной ранее богатой питательной среде, содержащей (г/л): $K_2HPO_4 \times 3H_2O$ — 7, $MgSO_4 \times 7H_2O$ — 0.1, $(NH_4)_2SO_4$ — 2, цитрат Na — 0.5, казеиновые кислоты (“Difco”, США) — 10, дрожжевой экстракт (“Difco”, США) — 5 (Патент РФ. 2006. № 2274654). Культивирование проводилось при 37°C с аэрацией на орбитальном шейкере (160 об./мин) в течение 10–15 ч. Затем клетки осаждали, надосадочную жидкость стерилизовали фильтрованием (Millex-GV Filter, 0.22 мкм; “Merck”, Германия). Ультрафильтрацию культуральных жидкостей проводили с использованием центрифужных концентраторов с порогом отсека 10 кДа (“Amicon”, “Merck”, США).

Антибактериальную активность (АБА) в фильтрах сред роста определили методом диффузии в агарозу. С этой целью стерильную питательную среду Muller Hinton (МН) (“HiMedia”, Индия) с 0.8% агарозы (“Lachema”, Чехия), охлаждали до 42°C и инокулировали суспензией тест-бактерий *S. cohnii* ВКМ 3165 до конечного количества 10^6 КОЕ/мл, распределяли ровным слоем в 3 мм (15 мл инокулированной агарозной среды МН в чашке Петри диаметром 80 мм). На поверхность застывшей агарозной среды наносили по 5 мкл исследуемых фильтратов культуральных жидкостей КНС. Капли высушивали в асептических условиях. Чашки Петри инкубировали при 37°C в течение 16–18 ч. Наличие АБА определяли по формированию зон подавления роста газона индикаторной культуры.

Количественный анализ АБА в культуральных жидкостях КНС и растворах выделенных пептидов проводили с помощью метода двукратных серийных разведений с использованием жидкой среды МН. За условную единицу активности (ЕА) культуральных жидкостей принимали обратную

величину максимального разведения. Также рассчитывали минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) пептидов, при которой наблюдалось полное ингибирование роста тест-бактерий (ГОСТ Р ИСО 20776-1-2010).

Природу АБА устанавливали с помощью обработки ультрафильтратов культуральных жидкостей различными гидролазами (Коробов и соавт., 2010). Кратко, к ультрафильтратам, обладающим АБА, добавляли равный объем буферного раствора (0.1 М Трис-НСl; pH 7.4) и 35 Е/мл трипсина ("Serva", Германия) или 3 Е/мл протеиназы К ("Sigma", США). Для обработки ДНК-азой ("Sigma", США) к ультрафильтратам добавляли равный объем 0.2М Na-ацетатный буфера с pH 5.0 и фермент в количестве 36 Е/мл. Для обработки РНК-азой ("Reanal", Венгрия) добавляли равный объем 0.2М Трис-НСl буфера с pH 7.2 и фермент в количестве 20 Е/мл. Ультрафильтраты с ферментами инкубировали в течение 2 ч при 37°C, после чего определяли их антибактериальную активность методом двукратных разведений. Контрольные пробы инкубировали в соответствующих буферных растворах в тех же условиях.

Выделение антибактериальных соединений из культуральных жидкостей КНС проводили ионообменной хроматографией на колонке EC (25×500 мм, "BioRad", США) со смолой Тоуорепarl-SP 650М ("Toso", Япония), которую уравнивали 10 мМ Na-фосфатным буфером (Полюдова и соавт., 2017). Для антибактериальных пептидов *Staphylococcus hominis* значение pH буфера соответствовало 6.8, для пептидов *S. haemolyticus* и *S. warneri* — 7.2. Антибактериальные соединения элюировали линейным градиентом NaCl (0–0.5 М) в соответствующем фосфатном буфере. Фракции элюата с АБА объединяли и диализовали на мембранах "Spectrum Laboratories, Inc." (США). Обессоленные растворы пептидов высушивали на концентраторе Univapo 100 Н ("UniEquip", Германия).

Очистку пептидов до гомогенного состояния проводили с помощью ВЭЖХ в обращенной фазе (АСТА purifier 10, Великобритания) с использованием колонки с диоксидом кремния в качестве неподвижной фазы и углеродными лигандами C2/C18 ("Amersham Bioscience", США). Последовательные этапы проводили с использованием различных видов градиента ацетонитрила (Коробов и соавт., 2010).

Масс-спектрометрический анализ пептидов, выделенных из культуральных жидкостей КНС, проводили на приборе Voyager-DE STR Biospectrometry Workstation ("PerSeptive Biosystems", США). Аминокислотный состав пептида, выделенного из среды роста *S. hominis* определяли после его гидролиза в 6 М HCl в запаянных ампулах в атмосфере азота при 60°C. Затем гидролизат обрабатывали фенилизотиоцианатом, а производные

аминокислот разделяли обращенно-фазовым методом на колонке C18 с использованием Amino Acid Analyser 420A ("Applied Biosystems", США) в автоматическом режиме.

Все результаты, полученные не менее чем в трех независимых экспериментах и не менее чем в 3 повторностях, обрабатывали с помощью программы MS Excel 2007. В таблицах и на рисунках приведены средние значения с указанием доверительных интервалов ($\alpha = 0.05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ

При выращивании бактерии на селективной питательной среде маннит-солевом агаре с желточной эмульсией отбирали колонии, не обладающие лецитиназной активностью, характерной для бактерий *S. aureus* (Дерябин, 2000). Отсутствие коагулазы подтверждали с помощью слайд-коагулазного теста для дифференциации коагулазо-положительных и коагулазонегативных стафилококков. В исследовании использовали только коагулазонегативные бактерии. За период проведения скрининга на способность к продукции антибактериальных соединений было исследовано 11350 изолятов КНС. Антагонистическая активность по отношению к тест-бактериям *S. cohnii* ВКМ-3165 была выявлена в культуральной жидкости 161 штамма КНС методом диффузии в агарозу (рис. 1). Через 10–15 ч роста

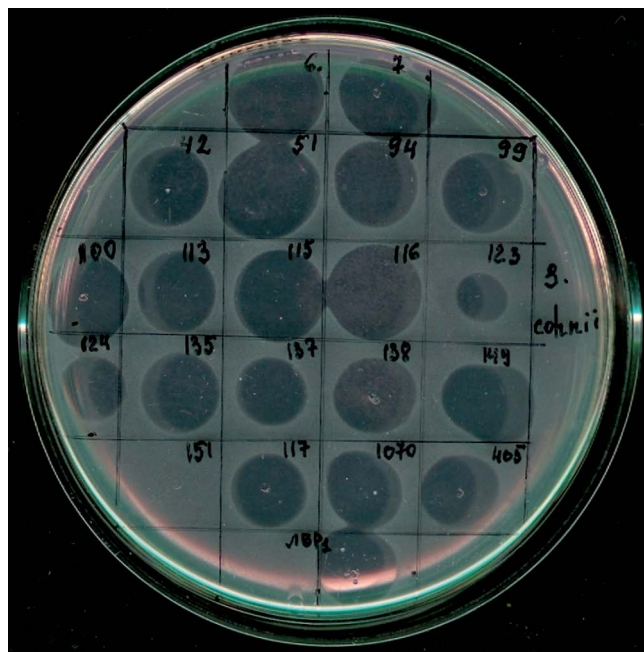


Рис. 1. Выявление АБА в бесклеточных культуральных жидкостях КНС методом диффузии в агарозу с использованием тест бактерий *S. cohnii* ВКМ-3165.

КНС на обогащенной питательной среде (Патент РФ № 2274654, 2006.) рН среды культивирования составлял 6.0 ± 0.5 . Данный уровень кислотности не оказывает ингибирующего действия на рост стафилококков в целом (Дерябин, 2000) и *S. cohnii* ВКМ-3165 в частности.

При регулярном скрининге ежегодно выявлялось от 0.27 до 3.0% штаммов бактерий, обладающих антагонистической активностью (табл. 1). Среди госпитальных штаммов КНС в среднем $1.42 \pm 0.118\%$ изолятов обладали способностью к продукции антибактериальных соединений.

Ультрафильтрацией бесклеточных культуральных жидкостей с выраженной АБА показано, что антибактериальными свойствами обладали фильтраты, полученные порогом отсека 10 кДа. Данный факт свидетельствует о низкой молекулярной массе соединений, обуславливающих антибактериальную активность.

Протеолитическая обработка была проведена для ультрафильтратов сред культивирования КНС, АБА которых на газоне индикаторной культуры была более 10 мм и более 256 ЕА, определенных методом двукратных разведений. Так, были исследованы ультрафильтраты 30 изолятов из 161 отобранных штаммов-продуцентов. Как показали исследования, АБА полностью исчезала после воздействия трипсина и протеиназы К. Обработка ультрафильтратов ДНКазой и РНКазой не оказывала влияния на их АБА. Полученные результаты позволили заключить, что АБА обусловлена низкомолекулярными соединениями пептидной природы.

Идентификацию стафилококков проводили с помощью STAPHYtest 24 и дополнительных тестов на коагулазу и чувствительность к ново-биоцину. Среди 30 продуцентов с АБА культуральных жидкостей более 256 ЕА было выявлено 12 штаммов вида *S. warneri*, 11 штаммов — *S. cohnii*, 5 штаммов — *S. haemolyticus* и по 1 штамму видов *S. epidermidis* и *S. hominis*. Бактерии вида *S. hominis* были депонированы в коллекцию Государственного института стандартизации качества (ГИСК) под номером 284, а пептид, продуцируемый этими бактериями, получил название хоминин (Патент РФ № 2528055).

Для проведения дальнейших исследований было выбрано 3 штамма бактерий с высоким уровнем устойчивой продукции антибактериальных соединений — *S. haemolyticus* 117, *S. hominis* 405 (ГИСК-284) и *S. warneri* 1535. Динамика периодического роста и продукции антибактериальных соединений были схожи в культурах всех трех штаммов КНС. Однако максимальный уровень АБА в среде роста существенно различался (рис. 2). Следует отметить, что на поздних стадиях роста наблюдалось снижение АБА в культуральных жидкостях, вероятно, связанное с действием протеолитических ферментов, высвобождающихся из отмирающих клеток.

Антибактериальные пептидные соединения бактерий *S. haemolyticus* 117, *S. hominis* ГИСК-284 и *S. warneri* 1535 были получены в очищенном виде методами ионообменной и высокоэффективной обратной фазовой хроматографий. Масс-спектрометрические характеристики полученных антибактериальных соединений свидетельствуют о том, что пептид бактерий

Таблица 1. Количество штаммов КНС, обладающих антагонистической активностью по отношению к тест-бактериям *S. cohnii* ВКМ-3165

Год	Общее количество исследованных штаммов КНС	Количество штаммов-антагонистов	% штаммов-антагонистов
2007	664	14	2.11
2008	1095	14	1.27
2009	573	5	0.87
2010	446	8	1.79
2011	1001	6	0.59
2012	1847	5	0.27
2013	842	15	1.78
2014	1430	18	1.25
2015	1632	47	2.87
2016	875	9	1.03
2017	327	10	3.05
2018	292	3	1.02
2019	207	4	1.93
2020	119	3	2.52
Итого	11350	161	1.42

S. haemolyticus 117 обладал молекулярной массой 3004 Да, пептид *S. hominis* ГИСК-284 – 2985 Да, а пептид *S. warneri* 1535 – 2844 Да (рис. 3).

Согласно имеющимся в литературе данным, значительная доля известных бактериоцинов стафилококков относится к группе лантибиотиков

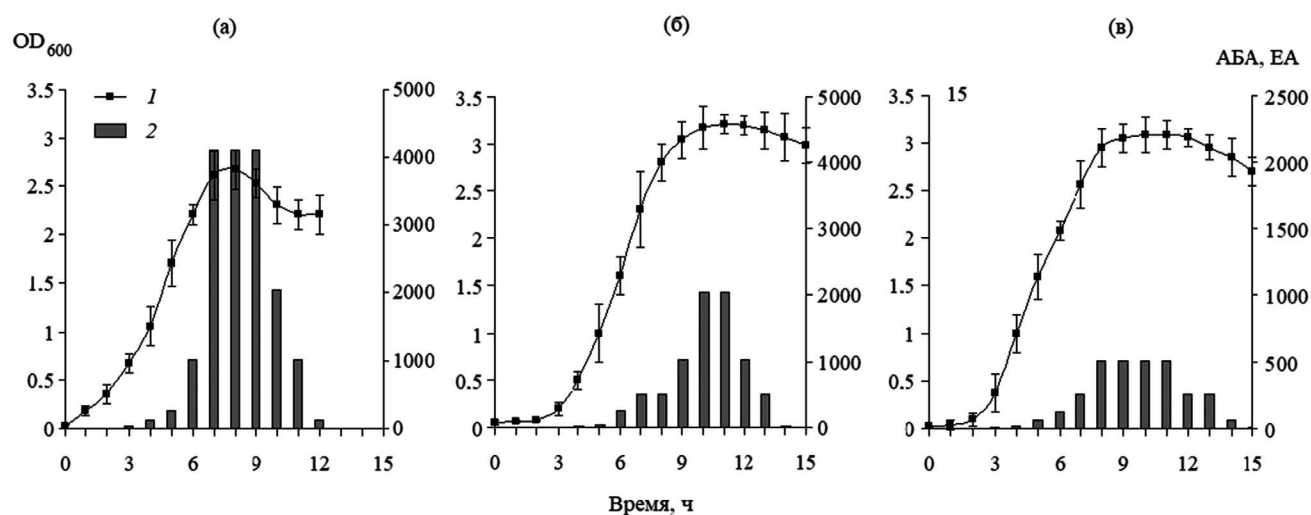


Рис. 2. Кривые роста (1) и антибактериальные активности культуральных жидкостей (2) *S. haemolyticus* 117 (а), *S. hominis* ГИСК-284 (б) и *S. warneri* 1535 (в).

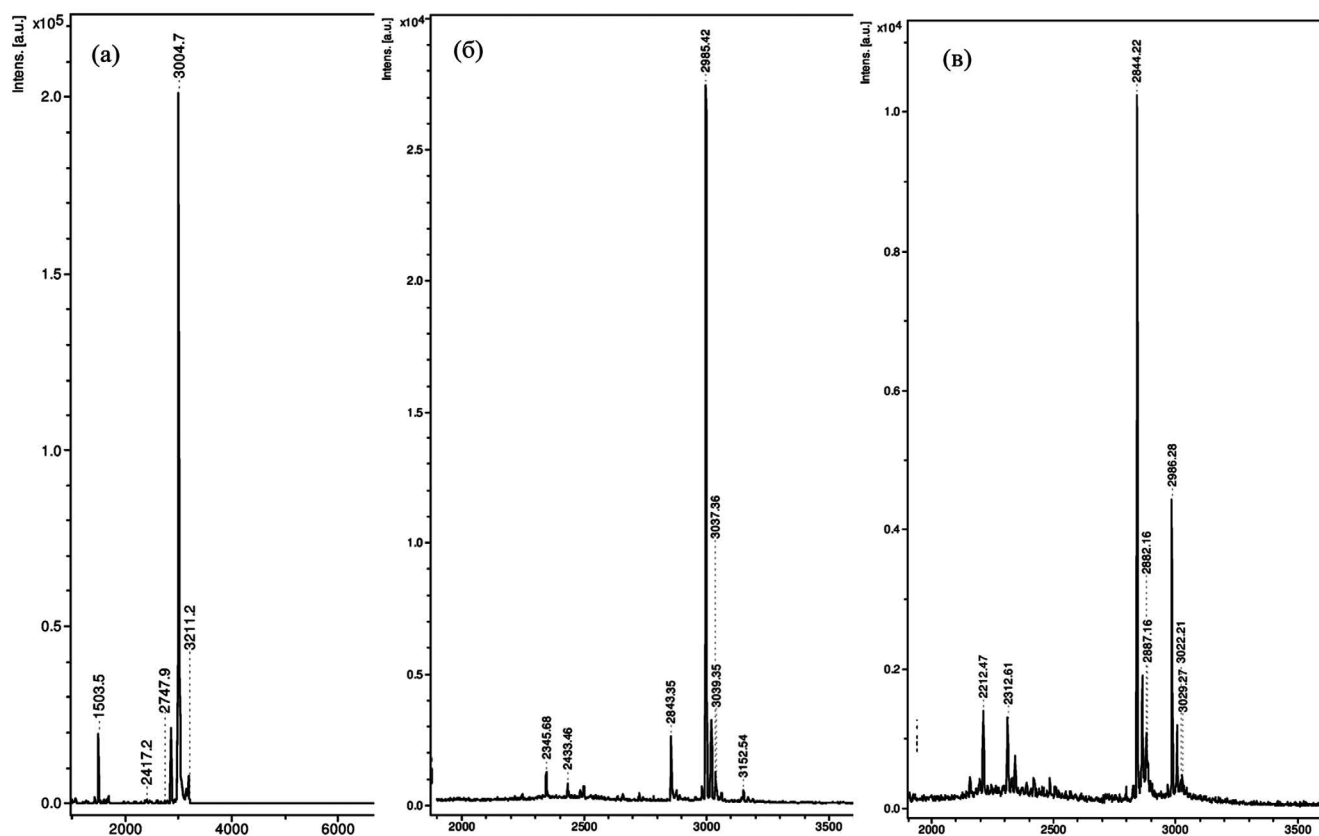


Рис. 3. Масс-спектры очищенных пептидов из культуральных жидкостей *S. haemolyticus* 117 (а), *S. hominis* ГИСК 284 (б) и *S. warneri* 1535 (в).

(варнерин, галлидермин, нукацин, эпидермин, эпиланцин, эпицидин, стафилококцин BacR1, Pep5) (Bierbaum et al., 1996; Коробов и соавт., 2010). Это пептиды, имеющие в своей структуре пост-трансляционно модифицированные аминокислоты, такие как дигидробутирин, дигидроаланин, лантионин или метиллантионин (Пипия и соавт., 2020). Реже встречаются бактериоцины класса II (ауреоцины A70 и 53) (Bastos et al., 2009). Анализ состава аминокислот в пептиде, продуцируемом *S. hominis* ГИСК 284, показал высокое содержание в нем остатков катионных аминокислот (аргинин,

лизин, гистидин) (табл. 2). Кроме того, обнаружен остаток посттрансляционно модифицированных аминокислот треонина и серина — метиллантионин, что позволяет отнести выделенный пептид к бактериоцинам класса I — лантибиотикам.

Практически все известные к настоящему времени бактериоцины КНС обладают широким спектром антимикробной активности, не только в отношении бактерий рода *Staphylococcus*, но и других условно патогенных и патогенных грамположительных бактерий, в том числе и антибиотикорезистентных форм (Cotter et al., 2013).

Таблица 2. Аминокислотный состав хоминина, продуцируемого бактериями *S. hominis* ГИСК 284

Аминокислота	Содержание (%)	Аминокислота	Содержание (%)
Аланин	6.2 ± 0.43	Лизин	35.1 ± 3.12
Аргинин	11.5 ± 1.08	Метионин	0.6 ± 0.28
Аспарагин	3.0 ± 0.24	Фенилаланин	0.8 ± 0.26
Цистеин	6.8 ± 0.74	Пролин	3.1 ± 0.39
Глицин	9.4 ± 0.78	Серин	3.3 ± 0.28
Гистидин	4.5 ± 0.61	Треонин	1.8 ± 0.55
Изолейцин	3.7 ± 0.19	Тирозин	0.8 ± 0.31
Метиллантионин	2.3 ± 0.34	Валин	3.2 ± 0.25
Лейцин	4.7 ± 0.23		

Таблица 3. Минимальные ингибирующие концентрации (МИК) антибактериальных пептидов, выделенных из сред роста *S. hominis* ГИСК-284 (хоминин), *S. haemolyticus* 117 (пептид 117) и *S. warneri* 1535 (пептид 1535)

Штамм	МИК, мкг/мл		
	Хоминин	Пептид 117	Пептид 1535
<i>A. globiformis</i> ВКМ 193	1.0	8	256
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	16	32	16
<i>C. ammoniagenes</i> ИЭГМ 1862	1.0	256	0.5
<i>E. faecalis</i> NCMB 13280	1.0	—	8
<i>E. coli</i> ATCC 25922	—	—	—
<i>L. lactis</i> NCDO 763	32	4	4
<i>M. luteus</i> ИЭГМ 391	16	0.5	0.5
<i>M. roseus</i> ВТ 394	2.0	0.5	0.25
<i>M. smegmatis</i> mc ² 155	2.0	0.5	1.0
<i>P. fluorescens</i> ATCC 948	—	—	—
<i>R. erythropolis</i> ИЭГМ АС 268	16.0	16.0	8.0
<i>R. ruber</i> ИЭГМ 70	32.0	16.0	16.0
<i>S. cohnii</i> ВКМ 3165	0.5	0.25	0.25
<i>S. aureus</i> 209 Р	16.0	64.0	64.0
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	32.0	64.0	0.25
<i>S. pyogenes</i> NCIMB 1475	1.0	—	—

Примечание. “—” — Бактерии не чувствительны к антибактериальному действию.

Исследование АБА выделенных пептидов на различных тест-бактериях показало, что все они проявляли активность лишь в отношении грамположительных бактерий. Грамотрицательные бактерии *E. coli* ATCC 25922 и *P. fluorescens* ATCC 948 были резистентны к действию выделенных пептидов (табл. 3).

Анализ полученных в настоящей работе и имеющихся в литературе данных позволяет рассматривать выделенные бактериоцины в качестве новых представителей антибактериальных низкомолекулярных пептидов, синтезируемых КНС.

ОБСУЖДЕНИЕ

Среди стафилококков, выделенных с абиотических поверхностей объектов окружающей среды, способность к продукции подобных бактериоцинам субстанций встречается не чаще, чем в 1.5% случаев, как было показано ранее (Fernandez-Fernandez et al., 2022) и в настоящем исследовании. Стафилококки, выделенные от носителей, значительно чаще проявляют антагонистическую активность. Так, среди изолятов от диких животных выявляется до 6.2% штаммов-антагонистов (Fernández-Fernández et al., 2022). От домашних животных, по разным данным, выделяется от 6.5 до 30% бактериоцин-синтезирующих стафилококков (Braem et al., 2014; Rahmdel et al., 2019; Fernández-Fernández et al., 2022). Среди изолятов, полученных с разных участков тела здоровых людей, 3.7% являются бактериоциногенными (Fernandez-Fernandez et al., 2022). Стафилококки, выделенные из крови и кожных ран человека, являются продуцентами бактериоцинов в 20% случаев (Kassem et al., 2021). Антибиотики и другие пептидные бактериоцины, выделяемые КНС, обитающими на теле хозяина, действуют как противомикробные агенты и могут способствовать нормальной защите от нежелательной микрофлоры на границе эпидермиса (Gallo, Nakatsuji. 2011). Несмотря на то, что антимикробная активность является общей чертой бактериоцинов, эти вещества могут также играть и другие роли, проявляя многофункциональность. Например, выполнять регуляторные функции, способствующие бактериям заселять экологические ниши (Bastos et al., 2020). Понимание роли бактерий-симбионтов кожи в поддержании ее гомеостаза, является областью, требующей детального изучения, включая исследование метаболитов и продуктов ферментации основных представителей симбиотической микрофлоры.

Среди бактерий видов *S. hominis*, *S. haemolyticus* и *S. warneri* известны продуценты подобных соединений. Так, хомининин, синтезируемый бактериями штамма *S. hominis* MBBL2-9, является термостабильным пептидом с молекулярной массой 2038.4

Да и обладает выраженной антибактериальной активностью в отношении близкородственных продуцентов бактерий, в том числе и их антибиотикорезистентных форм (Kim et al., 2010). В литературе приводятся сведения относительно низкомолекулярного антибактериального катионного пептида нукацина, синтезируемого бактериями *S. hominis* KQU-131, имеющего молекулярную массу 3003.97 Да и содержащего в составе молекулы катионные и гидрофобные аминокислотные остатки, а также лантионин. Нукацин KQU-131 активен в отношении некоторых грамположительных бактерий (Wilaipun et al., 2008). Представленный в настоящей работе пептид хоминин является катионным соединением с молекулярной массой 2985 Да, имеющим в составе молекулы значительную долю катионных аминокислот (51.1%) (табл. 2), определяющих выраженный положительный заряд молекулы. Большинство известных лантибиотиков являются катионными пептидами и имеют положительный заряд от +2 до +9. Важность суммарного положительного заряда антибактериальных пептидов заключается во взаимодействии, связывании и дестабилизации мембран бактерий-мишеней (Suda et al., 2010). Согласно данным масс-спектропии, хоминин является новым представителем семейства лантибиотиков, близким по молекулярной массе к пептиду эрицину А (Bierbaum, Sahl. 2009). Однако эрицин А, в отличие от хоминина, продуцируют бактерии *Bacillus subtilis* A1/3. В составе молекулы эрицина обнаружено 5 остатков лантионина, а спектр его антибактериальной активности существенно уже, чем у хоминина (Stein et al., 2002). Среди бактерий *S. haemolyticus* недавно обнаружен продуцент нового бактериоцина, получившего название ромсацин, который представляет собой дипептидный лантибиотик с молекулярными массами пептидов 3149.97 и 3548.16 Да. Ромсацин обладает широким спектром АБА в отношении грамположительных бактерий (Wolden et al., 2023). Широко известны продуценты лантибиотиков и среди бактерий вида *S. warneri*. Антибиотик варнеринин RB4 обнаружен у бактерий *S. warneri* RB4 (Minamikawa et al., 2005), а нукацин ISK является продуктом синтеза *S. warneri* ISK-1 (Sashihara et al., 2000). Варнерин, также являющийся лантибиотиком, выделен из сред роста *S. warneri* DSMZ 16081 (Petersen et al., 2009; Коробов и соавт., 2010). Пептидные продукты метаболизма бактерий *S. warneri* TRPF4 проявляли выраженную антибактериальную активность против *Legionella pneumophila* (Freitas et al., 2020). Анализ литературы показал, что практически все бактериоцин-подобные соединения КНС являются представителями бактериоцинов класса I.

Таким образом, проведенные исследования позволили оценить частоту распространения среди КНС штаммов с выраженной антагонистической

активностью, обусловленной продукцией бактериоцинподобных субстанций. Анализ накопленного материала указывает на то, что феномен распространённости продукции антибактериальных пептидов среди изученных клинических штаммов КНС, выделенных с абиотических поверхностей, составляет не более 1.5%. Стафилококки способны к адаптации и длительной персистенции в широком диапазоне сред даже в условиях, ограничивающих их рост (Onyango, Alreshidi, 2018). Тем не менее типичной средой обитания этих бактерий являются кожные покровы теплокровных животных и человека (Joglekar et al., 2023). Полученные данные и анализ научной литературы свидетельствуют о том, что продукция бактериоцинов стафилококками, выделенными из ниш, не характерных для экологии этих бактерий, является редко наблюдаемым явлением.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП “Исследования материалов и вещества” ПФИЦ УрО РАН.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации: государственное задание “Биоразнообразие микроорганизмов антропогенно загрязнённых экосистем и функционально-генетические механизмы их адаптации к стрессовым условиям окружающей среды”, регистрационный номер 124020500028-4.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Дерябин Д.Г. Стафилококки: экология и патогенность. Екатеринбург: УрО РАН, 2000. 240 с.
- Коробов В.П., Лемкина Л.М., Полюдова Т.В., Акименко В.К. Выделение и характеристика нового низкомолекулярного антибактериального пептида семейства лантибиотиков // Микробиология. 2010. Т. 79. С. 228–238.
- Korobov V.P., Lemkina L.M., Polyudova T.V., Akimenko V.K. Isolation and characterization of new low-molecular antibacterial peptide of the lantibiotics family // Microbiology (Moscow). 2010. V. 79. P. 206–215.
- Пипия С.О., Терехов С.С., Мокрушина Ю.А., Кнорре В.Д., Смирнов И.В., Габиров А.Г. Использование расширенного химического пространства лантибиотиков для создания искусственного биоразнообразия генетически кодируемых антибиотиков // Биохимия. 2020. Т. 85. С. 1550–1568.
- Pipiya S.O., Terekhov S.S., Mokrushina Y.A., Knorre V.D., Smirnov I.V., Gabibov A.G. Engineering artificial biodiversity of lantibiotics to expand chemical space of DNA-encoded antibiotics // Biochemistry (Moscow). 2020. V. 85. P. 1319–1334.
- Патент РФ. 2006. № 2274654.
- Полюдова Т.В., Лемкина Л.М., Лихацкая Г.Н., Коробов В.П. Оптимизация условий получения и моделирование 3D-структуры нового антибактериального пептида семейства лантибиотиков // Прикл. биохимия и микробиология. 2017. Т. 53. С. 47–54.
- Polyudova T.V., Lemkina L.M., Korobov V.P., Likhat-skaya G.N. Optimization of production conditions and 3D-structure of novel antibacterial peptide of lantibiotic family // Appl. Biochem. Microbiol. 2017. V. 53. P. 40–46.
- Патент РФ. 2014. № 2528055.
- Atlas R.M. Handbook of Microbiological Media. CRC Press, 1993. 1079 p.
- Bastos M., Ceotto H., Coelho M.L.V., Nascimento J.S. Staphylococcal antimicrobial peptides: relevant properties and potential biotechnological applications // Curr. Pharm. Biotechnol. 2009. V. 10. P. 38–61.
- Bastos M., de Farias M., Fagundes C., Coelho M. Staphylococci: an update on antimicrobial peptides produced by staphylococci and their diverse potential applications // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2020. V. 104. P. 10339–10368.
- Bierbaum G., Sahl H. Lantibiotics: mode of action and bioengineering // Curr. Pharm. Biotechnol. 2009. V. 10. P. 2–18.
- Bierbaum G., Götz F., Peschel A., Kupke T., van de Kamp M., Sahl H.G. The biosynthesis of the lantibiotics epidermin, gallidermin, Pep5 and epilancin K7 // Antonie van Leeuwenhoek. 1996. V. 69. P. 119–127.
- Braem G., Stijlemans B., Van Haken W., de Vlieghe S., de Vuyst L., Leroy F. Antibacterial activities of coagulase-negative staphylococci from bovine teat apex skin and their inhibitory effect on mastitis-related pathogens // J. Appl. Microbiol. 2014. V. 116. P. 1084–1093.
- Cotter P., Ross R., Hill C. Bacteriocins – a viable alternative to antibiotics? // Nat. Rev. Microbiol. 2013. P. 95–105.
- Fernández-Fernández R., Lozano C., Eguizábal P., Ruiz-Ripa L., Martínez-Álvarez S., Abdullahi I.N., Zarazaga M.,

- Torres C. Bacteriocin-like inhibitory substances in *Staphylococci* of different origins and species with activity against relevant pathogens // *Front. Microbiol.* 2022. V. 13. Art. 870510.
- Freitas F.S., Vidigal P.M.P., Siqueira T.P., de Barros M., Totola M.R. The draft genome of *Staphylococcus warneri* TRPF4, a bacteriocin producer with potent activity against the causative agent of Legionnaires' Disease // *3 Biotech.* 2020. V. 10. Art. 232.
- Gallo R.L., Nakatsuji T. Microbial symbiosis with the innate immune defense system of the skin // *J. Invest Dermatol.* 2011. V. 131. P. 1974–1980.
- Heilbronner S., Krismer B., Brötz-Oesterhelt H., Peschel A. The microbiome-shaping roles of bacteriocins // *Nat. Rev. Microbiol.* 2021. V. 19. P. 726–739.
- Joglekar P., Conlan S., Lee-Lin S.Q., Deming C., Kashaf S.S., Kong H.H., Segre J.A. Integrated genomic and functional analyses of human skin-associated *Staphylococcus* reveal extensive inter- and intra-species diversity // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2023. V. 120. Art. e2310585120.
- Kassem M., Saafan A., Bayomy F., El-Gendy A. Exploring clinically isolated *Staphylococcus* sp. bacteriocins revealed the production of amonabactin, micrococcin, and α -circulocin // *Iranian J. Microbiol.* 2021. V. 13. P. 212–224.
- Kim P., Sohng J., Sung C., Joo H., Kim E., Yamaguchi T., Park D., Kim B. Characterization and structure identification of an antimicrobial peptide, hominisin, produced by *Staphylococcus hominis* MBBL 2–9 // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2010. V. 399. P. 133–138.
- Minamikawa M., Kawai Y., Inoue N., Yamazaki K. Purification and characterization of Warnericin RB4, anti-*Al-icyclobacillus* bacteriocin, produced by *Staphylococcus warneri* RB4 // *Curr. Microbiol.* 2005. V. 51. P. 22–26.
- Nascimento J., Fagundes P., Brito M., Santos K., Bastos M. Production of bacteriocins by coagulase-negative staphylococci involved in bovine mastitis // *Veter. Microbiol.* 2005. V. 106. P. 61–71.
- Onyango L.A., Alreshidi M.M. Adaptive metabolism in staphylococci: survival and persistence in environmental and clinical settings // *J. Pathog.* 2018. V. 2018. Art. 1092632.
- Patil G., Agarwala P., Das P., Pathak S. Rise in the pathogenic status of coagulase-negative staphylococci causing bloodstream infection // *Cureus.* 2024. V. 16. Art. e57250.
- Petersen J., Boysen A., Fogh L., Tabermann K., Kofoed T., King A., Schrotz-King P., Hansen M.C. Identification and characterization of a bioactive lantibiotic produced by *Staphylococcus warneri* // *Biol. Chem.* 2009. V. 390. P. 437–444.
- Pinheiro-Hubinger L., Moraes Riboli D., Abraao L., Pereira Franchi E., Ribeiro de Souza da Cunha M. Coagulase-negative staphylococci clones are widely distributed in the hospital and community // *Pathogens.* 2021. V. 10. Art. 792.
- Rahmdel S., Shekarforoush S., Hosseinzadeh S., Torriani S., Gatto V. Antimicrobial spectrum activity of bacteriocinogenic *Staphylococcus* strains isolated from goat and sheep milk // *J. Dairy Sci.* 2019. V. 102. P. 2928–2940.
- Sashihara T., Kimura H., Higuchi T., Adachi A., Matsusaki H., Sonomoto K., Ishizaki A. A novel lantibiotic, nukacin ISK-1, of *Staphylococcus warneri* ISK-1: cloning of the structural gene and identification of the structure // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2000. V. 64. P. 2420–2428.
- Severn M., Williams M., Shahbandi A., Bunch Z., Lyon L., Nguyen A., Zaramela L., Todd D., Zengler K., Cech N., Gallo R., Horswill A. The ubiquitous human skin commensal *Staphylococcus hominis* protects against opportunistic pathogens // *mBio.* 2022. V. 13. P. 930–952.
- Stein T., Borchert S., Conrad B., Feesche J., Hofemeister B., Hofemeister J., Entian K. Two different lantibiotic-like peptides originate from the ericin gene cluster of *Bacillus subtilis* A1/3 // *J. Bacteriol.* 2002. V. 184. P. 1703–1711.
- Suda S., Hill C., Cotter P.D., Ross R.P. Investigating the importance of charged residues in lantibiotics // *Bioeng. Bugs.* 2010. V. 1. P. 345–351.
- Wilaipun P., Zendo T., Okuda K., Nakayama J., Sonomoto K. Identification of the nukacin KQU-131, a new type-A(II) lantibiotic produced by *Staphylococcus hominis* KQU-131 isolated from Thai fermented fish product (Pla-ra) // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2008. V. 72. P. 2232–2235.
- Wojtyczka R., Orlewska K., Kępa M., Idzik D., Dziedzic A., Mularz T., Krawczyk M., Mikłasińska M., Wąsik T. Biofilm formation and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus epidermidis* strains from a hospital environment // *Int. J. Environ. Res. Publ. Health.* 2014. V. 11. P. 4619–4633.
- Wolden R., Ovchinnikov K.V., Venter H.J., Oftedal T.F., Diep D.B., Cavanagh J.P. The novel bacteriocin romsacin from *Staphylococcus haemolyticus* inhibits Gram-positive WHO priority pathogens // *Microbiol. Spectrum.* 2023. V. 11. P. 869–892.

Prevalence of the Phenomenon of Production of Peptide Factors of Antagonism Among Coagulase-Negative Staphylococci

T. V. Polyudova^{1, 2, *}, L. M. Lemkina¹, M. V. Antipyeva^{1, 2}, A. L. Yesaev¹, V. P. Korobov¹

¹*Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, 614581, Russia*

²*Perm State Agrarian and Technological University, Perm, 614990, Russia*

**e-mail: polyudova@iegm.ru*

Coagulase-negative staphylococci (CNS) isolated from clinical hospital environmental objects were screened for their ability to produce antibacterial compounds. It was shown that CNS strains with pronounced antagonistic activity were detected with a frequency of about 1.4%. The antibacterial activity of individual CNS strains was due to the release of low-molecular peptide compounds into the environment. The molecular weight of three isolated peptides was 2985, 2998, and 3004 Da. The peptide secreted by *Staphylococcus hominis* bacteria contains an unusual amino acid, methyllanthionine, and can be classified as a class I bacteriocin, a lantibiotic. The antibacterial activity of the isolated peptides was demonstrated against gram-positive bacteria of various genera that are phylogenetically unrelated to the producers.

Keywords: antibacterial activity, peptide bacteriocins, coagulase-negative staphylococci, lantibiotics, nosocomial staphylococci

УДК 577.114.083+579.252

СТРУКТУРНОЕ И ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РОДСТВО О-АНТИГЕНОВ ТИПОВЫХ ШТАММОВ *AZOSPIRILLUM AGRICOLA* CC-HIH038 И *AZOSPIRILLUM DOEBEREINERAE* GSF71

© 2024 г. Е. Н. Сигида^{a, *}, В. С. Гринев^{a, b}, М. С. Кокоулин^c,
С. А. Коннова^{a, b}, Ю. П. Федоненко^a

^aИнститут биохимии и физиологии растений и микроорганизмов, ФИЦ СНЦ РАН, 410049, Саратов, Россия

^bСаратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского,
410012, Саратов, Россия

^cТихоокеанский институт биоорганической химии имени Г.Б. Елякова ДВО РАН, 690022, Владивосток, Россия
*e-mail: sigida_e@ibppm.ru

Поступила в редакцию 06.06.2024 г.

После доработки 19.06.2024 г.

Принята к публикации 24.06.2024 г.

Из клеток типового штамма ризобактерий *Azospirillum agricola* CC-HIH038^T фенольной экстракцией выделен липополисахарид. Мягким кислотным гидролизом липополисахарида с последующим хроматографическим фракционированием получен О-специфический полисахарид. По данным моносхаридного анализа, включающего определение абсолютных конфигураций, одномерной и двумерной ¹H и ¹³C ЯМР спектроскопии установлена структура повторяющегося звена О-специфического полисахарида *A. agricola* CC-HIH038^T: →3)-α-L-Rhap2Ac-(1→3)-α-L-Rhap-(1→3)-α-L-Rhap-(1→3)-β-D-GlcpNAc6Ac-(1→, структурно родственного *A. doebereineriae* GSF71^T. На основании анализа данных полногеномного секвенирования штаммов *A. agricola* CC-HIH038^T и *A. doebereineriae* GSF71^T выявлены локусы биосинтеза О-специфических полисахаридов, характеризующиеся схожей организацией и высоким уровнем гомологии генов, подтверждающие общность структур О-антигенов этих штаммов.

Ключевые слова: *Azospirillum*, липополисахарид, структура О-специфического полисахарида, кластер генов биосинтеза О-антигена

DOI: 10.31857/S0026365624060116

ПРИНЯТЫЕ СОКРАЩЕНИЯ

ДПС — дезацелированный полисахарид; ЛПС — липополисахарид; ОПС — О-специфический полисахарид; Ds-Na-ПААГ электрофорез — электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия; GT — гликозилтрансфераза; ЯМР — ядерный магнитный резонанс; HSQC — протон-детектированная гетероядерная одноквантовая корреляция; ROESY — двумерная спектроскопия ядерного эффекта Оверхаузера во вращающейся системе координат; COSY — корреляционная спектроскопия; TOCSY — тотальная корреляционная спектроскопия; НМВС — гетероядерная корреляция через несколько связей; δ_C, δ_H — значения химических сдвигов атомов ¹³C и ¹H соответственно.

Азотфиксирующие свободноживущие грамотрицательные бактерии р. *Azospirillum* широко известны

как типичные представители группы бактерий, стимулирующих рост растений, в английской аббревиатуре PGPR (plant growth promoting rhizobacteria). Отсутствие строгой специфичности азоспирилл в отношении растения-хозяина, очевидно, определяется универсальностью многих бактериальных эффектов к широкому кругу потенциальных растений-партнеров. Механизм стимулирующего воздействия бактерий на растения активно исследуется, и азоспириллы являются признанными модельными объектами ассоциативных растительно-бактериальных взаимодействий (Fukami et al., 2018; Pedraza et al., 2020). Род *Azospirillum* включает 25 валидированных видов, изолированных преимущественно из сельскохозяйственных почв, ризосферы и корней растений, а также из таких разнообразных мест обитания, как загрязненные почвы, продукты ферментации, сульфидные и горячие источники, болота

и озера, карстовые пещеры и микробные топливные элементы (Nievas et al., 2023). Спектр физиологической активности азоспирилл, посредством которого они оказывают стимулирующее действие на рост и развитие растений, включает продукцию фитогормонов, фиксацию атмосферного азота, сольюбилизацию фосфатов, оптимизацию минерального питания растений, секрецию вторичных метаболитов, являющихся сигнальными молекулами, увеличивающих пролиферацию корневой системы, индуцирующих системную устойчивость растений и т.д. (Cassán et al., 2020).

С истоков изучения биохимии взаимодействия растений и свободноживущих диазотрофных бактерий многие научные изыскания были направлены на выявление молекул, выполняющих ведущую роль в выборе партнера ассоциативного симбиоза, и/или метаболитов, играющих ключевую роль на различных этапах взаимодействия. Среди основных претендентов на эту роль в большинстве исследований оказались гликополимеры поверхности бактерий (Caroff, Novikov, 2020). Для многих эффективных штаммов азоспирилл, как показали структурные исследования полисахаридов последних десятилетий (Федоненко и соавт., 2015), источником высокомолекулярных внеклеточных полисахаридов (полисахаридов капсулы и экстраклеточных полисахаридов) являются мембранные липополисахариды (ЛПС) (Konnova et al., 1994). Это стимулирует интерес к изучению структуры ЛПС и локализации генов его биосинтеза.

Липополисахариды (ЛПС) азоспирилл — основные структурные компоненты внешней мембраны грамотрицательных бактерий, покрывающие значительную часть поверхности бактериальной клетки, — вовлечены в начальные стадии формирования ассоциаций с растениями-хозяевами (Caroff, Novikov, 2020). Амфифильная молекула ЛПС гидрофобным компонентом, липидом А, встроена во внешнюю мембрану бактерий, а гидрофильным фрагментом — О-специфическим полисахаридом (ОПС), связанным с липидом А через олигосахарид кора, — экспонируется в окружающую среду. Бактериальные ОПС, в том числе ОПС азоспирилл, характеризуются высоким структурным разнообразием (Федоненко и соавт., 2015). Генетика биосинтеза ОПС подробно изучена для энтеробактерий, тогда как для почвенных микроорганизмов сведения об организации генов, ответственных за сборку ОПС и его экспорт на внешнюю мембрану, фрагментарны. За последние годы нами были получены данные о структурах ОПС типовых штаммов двенадцати видов азоспирилл, а для трех видов — *A. zeae* N7^T, *A. melinis* TMCY 0552^T и *A. palustre* B2^T — был проведен анализ генов, вовлеченных в биосинтез их ОПС (Сигида и соавт., 2022).

Целью настоящей работы являлось изучение структуры и характеристика генов биосинтеза ОПС типового штамма бактерий *A. agricola* CC-NIN038^T, выделенного из образцов культивируемой почвы, собранных на острове Тайвань, и сравнение с таковыми для ранее исследованных штаммов азоспирилл.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучаемый штамм, условия культивирования бактерий и выделение липополисахарида. Штамм *Azospirillum agricola* CC-NIN038^T (IBPPM 625) предоставлен Коллекцией ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН (<http://collection.ibppm.ru>). Культивирование бактерий проводили в колбах Эрленмейера в жидкой малатно-солевой среде с витаминами (Konnova et al., 1994) до окончания экспоненциальной фазы роста с использованием шейкера-инкубатора ES-20/60 (“BioSan”, Латвия) при температуре 30°C и 120 об./мин. Клетки осаждали центрифугированием при 3000 g в течение 30 мин с применением центрифуги Allegra X-30R (“Beckman Coulter”, США), ресуспендировали в 0.15 М растворе NaCl; механическим перемешиванием удаляли с поверхности капсульный материал, как описано ранее (Konnova et al., 1994). Клетки высушивали ацетоном и тонко диспергировали.

ЛПС выделяли из высушенных ацетоном бескапсульных клеток горячим 45%-м водным раствором фенола без разделения слоев (Кульшин и соавт., 1987). Экстракты освобождали от остатков фенола диализом с помощью мембран MEMBRA-CEL® с пределом исключения 14 кДа (“Viscase”, Франция), концентрировали на роторном испарителе Laborota 4000 (“Heidolph”, Германия). Экстракт ЛПС титровали 40%-ой CCl₃COOH до конечного значения pH 2.7 и декантировали после осаждения белков центрифугированием, диализовали и лиофилизировали на сушке Bench Top 2K (“VirTis”, США).

Получение О-специфического полисахарида осуществляли мягким кислотным гидролизом ЛПС 2%-ой CH₃COOH при 100°C в течение 4 ч с последующим осаждением центрифугированием (12000 g, 30 мин) нерастворимого в воде липида А. Водорастворимую часть гидролизата разделяли гель-хроматографией на колонке с Toyopearl TSK HW-50 (S) (“Tosoh Bioscience”, Япония) в 1% AcOH. Элюцию контролировали с помощью дифференциального проточного рефрактометра (“Knauer”, Германия). Фракцию высокомолекулярного ОПС концентрировали и лиофилизировали.

Дезацелирование препарата ОПС проводили в 12.5% растворе NH₄OH при 37°C в течение 16 ч. Полученный препарат дезацелированного полисахарида (ДПС) выделяли на колонке с Toyopearl

TSK HW-50 (S) (“Tosoh Bioscience”, Япония) в 1% AcOH.

Ds-Na-ПААГ электрофорез препаратов ЛПС выполняли, как описано ранее (Hitchcock, Brown, 1983). Визуализацию компонентов осуществляли окрашиванием гелей красителем на основе азотнокислого серебра (Tsai, Frasch, 1982).

Газо-жидкостная хроматография. Анализ моносахаридного состава и абсолютных конфигураций сахаров после гидролиза ОПС 2М CF_3COOH (120°C , 2 ч) осуществляли методом ГЖХ ацетатов полиолов (Sawardeker et al., 1965) и ацетилированных 2-(S)-октилглицозидов (Leontein et al., 1978) на хроматографе GC-2010 (“Shimadzu”, Япония) с капиллярной колонкой DB-5 (“Agilent”, США). Градиент температуры от 160°C (1 мин) до 290°C , скорость нагрева $7^\circ\text{C}/\text{мин}$.

Состав жирных кислот ЛПС определяли методом ГЖХ на хроматографе GC-2010 (“Shimadzu”, Япония), снабженном колонкой DB-5 (“Agilent”, США). Градиент температуры от 110°C (5 мин) до 290°C (30 мин), скорость нагрева $5^\circ\text{C}/\text{мин}$. Метилирование выполняли методом, описанным в работе (Mayer et al., 1985).

ЯМР-спектроскопия. Спектры ЯМР записывали на спектрометре Avance-700 II (“Bruker”, Германия) в растворе 99.96%-ой D_2O при 30°C , (внутренний стандарт — триметилсилилпропаноат- d_4 , $\delta_{\text{C}} -1.6$ и $\delta_{\text{H}} 0.0$). Образцы предварительно лиофилизировали дважды из 99.9%-ой D_2O . Двумерные спектры записывали с использованием стандартного математического обеспечения компании “Bruker” (Германия); для сбора и обработки данных использовали программу TOPSPIN 2.1. В экспериментах TOCSY и ROESY время смешивания составляло 150 и 200 мс соответственно.

Анализ генов биосинтеза О-антигенов. Гены биосинтеза L-Rha были извлечены из полногеномных сиквенсов *A. agricola* CC-H1N038^T (GCF_017876095.1) и *A. doebereineriae* GSF71^T (GCF_003989665.1). Предсказание функций идентифицированных последовательностей генов проводили путем выравнивания соответствующих и известных белковых последовательностей (полученных из GenBank), участвующих в биосинтезе О-антигенов других бактерий, с помощью инструмента BLAST (Altschul et al., 1997). Трехбуквенные (*wzm* и *wzt*) и четырехбуквенные обозначения (*rfbA*–*rfbD*, *galE*) присвоены генам в соответствии с их аннотациями, а также результатами попарных выравниваний их нуклеотидных последовательностей. Изображение генных кластеров изучаемых штаммов азоспирилл было получено с помощью визуализатора Easyfig версии 2.2.5 (Sullivan et al., 2011). Гомологию нуклеотидных последовательностей генов оценивали с помощью попарных выравниваний соответствующих последовательностей, выполненных с помощью сервиса BLASTn.

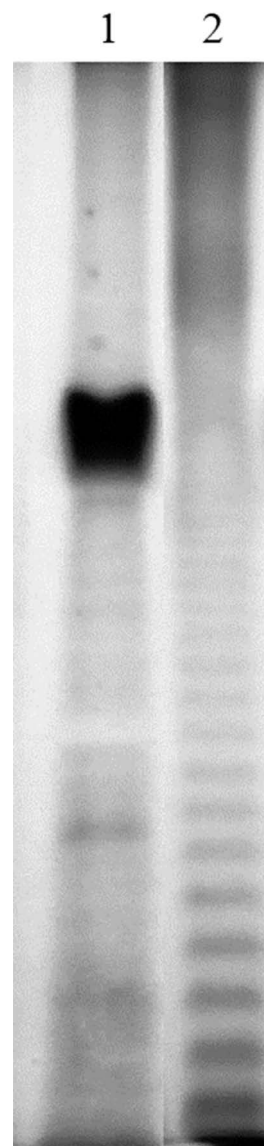


Рис. 1. Электрофореграмма препаратов липополисахаридов в 13.5% ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия: *A. agricola* CC-H1N038^T (1), *Pseudomonas putida* TSh-18 B2 (2).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика липополисахарида и анализ структуры О-специфического полисахарида *A. agricola* CC-H1N038^T. Методом водно-фенольной экстракции из высушенной биомассы бактерий *A. agricola* H1N038^T был выделен ЛПС. Ds-Na-электрофорез препарата ЛПС с окрашиванием серебром (рис. 1) демонстрировал типичную для ЛПС азоспирилл картину с преобладанием молекул ЛПС в верхней части геля, свидетельствующим о высокой

степени замещения корового олигосахарида цепями О-специфического полисахарида.

Анализ состава жирных кислот в ЛПС выявил присутствие характеристичных для бактерий рода *Azospirillum* (Сигида и соавт., 2022) 3-гидроксите-традекановой, 3-гидроксигексадеканой, гексадекановой и октадеценевой кислот, а также еще одного компонента, который по времени удерживания был предварительно идентифицирован нами как 3-гидроксиоктадекановая кислота. В результате анализа моносахаридов методами ГЖХ ацетатов полиолов и ацелированных (*S*)-октилгликозидов в составе ОПС *A. agricola* НН038^T были идентифицированы L-Rha и D-GlcNAc в соотношении 3 : 1.

ОПС был подвергнут комплексному анализу методом спектроскопии ЯМР. Спектр ¹³C ЯМР ОПС (рис. 2) содержал сигналы четырех аномерных углеродов при δ 100.1–103.4 м.д., трех CH₃-С групп (C-6 Rha) при δ 17.7, 17.8 и 17.9 м.д., одной OCH₂-С группы (C-6 GlcNAc) при δ 64.4 м.д., одного атома углерода, связанного с азотом, при δ 56.6 м.д., сигналы О-ацетильных групп при δ 21.5 (CH₃), 174.1 и 175.3 м.д. (CO), и шестнадцать

сигналов других атомов углерода моносахаридных остатков при δ 69.3–82.5 м.д.

В спектре отсутствовали сигналы в диапазоне при δ 83–88 м.д., характеристичные для фуранозидов (Bock, Pedersen, 1983), что свидетельствовало о том, что все моносахаридные остатки находятся в пиранозной форме. В сильнополюсной области ¹H ЯМР спектра присутствовало пять сигналов протонов в диапазоне δ 4.76–5.31 м.д., трех CH₃-С групп (H-6 Rha) при δ 1.24–1.32 м.д., сигналы О-ацетильных групп при δ_H 2.12 и 2.16 м.д. и других протонов моносахаридных остатков в диапазоне δ 3.57–4.14 м.д.

Спектры ¹³C и ¹H ЯМР ОПС были отнесены с помощью 2D экспериментов ¹H, ¹H COSY, TOCSY, ROESY и ¹H, ¹³C HSQC и HMBC (табл. 1).

Прослеживание корреляций в ¹H, ¹H COSY и TOCSY спектрах, в сочетании со значениями констант спин-спиновой взаимодействия ³J_{H,H} (Altona, Haasnoot, 1980) и химическими сдвигами атомов углерода в ¹³C ЯМР спектрах, позволило выявить спин-спиновые системы трех остатков Rha (A–C) и одного остатка GlcNAc (D).

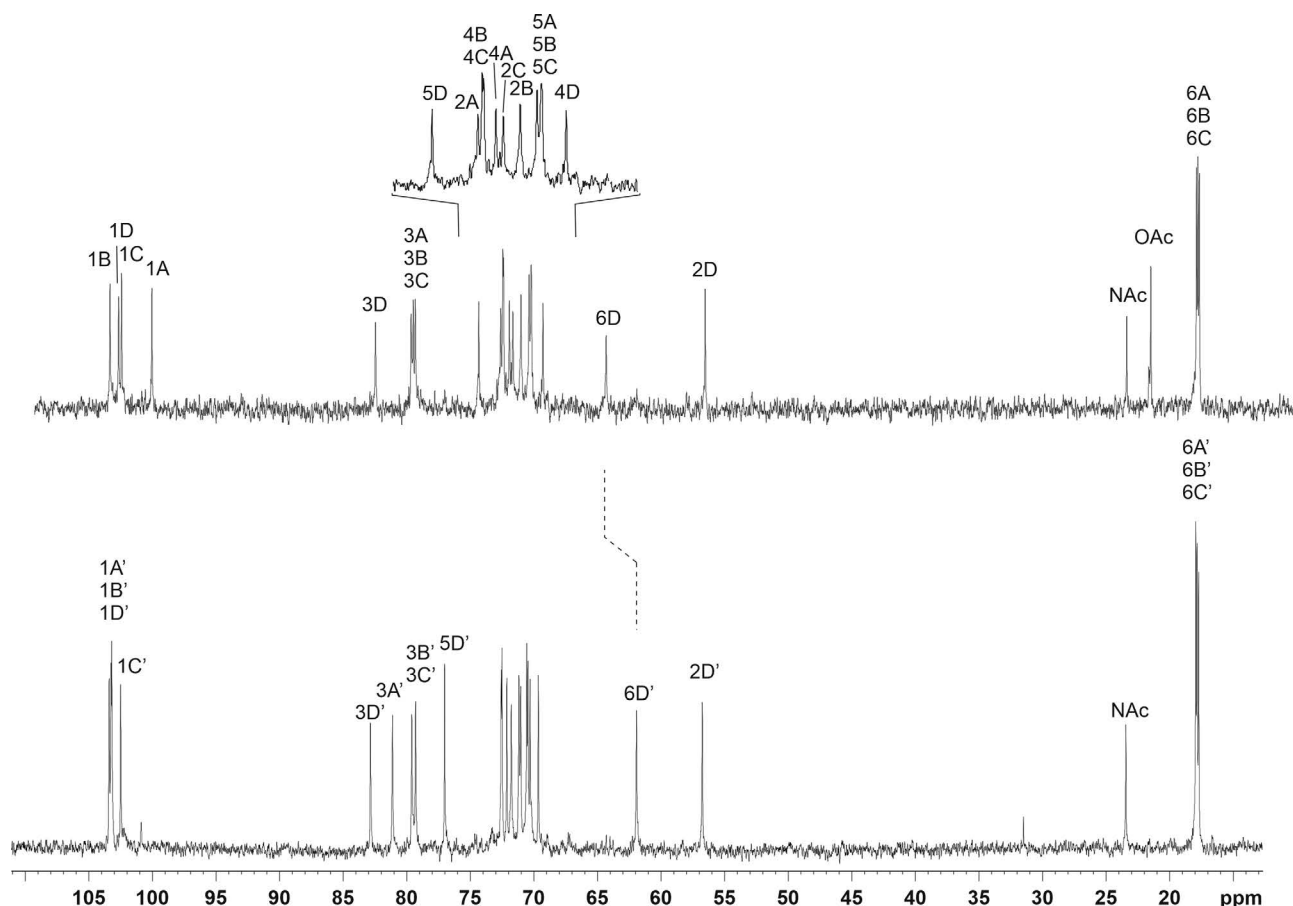


Рис. 2. ¹³C-ЯМР-спектр О-специфического полисахарида *A. agricola* СС-НН038^T. Арабские цифры относятся к атомам углерода в моносахаридных остатках, обозначенных, как указано в табл. 1.

Относительно сильнополюное положение сигналов С-5 остатков **A**, **B** и **C** при δ 70.2-70.4 м.д. и относительно слабополюное положение сигнала С-5 остатка **D** при δ 74.4 м.д. свидетельствовали об α -конфигурации остатков **A**, **B** и **C** и β -конфигурации остатка **D** (Bock, Pedersen, 1983). Наличие характеристичных для α -аномеров Н-1/Н-2 корреляций у остатков **A**, **B** и **C** и характеристичных для β -аномеров Н-1/Н-3, Н-1/Н-5 корреляций у остатка **D** в спектрах ^1H , ^1H ROESY подтверждало аномерные конфигурации моносахаридных остатков (рис. 3).

Значительное смещение сигналов С-3 всех моносахаридных остатков, по сравнению с незамещенными моносахаридами (Bock, Pedersen, 1983), указывало на позиции гликозилирования. Последовательность моносахаридов в повторяющемся звене ОПС была определена на основании межзвеньевых корреляций между аномерными протонами и протонами при связываемых углеродах в спектре ^1H , ^1H ROESY (рис. 3): **A** Н-1/**B** Н-3 при δ 5.10/3.90 м.д.; **B** Н-1/**C** Н-3 при δ 5.00/3.78 м.д., **C** Н-1/**D** Н-3 при δ 4.84/3.62 м.д., **D** Н-1/**A** Н-3 при δ 4.76/4.06 м.д. В спектре ^1H , ^{13}C HMBC (рис. 4)

ОПС присутствовали соответствующие корреляции между аномерными протонами и трансгликозидными углеродами: **A** Н-1/**B** С-3 при δ 5.10/79.7 м.д.; **B** Н-1/**C** С-3 при δ 5.00/79.4 м.д., **C** Н-1/**D** С-3 при δ 4.84/82.5 м.д., **D** Н-1/**A** С-3 а при δ 4.76/79.5 м.д.

Таким образом, ОПС *A. agricola* CC-НН038^T имеет следующую структуру $\rightarrow 3)-\alpha\text{-L-Rhap}2\text{Ac}-(1\rightarrow 3)-\alpha\text{-L-Rhap}-(1\rightarrow 3)-\alpha\text{-L-Rhap}-(1\rightarrow 3)-\beta\text{-D-GlcpNAc}6\text{Ac}-(1\rightarrow$.

Для подтверждения данной структуры ОПС был дезацилирован в мягких щелочных условиях, и полученный препарат ДПС был исследован с применением ^1H и ^{13}C ЯМР спектроскопии, как описано выше для ОПС (табл. 1). Относительно слабополюное положение сигналов Н-2, С-2 остатка **A** и Н-6(а; b), С-6 остатка **D** в спектре ОПС, по сравнению с ДПС (рис. 2, табл. 1) в сочетании с кратностью интегральной интенсивности сигналов ^1H спектров ОПС свидетельствовали о полном О-ацетилировании остатка **A** в положении 2 и остатка **D** в положении 6.

Ранее нами была установлена структура ОПС *A. doebereineriae* GSF71^T, отличающегося от исследуемого в данной работе ОПС степенью

Таблица 1. Данные ^{13}C и ^1H -спектров ЯМР интактного и дезацилированного О-специфического полисахарида *A. agricola* CC-НН038^T (химические сдвиги, м.д.)

Моносахаридный остаток	Химические сдвиги							
	Моносахарид						ОАс	
	Н-1 С-1	Н-2 С-2	Н-3 С-3	Н-4 С-4	Н-5 С-5	Н-6 (а,б) С-6	CH ₃	CO
Интактный О-специфический полисахарид								
$\rightarrow 3)-\alpha\text{-L-Rhap}2\text{Ac}-(1\rightarrow$ A	5.10 100.1	5.31 72.6	4.06 79.5	3.57 72.0	3.90 70.2	1.31 17.8	2.12 21.5	174.1
$\rightarrow 3)-\alpha\text{-L-Rhap}-(1\rightarrow$ B	5.00 103.4	4.14 71.1	3.90 79.7	3.58 72.5	3.82 70.4	1.32 17.9		
$\rightarrow 3)-\alpha\text{-L-Rhap}-(1\rightarrow$ C	4.84 102.5	3.88 71.7	3.78 79.4	3.53 72.4	4.02 70.3	1.24 17.7		
$\rightarrow 3)-\beta\text{-D-GlcpNAc}6\text{Ac}-(1\rightarrow$ D	4.76 102.7	3.86 56.6	3.62 82.5	3.61 69.3	3.65 74.4	4.27, 4.34 64.4	2.16 21.5	175.3
Дезацилированный полисахарид								
$\rightarrow 3)-\alpha\text{-L-Rhap}-(1\rightarrow$ A'	5.03 103.2	4.28 71.0	3.93 81.1	3.52 72.1	3.86 70.5	1.29 17.8		
$\rightarrow 3)-\alpha\text{-L-Rhap}-(1\rightarrow$ B'	5.00 103.4	4.14 71.2	3.89 79.6	3.56 72.5	3.82 70.6	1.32 17.9		
$\rightarrow 3)-\alpha\text{-L-Rhap}-(1\rightarrow$ C'	4.85 102.5	3.88 71.7	3.80 79.3	3.54 72.5	4.03 70.3	1.25 17.7		
$\rightarrow 3)-\beta\text{-D-GlcpNAc}-(1\rightarrow$ D'	4.76 103.2	3.88 56.7	3.63 82.8	3.54 69.6	3.47 77.0	3.77, 3.93 61.9		

Примечание. Сигналы NAc-группы: δ 2.04. δ_{C} 23.4 (CH₃), δ_{C} 175.5 (CO) ОПС и δ_{H} 2.05. δ_{C} 23.4 (CH₃), δ_{C} 175.6 (CO) в ДПС.

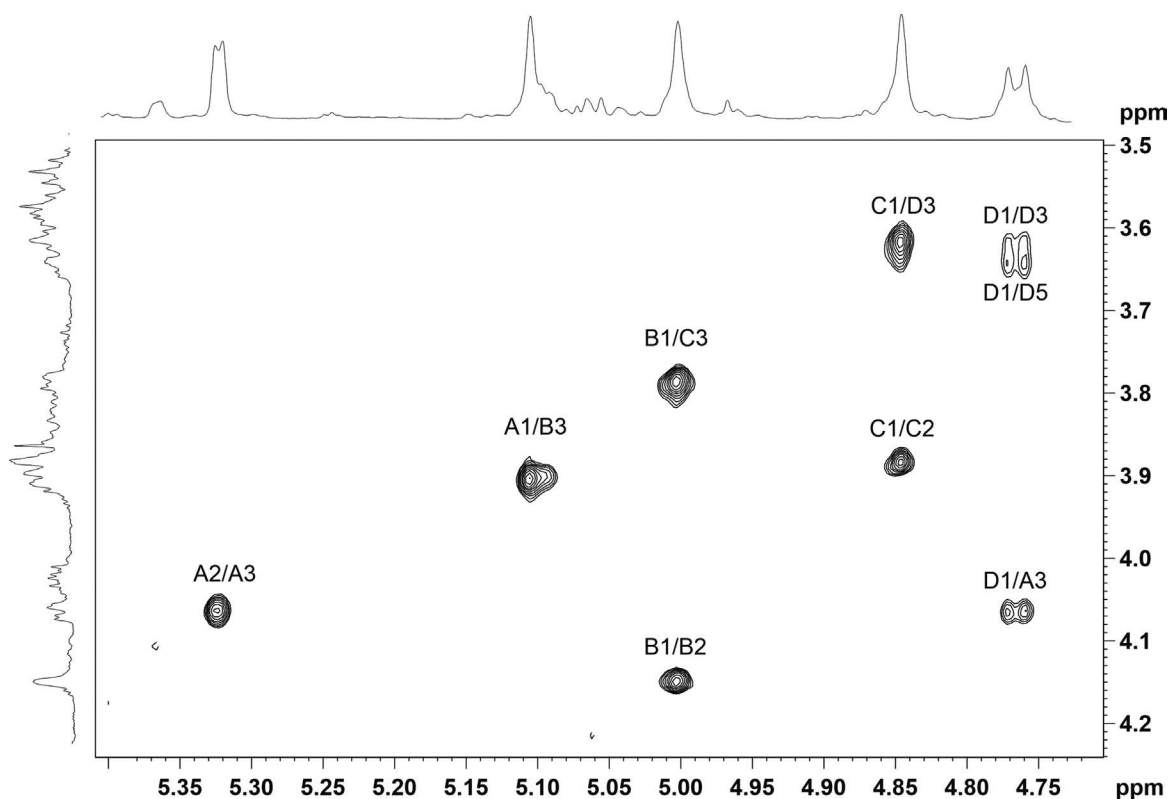


Рис. 3. Фрагмент ^1H , ^1H ROESY спектра О-специфического полисахарида *A. agricola* СС-НІН038^Т. Арабские цифры относятся к протонам в моносахаридных остатках, обозначенных, как указано в табл. 1.

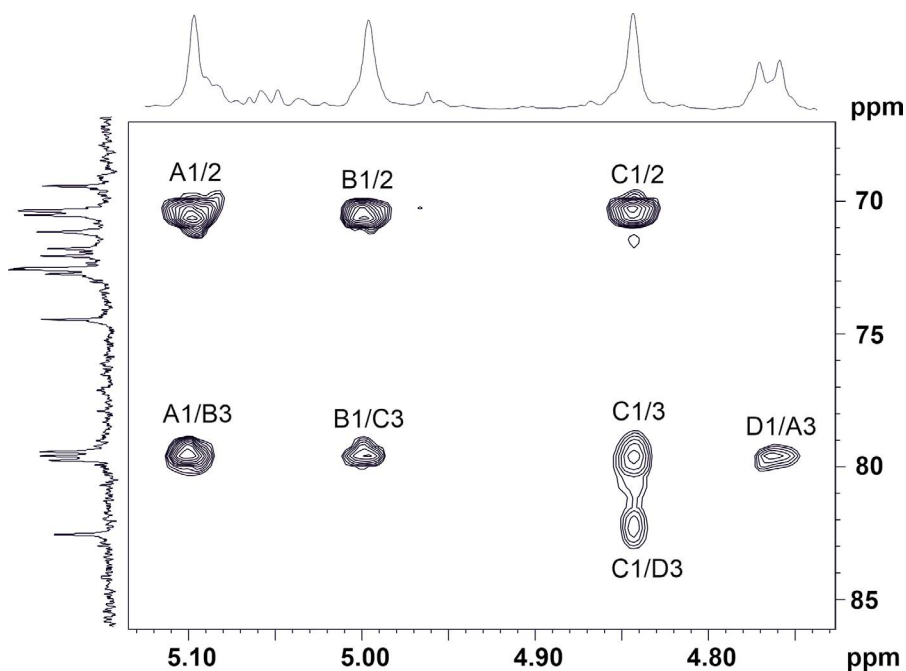


Рис. 4. Фрагмент ^1H , ^{13}C HMQC спектра О-специфического полисахарида *A. agricola* СС-НІН038^Т. Соответствующие участки ^1H и ^{13}C ЯМР спектров расположены вдоль горизонтальной и вертикальной осей соответственно. Арабские цифры относятся к корреляциям С/Н в моносахаридных остатках, обозначенных, как указано в табл. 1.

О-ацетилирования остатка GlcNAc (~ 20%) (Sigida et al., 2019).

Сравнительный анализ генов, ответственных за биосинтез ОПС, у *A. agricola* CC-HIH038^T и *A. doebereinae* GSF71^T. Род *Azospirillum* включает 25 видов, и для большинства типовых штаммов установлены структуры О-антигенов, в составе которых отмечено преобладание L-рамнозы (Федоненко и соавт., 2015, Сигида и соавт., 2022). Известно, что структура О-антигенов грамотрицательных бактерий может быть использована в качестве хемотаксономического критерия, а анализ генов кластеров, ответственных за биосинтез О-антигенов, позволяет оценить их эволюционные взаимосвязи.

Рамноза для большого числа бактерий имеет очень важное значение, поскольку входит в состав полисахаридов клеточной стенки у грамположительных бактерий и липополисахаридов у многих грамотрицательных бактерий. Гены, кодирующие ферменты биосинтеза L-рамнозы, обозначаются в разных организмах как *rml*, *rfb* или *rff* A, B, C и D (Mistou et al., 2016).

Для выяснения генетической основы родства близких по структуре ОПС *A. agricola* CC-HIH038^T и *A. doebereinae* GSF71^T был выполнен анализ данных полногеномного секвенирования исследуемых штаммов. Было показано, что локусы биосинтеза ОПС двух исследуемых штаммов очень схожи по содержанию генов и организации (рис. 5).

Они содержали наборы генов, транскрибирующихся в одном направлении и кодирующих ферменты биосинтеза нуклеотиддифосфатного производного L-Rha (*rfbA*, *rfbB*, *rfbC*, *rfbD*), гликозилтрансферазы, а также ферменты процессинга, обеспечивающие трансмембранный перенос повторяющегося звена (*wzt*, *wzm*). Характеристики всех открытых рамок считывания и их гомологов, выявленных нами с помощью биоинформатического анализа, приведены в табл. 2. Следует отметить, что довольно часто кластер генов, участвующих в биосинтезе О-антигена, ограничен двумя консервативными генами, например, у *Escherichia coli* и родственных им бактерий он расположен на хромосоме между консервативными генами *galF* и *gnd* (Liu et al., 2020). Пока нам не удалось выявить аналогичной закономерности у азоспирилл, что, возможно, обусловлено ограниченностью сведений об организации их генных кластеров биосинтеза О-антигенов.

Инициация синтеза полимерной цепи ОПС, как правило, начинается с переноса N-ацетилглюкозамин-1-фосфата на ундекапренилфосфат и образования так называемого “праймера ОПС”. Эта реакция катализируется GlcNAc-1-фосфат-трансферазой (WecA), относящейся к семейству трансфераз (PNPT), участвующих в сборке гликанов бактериальной клеточной поверхности (Woodward, Naismith, 2016). В составе ОПС *A. agricola* CC-HIH038^T и *A. doebereinae* GSF71^T выявлен остаток GlcNAc, который, с высокой

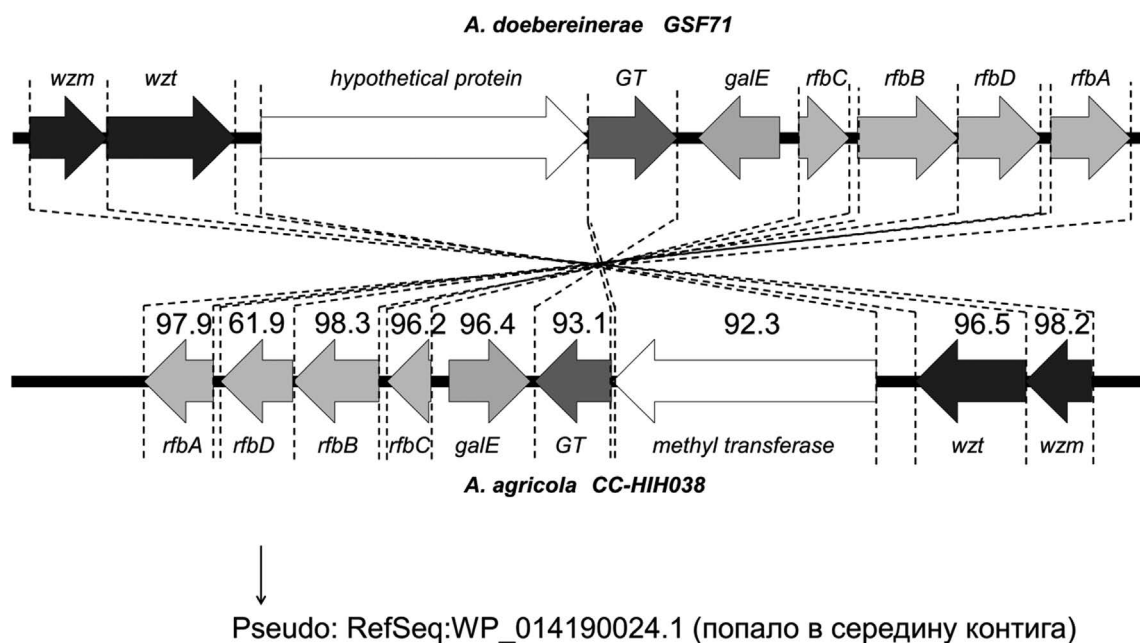


Рис. 5. Схематичное расположение кластеров генов биосинтеза О-антигенов *A. doebereinae* GSF71^T и *A. agricola* CC-HIH038^T. Светло-серыми стрелками обозначены гены биосинтеза моносахаридов, темно-серыми — гликозилтрансферазы, черными — гены процессинга *wzt* и *wzm*, белыми — гены с неизвестными функциями.

Таблица 2. Белки биосинтеза О-антигенов *A. agricola* CC-H1H038^T и *A. doebereinae* GSF71^T и их ближайшие гомологи

Ген	Кодируемый белок	Штамм (код доступа)			
		<i>A. agricola</i> CC-H1H038 ^T (GCF_017876095.1)		<i>A. doebereinae</i> GSF71 ^T (VTTN01000010.1)	
		CDS (ID белка)	Ближайший гомолог* покрытие/идентичность (длина совпадающего фрагмента)	CDS (ID белка)	Ближайший гомолог* Покрывте/идентичность (длина совпадающего фрагмента)
<i>wzm</i>	АВС-транспортная пермеаза	12456..13289** (WP_209782658.1)	<i>Nitrospira</i> sp. (MCA9458094.1) 97/60 (271)	44148..44981 (RUQ68956.1)	<i>Nitrospira</i> sp. (MCA9458094.1) 97/60 (271)
<i>wzt</i>	АВС-транспортный АТФ-связывающий белок	11084..12466 (WP_014190028.1)	<i>Negativicutes bacterium</i> (MDR3564473.1) 95/76 (440)	44971..46350 (RUQ68834.1)	<i>Negativicutes bacterium</i> (MDR3564473.1) 95/76 (440)
MT	SAM-зависимая метилтрансфераза класса 1	7295..10591 (WP_209782630.1)	<i>Rhodospirillaceae bacterium</i> (MBT4739842.1) 99/47 (1045)	46626..50132 (RUQ68835.1)	<i>Rhodospirillaceae bacterium</i> (MBT4739842.1) 94/47 (1045)
GT	Гликозилтрансфераза	6327..7286 (WP_209782629.1)	<i>Rhodospirillaceae bacterium</i> (MDX2225046.1) 91/57 (304)	50141..51085 (RUQ68836.1)	<i>Pseudomonadota bacterium</i> (MCA0201587.1) 90/58 (291)
<i>GalE</i>	UDP-глюкозо 4-эпимераза	5256..6278 (WP_209782628.1)	<i>Thalassospira</i> sp. TSL5-1 (WP_073954240.1) 94/65 (331)	51134..52156 (complement) (RUQ68837.1)	<i>Alphaproteobacteria bacterium</i> (GIK99467.1) 96/70 (332)
<i>rfbC</i>	dTDP-4-дегидро-маннозо 3,5-эпимераза	4475..5026 (complement) (WP_209782627.1)	<i>Methylobacterium</i> sp. B34 (WP_042673940.1) 100/79 (183)	52386..52937 (RUQ68838.1)	<i>Methylobacterium</i> sp. B34 (WP_042673940.1) 100/78 (183)
<i>rfbB</i>	dTDP-глюкозо-4,6-дегидратаза	3302..4378 (complement) (WP_209782626.1)	<i>Pararhodospirillum photometricum</i> (WP_051013520.1) 97/79 (353)	53018..54097 (RUQ68839.1)	<i>P. photometricum</i> DSM 122 (CCG06590.1) 96/79 (358)
<i>rfbD</i>	dTDP-4-дегидроманнозоредуктаза	2397..>3299 (complement) неполный RefSeq: WP_014190024.1	<i>P. photometricum</i> DSM 122 (CCG06589.1) 98/63 (300)	54094..54993 (RUQ68840.1)	<i>Pararhodospirillum photometricum</i> DSM 122 (CCG06589.1) 98/62 (300)
<i>rfbA</i>	Глюкозо-1-фосфат тимидил-трансфераза	1441..2304 (complement) (WP_209782624.1)	<i>P. photometricum</i> (WP_041795448.1) 100/79 (288)	55086..55949 (RUQ68841.1)	<i>P. photometricum</i> (WP_041795448.1) 98/80 (288)

*Бактерия (код GenBank ближайшего гомолога). **Нумерация в контиге Ga0451084_35.

долей вероятности, можно считать первым в биологическом повторяющемся звене. Однако нам не удалось идентифицировать в геномах обоих штаммов гены гомологичные *wesA*, охарактеризованным у других бактерий.

Гены биосинтеза нуклеотидного предшественника D-GlcNAc относятся к так называемым генам “домашнего хозяйства” и обычно не входят в специфическую область генного кластера ОПС. Три остальных моносахарида в повторяющемся

звене ОПС исследуемых штаммов представлены 3-замещенными остатками L-Rhap, синтез предшественника которых дезокситимидиндифосфат-L-рамнозы осуществляют четыре фермента: глюкозо-1-фосфаттимидилтрансфераза (RfbA), dTDP-D-глюкозо-4,6-дегидратаза (RfbB), dTDP-4-кето-6-дезокси-D-глюкозо-3,5-эпимераза (RfbC) и dTDP-4-кето-L-Rha редуктаза (RfbD) (Li et al., 2022), кодируемые генами *rfbABCD*, располагающимися в кластере в консервативном порядке (Madduri et al., 2001).

В локусе выявлен ген гликозилтрансферазы (GT) (табл. 2), биоинформатический анализ которого не демонстрировал существенной гомологии с охарактеризованными генами рамнозилтрансфераз у ограниченного числа бета- и гамма-протеобактерий (*Pseudomonas* spp., *Burkholderia* spp., *Neisseria* spp., *Bordetella* spp., *Acinetobacter baumannii*), что может быть обусловлено вариабельностью структур данного фермента у представителей филогенетически удаленных групп. Следует отметить, что для классификации большого семейства гликозилтрансфераз используют три основных подхода, основанные на: а) анализе аномерной конфигурации реагентов и продуктов реакции, соответственно выделяющие инвертирующие или удерживающие (сохраняющие конфигурацию) GT; б) топологии GT, т.е. характеристике доменной структуры (укладки Россмана) и расположения доноров и акцепторов – GT-A, GT-B и GT-C; в) гомологии последовательностей – 135 различных семейств GT (по состоянию на 15 апреля 2024 г.) в базе данных Carbohydrate-Active enZymes (<http://www.cazy.org>). При широкой распространенности у бактерий рамнозосодержащих полимеров очевидно присутствие отнесенных по классификации CAZy к классу GT-2 рамнозилтрансфераз, сведения о структурных и биохимических особенностях которых остаются лимитированы (Kenyon et al., 2021a, 2021b).

Таким образом, генетические данные, в целом, согласуются с установленными структурами ОПС и могут быть использованы при разработке молекулярной основы для хемотипической классификации штаммов азоспирилл. Учитывая востребованность азоспирилл для биотехнологического использования, а также возникающие противоречия осуществляемого почти исключительно путем секвенирования 16S рРНК (Maronishe et al., 2017), в качестве альтернативных маркеров можно использовать хемотипирование на основании структур О-антигенов и сходство генов их биосинтеза.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена с использованием оборудования Дальневосточного центра структурных

молекулярных исследований (ЯМР- и масс-спектрометрии) (ЦСМИ ТИБОХ ДВО РАН).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Кульшин В.А., Яковлев А.П., Аваева С.Н., Дмитриев Б.А. Улучшенный метод выделения липополисахаридов из грамотрицательных бактерий // Мол. генетика, микробиология и вирусология. 1987. № 5. С. 44–46.
- Kulshin V.A., Yakovlev A.P., Avaeva S.N., Dmitriev B.A. An improved method for the isolation of lipopolysaccharides from Gram-negative bacteria // Mol. genetics, microbiology and virology. 1987. № 5. P. 44–46.
- Сигида Е.Н., Гринев В.С., Здоровенко Э.Л., Дмитренко А.С., Бурьгин Г.Л., Кондюрина Н.К., Коннова С.А., Федоненко Ю.П. Характеристика структуры и генов биосинтеза О-антигенов *Azospirillum zeae* N7(T), *Azospirillum melinis* TMCY0552(T) и *Azospirillum palustre* B2(T) // Биоорг. химия. 2022. Т. 48. С. 302–312.
- Sigida E.N., Grinev V.S., Zdorovenko E.L., Dmitrenko A.S., Burygin G.L., Kondurina N.K., Konnova S.A., Fedonenko Y.P. O-Antigens of *Azospirillum zeae* N7 (T), *Azospirillum melinis* TMCY0552 (T), and *Azospirillum palustre* B2 (T): structure elucidation and analysis of biosynthesis genes // Rus. J. Bioorg. Chem. 2022. V. 48. P. 519–528.
- Федоненко Ю.П., Сигида Е.Н., Коннова С.А., Игнатов В.В. Структура и серология О-антигенов азотфиксирующих ризобактерий рода *Azospirillum* // Известия АН. Сер. химическая. 2015. Т. 64. С. 1024–1031.
- Fedonenko Y.P., Sigida E.N., Konnova S.A., Ignatov V.V. Structure and serology of O-antigens of nitrogen-fixing rhizobacteria of the genus *Azospirillum* // Rus. Chem. Bull. 2015. V. 64. P. 1024–1031.
- Altona C., Haasnoot C.A.G. Prediction of *anti* and *gauche* vicinal proton-proton coupling constants in carbohydrates: a simple additivity rule for pyranose rings // Org. Magn. Reson. 1980. V. 13. P. 417–429.
- Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs // Nucl. Acids Res. 1997. V. 25. P. 3389–3402.

- Bock K., Pedersen C. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of monosaccharides // Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 1983. V. 41. P. 27–66.
- Caroff M., Novikov A. Lipopolysaccharides: structure, function and bacterial identification // OCL. 2020. V. 27. Art. 31.
- Cassán F., Coniglio A., López G., Molina R., Nievas S., Le Noir de Carlan C., Donadio F., Torres D., Rosas S., Pedrosa F.O., de Souza E., Zorita M.D., de-Bashan L., Mora V. Everything you must know about *Azospirillum* and its impact on agriculture and beyond // Biol. Fertil. Soils. 2020. V. 56. P. 461–479.
- Fukami J., Cerezini P., Hungria M. *Azospirillum*: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation // Amb. Express. 2018. V. 8. Art. 73.
- Hitchcock P.J., Brown T.M. Morphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolysaccharide chemotypes in silver-stain polyacrylamide gels // J. Bacteriol. 1983. V. 154. P. 269–277.
- Kenyon J.J., Arbatsky N.P., Sweeney E.L., Zhang Y., Senchenkova S.N., Popova A.V., Shneider M.M., Shashkov A.S., Liu B., Hall R.M., Knirel Y.A. Involvement of a multifunctional rhamnosyltransferase in the synthesis of three related *Acinetobacter baumannii* capsular polysaccharides K55, K74 and K85 // Int. J. Biol. Macromol. 2021a. V. 166. P. 1230–1237.
- Kenyon J.J., Kasimova A.A., Sviridova A.N., Shpirt A.M., Shneider M.M., Mikhaylova Y.V., Shelenkov A.A., Popova A.V., Perepelov A.V., Shashkov A.S., Dmitrenok A.S. Correlation of *Acinetobacter baumannii* K144 and K86 capsular polysaccharide structures with genes at the K locus reveals the involvement of a novel multifunctional rhamnosyltransferase for structural synthesis // Int. J. Biol. Macromol. 2021b. V. 193. P. 1294–1300.
- Konnova S.A., Makarov O.E., Skvortsov I.M., Ignatov V.V. Isolation, fractionation and some properties of polysaccharides produced in a bound form by *Azospirillum brasilense* and their possible involvement in *Azospirillum* – wheat root interaction // FEMS Microbiol. Lett. 1994. V. 118. P. 93–99.
- Leontein K., Lindberg B., Lönngren J. Assignment of absolute configuration of sugars by g.l.c. of their acetylated glycosides formed from chiral alcohols // Carbohydr. Res. 1978. V. 62. P. 359–362.
- Li S., Chen F., Li Y., Wang L., Li H., Gu G., Li E. Rhamnose-containing compounds: biosynthesis and applications // Molecules. 2022. V. 27. Art. 5315.
- Liu B., Furevi A., Perepelov A.V., Guo X., Cao H., Wang Q., Reeves P.R., Knirel Y.A., Wang L., Widmalm G. Structure and genetics of *Escherichia coli* O antigens // FEMS Microbiol. Rev. 2020. V. 44. P. 655–683.
- Madduri K., Waldron C., Merlo D.J. Rhamnose biosynthesis pathway supplies precursors for primary and secondary metabolism in *Saccharopolyspora spinosa* // J. Bacteriol. 2001. V. 183. P. 5632–5638.
- Maroniche G.A., García J.E., Salcedo F., Creus C.M. Molecular identification of *Azospirillum* spp.: limitations of 16S rRNA and qualities of *rpoD* as genetic markers // Microbiol. Res. 2017. V. 195. P. 1–10.
- Mayer H., Tharanathan R., Weckesser J. Analysis of lipopolysaccharides of gram-negative bacteria // Meth Microbiol. 1985. V. 18. P. 157–207.
- Mistou M.Y., Sutcliffe I.C., van Sorge N.M. Bacterial glycobiology: rhamnose-containing cell wall polysaccharides in Gram-positive bacteria // FEMS Microbiol. Rev. 2016. V. 40. P. 464–479.
- Nievas S., Coniglio A., Takahashi W.Y., López G.A., Larama G., Torres D., Rosas S., Etto R.M., Galvão C.W., Mora V., Cassán F. Unraveling *Azospirillum*'s colonization ability through microbiological and molecular evidence // J. App. Microbiol. 2023. V. 134. Art. lxad071.
- Pedraza R.O., Filippone M.P., Fontana C., Salazar S.M., Ramírez-Mata A., Sierra-Cacho D., Baca B.E. Chapter 6 – *Azospirillum* // Beneficial Microbes in Agro-Ecology: Bacteria and Fungi/ Eds. Amare-san N., Senthil Kumar M., Annapurna K., Kumar K., Sankaranarayanan A. Elsevier, Academic Press, 2020. P. 73–105.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823414-3.00006-X>
- Sawardeker J.S., Sloneker J.H., Jeanes A. Quantitative determination of monosaccharides as their alditol acetates by gas liquid chromatography // Anal. Chem. 1965. V. 37. P. 1602–1603.
- Sigida E.N., Fedonenko Y.P., Shashkov A.S., Zdorovenko E.L., Konnova S.A., Knirel Y.A. Structure of the O-specific polysaccharide of *Azospirillum doebereineriae* type strain GSF71T // Carbohydr. Res. 2019. V. 478. P. 54–57.
- Sullivan M.J., Petty N.K., Beatson S.A. Easyfig: a genome comparison visualizer // Bioinformatics. 2011. V. 27. P. 1009–1010.
- Tsai C.M., Frasch C.E. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels // Anal. Biochem. 1982. V. 119. P. 115–119.
- Woodward L., Naismith J.H. Bacterial polysaccharide synthesis and export // Curr. Opin. Struct. Biol. 2016. V. 40. P. 81–88.

EXPERIMENTAL ARTICLES

Structural and Genetic Relationship of the O-Antigens of the Type Strains *Azospirillum agricola* CC-HIH038 and *Azospirillum doebereinae* GSF71

E. N. Sigida^{1, *}, V. S. Grinev^{1, 2}, M. S. Kokoulin³, S. A. Konnova^{1, 2}, Y. P. Fedonenko¹

¹*Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, FRC Saratov Scientific Centre of Russian Academy of Sciences, 13, Prospekt Entuziastov, Saratov, 410049, Russia*

²*Chernyshevsky Saratov State University, 83, Ulitsa Astrakhanskaya, Saratov, 410012, Russia*

³*G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, 159/2, Prospekt 100 let Vladivostoku, Vladivostok, 690022, Russia*

**e-mail: sigida_e@ibppm.ru*

Lipopolysaccharide was isolated from cells of the type strain of rhizobacteria *Azospirillum agricola* CC-HIH038^T by phenol extraction. O-specific polysaccharide was obtained by mild acid hydrolysis of lipopolysaccharide followed by chromatographic fractionation. On the basis of monosaccharide analysis, including determination of absolute configurations, 1D and 2D ¹H and ¹³C NMR spectroscopy, the following structure of the O-specific polysaccharide repeating unit of *A. agricola* CC-HIH038^T was elucidated: →3)-α-L-Rhap2Ac-(1→3)-α-L-Rhap-(1→3)-α-L-Rhap-(1→3)-β-D-GlcpNAc6Ac-(1→, which is structurally related to *A. doebereinae* GSF71^T. Based on the analysis of full-genome sequencing data for strains *A. agricola* CC-HIH038^T and *A. doebereinae* GSF71^T the O-specific polysaccharide biosynthesis loci were identified, which were characterized by a similar organization and a high level of gene homology, confirming the common structure of the O-antigens of these strains.

Keywords: *Azospirillum*, lipopolysaccharide, O-specific polysaccharide, O-specific polysaccharide structure, O-antigen biosynthesis gene cluster

УДК 579.26+579.083.1

АЛКАЛОТЕРМОФИЛЬНЫЕ ЖЕЛЕЗОРЕДУЦИРУЮЩИЕ БАКТЕРИИ ГОРЯЧИНСКОГО МЕСТОРОЖДЕНИЯ ТЕРМАЛЬНЫХ ВОД¹

© 2024 г. Д. Г. Заварзина^{a, *}, А. А. Ключкина^a, А. Ю. Меркель^a, Т. А. Маслова^b, А. А. Маслов^c

^aИнститут микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, 117314, Россия

^bФакультет химической технологии и экологии РГУ нефти и газа имени И.М. Губкина, Москва, 119991, Россия

^cГеологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, 119234, Россия

*e-mail: zavarzinatwo@mail.ru

Поступила в редакцию 30.05.2024 г.

После доработки 25.06.2024 г.

Принята к публикации 03.07.2024 г.

Исследование метаболической группы железоредуцирующих прокариот, использующей слабокристаллический минерал ферригидрит в качестве акцептора электронов, выявило ее широкое распространение на Земле. Тем не менее способность железоредукторов развиваться в полиэкстремальных условиях — при повышенных значениях pH и температурах до сих пор показана не была. Для доказательства существования алкалотермофильных железоредукторов нами были исследованы пробы воды и осадков азотных терм Горячинска. Эти источники приурочены к молодым тектоническим разломам Байкальской рифтовой зоны, и их воды характеризуются низкой минерализацией, высокими значениями pH (8.8–9.2) и температуры (53–55°C). При добавлении синтезированного ферригидрита к пробам воды и донных отложений Горячинских терм и их инкубации в анаэробных условиях при температурах 50 и 55°C были получены накопительные культуры, восстанавливающие этот минерал. Профилирование проб воды и осадков и первичных накопительных культур по гену 16S rPНК выявило их высокое филогенетическое разнообразие, представленное почти исключительно бактериальными таксонами. Дальнейшие пересевы с ферригидритом и органическими кислотами или водородом, добавленными в качестве донора электронов, позволили получить устойчивые накопительные культуры органо- и литотрофных алкалотермофильных железоредукторов. От 30 до 50% общей представленности в них составляли представители рода *Parvivirga* — одного из первых культивируемых представителей группы OPB41 (ныне порядок *Anaerosomatales*) филума *Actinomycetota*.

Ключевые слова: экстремофильные прокариоты, алкалотермофильные железоредукторы, подземная биосфера, гидротермы, Байкал, *Parvivirga*

DOI: 10.31857/S0026365624060124

Процесс анаэробной железоредукции, осуществляемой микроорганизмами, использующими для получения энергии минералы трехвалентного железа, например, ферригидрит, интенсивно исследуется с 80-х годов прошлого века. На сегодняшний день известно более 150 видов прокариот, способных к дисимбиотическому восстановлению железа, относящихся как к домену Bacteria, так и Archaea (Nixon et al., 2022). Подавляющее большинство железоредукторов — бактерии, представители более чем 20 семейств, что доказывает их высокое филогенетическое разнообразие (Waite et al., 2020; Li et al., 2021; Khomyakova et al., 2022a, 2022b; Nixon et al., 2022; Khomyakova et al., 2022b; Zavarzina et al., 2022;

Zhang et al., 2022; Han et al., 2023; Zakharyuk et al., 2023; Boltyanskaya et al., 2023). Описанные на сегодняшний день железовосстанавливающие микроорганизмы выделены из разнообразных эконш, включая анаэробные илы пресноводного и морского происхождения, болота, антропогенные местообитания, такие как метантенки и топливные элементы, а также подземные экосистемы. Наибольшее число видов выделено из морских и пресноводных осадков, морских и наземных гидротермальных систем и почв (Nixon et al., 2022). Большинство известных железоредукторов — мезофилы, имеющие оптимум роста при температурах 25–35°C и значениях pH 6.5–7.5. Однако примерно 40% описанных видов

¹Дополнительные материалы размещены в электронном виде по DOI статьи: <https://doi.org/10.31857/S0026365624060124>

железоредукторов выделено из экстремальных мест обитания: известны термофильные, психрофильные, ацидофильные и алкалофильные представители этой метаболической группы (Nixon et al., 2022). Анализ распределения 141 вида железоредукторов в координатах pH и T, проведенный Nixon и соавт., выявил несколько интересных закономерностей: несмотря на то, что термодинамические расчеты показывают возможность существования полиэкстремофильных железоредукторов, описанные на сегодняшний день микроорганизмы либо относятся к “нормальной” микрофлоре, либо приспособлены к экстремальным условиям только по одному из исследованных параметров — pH или T. По мнению авторов исследования, такое распределение во многом является следствием предвзятости пробоотбора и существенно искажает реальную картину распространенности процессов железоредукции на Земле. Исправить ситуацию могло бы, с одной стороны, привлечение к анализу данных метагеномных исследований и высокопроизводительного секвенирования гипервариабельных участков генов 16S рРНК, с другой стороны, целенаправленное выделение в чистые культуры полиэкстремофильных железоредукторов, которое могло бы разрешить вопрос о возможности их существования или выявило бы биохимические или кинетические ограничения, препятствующие их развитию (Nixon et al., 2022).

Примером таких полиэкстремальных экосистем являются щелочные гидротермы Байкальской рифтовой зоны, в частности, Горячинское месторождение подземных вод, расположенное на восточном берегу озера Байкал, приуроченное к Кики-Туринской зоне разломов. Эта значительная по ширине и протяженности тектонически ослабленная зона была заложена в протерозое, функционирует до настоящего времени и является юго-восточной границей Байкальской рифтовой системы, сложенной кристаллическими магматическими (граниты) и метаморфическими (гнейсы, гнейсограниты) породами (Ломоносов, 1974). Разломы и сопровождающие их зоны интенсивной трещиноватости формируют емкостную среду, вмещающую значительную часть естественных ресурсов трещинных вод этого района (Плюсин и соавт., 2013). Термальные воды Горячинского месторождения представляют собой типичные напорные трещинные воды, поднимающиеся с глубины порядка 1500–1800 м. По химическому составу они относятся к слабоминерализованным азотным щелочным термам. Температура воды на выходе составляет 53–55°C, дебит 1200 м³/сут, pH 8.8–9.2 (Ясницкая, Ткачук, 1961). Термальные щелочные воды этого месторождения образовались за счет взаимодействия метеорных вод с железосодержащими магматическими, метаморфическими и осадочными породами, подвергшимися дроблению и деформации в результате тектонических движений регионального масштаба, что привело к образованию

многочисленных трещин (Плюсин и соавт., 2013), которые могут потенциально служить местобитаниями для подземной микрофлоры.

Таким образом, Горячинские термы представляют собой безусловный интерес в качестве объекта для целенаправленного поиска и выделения полиэкстремофильных железоредукторов, что и являлось целью настоящих исследований.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Отбор проб. Скважина 1/76, пробуренная в 1963 году на глубину 100 м, вскрывает трещинные сульфатно-натриевые воды с минерализацией 54.2 мг/л, pH 8.9, температурой 54°C в отложениях баргузинского интрузивного комплекса, представленного сильно раздробленными амфиболитовыми и гнейсо-плагиогранитными брекчиями, в интервале 30–100 м (Ясницкая, Ткачук, 1961). Оголовок скважины находится в бетонном колодце, над которым построено надкаптажное деревянное сооружение (рис. S1a). За время эксплуатации скважины у основания колодца образовались грифоны, выходящие на поверхность и образующие ручей, впадающий в пруд, сформировавшийся разгружающимися подземными водами в 150 м западнее скважины. Проба № 1 (E 108°18'26.03", N 52°59'13.93") представляла собой песчаный и каменистый грунт и воду ручья, отобранные у самого основания бетонного колодца. Проба № 2 (E 108°18'27.97", N 52°59'14.04") была отобрана в 40 м ниже по течению ручья, образованного грифонами скважины 1/76 и термальным самоизливающимся источником, каптированным колодцем, расположенным в 20 м севернее скважины 1/76. Проба представляла собой илистые осадки, содержащие остатки прибрежной растительности и воду, отобранные с поверхности донных отложений ручья (рис. S1б). Проба № 3 представляла собой восстановленные илистые отложения, грунт и воду, отобранные там же с глубины 10 см (pH 8.8, T 50°C). Пробы вносили в стерильные стеклянные флаконы объемом 50 мл, содержащие синтезированный ферригидрит (расчетная конечная суммарная концентрация трехвалентного железа 45 мМ), приготовленный, как описано ранее (Zavarzina et al., 2006), и полностью заполняли водой, отобранной из места отбора проб для поддержания анаэробных условий. Для пробы № 1 было поставлено три варианта: (1) без добавления дополнительных доноров; (2) с добавлением смеси органических кислот — формиат, ацетат, лактат и пируват (по 0.5 г/л каждого); (3) с добавлением дрожжевого экстракта (1 г/л). В пробы № 2 и 3, богатые органическим веществом, дополнительные доноры не вносили. В лаборатории перед инкубацией

из каждого флакона было вытеснено 30 мл воды азотом. Продувку газом осуществляли в ламинаре через мембранный фильтр (0.22 мкм). Инкубацию проводили в темноте в течение 10 сут при T 55°C (проба № 1) и 50°C (пробы № 2 и 3).

Выделение ДНК, подготовка и секвенирование библиотек ампликонов гена 16S рРНК. ДНК выделяли из осадков, отобранных в 5 мл стерильные пластиковые флаконы, параллельно с пробами для инкубации. Также ДНК выделяли из осадков и воды первичных накопительных культур, в которых было зафиксировано восстановление ферригидрита, и полученных в ходе дальнейших пересевов накопительных культур органо- и литотрофных алкалотермофильных железоредукторов. Для этого флаконы встряхивали и шприцем анаэробно отбирали по 5 мл суспензии, которую затем центрифугировали при 13000 об./мин в течение 20 мин при 4°C. Полученную надосадочную жидкость сливали, а осадки использовали для экстракции тотальной ДНК. ДНК выделяли при помощи набора FastDNA™ SPIN Kit for Soil ("MP Biomedicals", США), согласно инструкции производителя.

Подготовку библиотек ампликонов V4 участка гена 16S рРНК проводили по описанной ранее методике (Gohl et al., 2016) с использованием пары праймеров 515F (5'-GTGBCAGCMGCCGCGGTAA-3'; Hugerth et al., 2014) — Pro-mod-805R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'; Меркель и соавт., 2019). Секвенирование библиотек проводили на системе MiSeq™ ("Illumina Inc.", США) с использованием картриджа для получения парно-концевых прочтений длиной 150 нуклеотидов. Биоинформатический анализ проводили аналогично описанному в работе (Merkel et al., 2021). Все данные секвенирования депонированы в NCBI BioProject PRJNA1117896.

Получение накопительных культур. В качестве посевного материала для получения накопительных культур алкалотермофильных железоредукторов использовали пробы (5% засев) из флаконов с первичными накопительными культурами, проявившими способность к железоредукции, визуально определяемой по потемнению осадка ферригидрита. В качестве минеральной основы использовали среду, приготовленную с соблюдением техники анаэробного культивирования под N_2 (100%), следующего состава (г/л): 0.15 KH_2PO_4 ; 0.15 NH_4Cl ; 0.15 KCl ; 0.15 $MgCl_2 \cdot 2H_2O$; 0.15 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$; Na_2CO_3 0.3; растворы витаминов (1 мл/л) (Wolin et al., 1963) и микроэлементов (1 мл/л) (Кевбрин, Заварзин 1992); pH подводили до значения 9.0 10% раствором NaOH. Разлив осуществляли в пробирки Хангейта по 10 или 5 мл под током N_2 (100%). В качестве доноров электронов для накопительных культур использовали смесь органических кислот, отдельные органические кислоты (формиат, ацетат, лактат или пируват по 1 г/л) или

молекулярный водород (20% от газовой фазы). Инкубацию проводили при 55°C.

Состояние накопительных культур контролировали по изменению численности прямым подсчетом клеток, окрашенных красителем акридиновым оранжевым, с помощью флуоресцентного микроскопа Axio Lab.A1 ("Carl Zeiss", Германия) и образованию двухвалентного железа, определенного спектрометрически с феррозином (Stookey, 1970).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Восстановление ферригидрита в первичных накопительных культурах алкалотермофильных железоредукторов

Изменение цвета осадка ферригидрита было зафиксировано через 10 сут после начала инкубации во всех пробах, за исключением пробы № 1 без добавления дополнительных доноров. Качественные характеристики осадка (цвет, магнитность), результаты измерения двухвалентного железа, растворимого в 6N HCl, pH и подсчета клеток суммированы в табл. 1. Морфологически в первичных накопительных культурах преобладали палочки разной длины, споровые и неспоровые, преимущественно неподвижные, и вибрионы (дополнительные материалы, рис. S2).

Филогенетический состав микробного сообщества проб воды и осадка и первичных накопительных культур, восстанавливающих ферригидрит

Проба № 1. Микробное сообщество пробы, отобранной в месте разгрузки грифона скважины 1/76, на уровне филумов характеризовалось достаточно высоким разнообразием. Основную часть сообщества (42%) составляли некультивируемые представители филума *Pseudomonadota* (синоним *Proteobacteria*), второе по распространенности место (14.7%) занимали представители *Nitrospirota*, третье (10.5%) представители филума *Deinococcota* (рис. 1).

При этом представленность большинства бактериальных таксонов на уровне семейств—родов (менее 3%) (рис. 2, табл. S1), а большинство филотипов имело низкое сходство с известными таксонами, что значительно затруднило интерпретацию их метаболических возможностей. Из известных таксонов заметную часть сообщества составлял филотип, относящийся к роду *Meiothermus* (10.5% представленности).

Представители этого рода — термофильные азобные сахаролитики, способные также к нитратредукции, являются типичной микрофлорой термальных источников, в частности, щелочных гидротерм Буриятии, но обнаружены и в восстановительных

Таблица 1. Основные характеристики процесса восстановления ферригидрита первичными накопительными культурами алкалотермофильных железоредукторов

Проба	T _{инкуб.} , °C	pH после инкубации	Цвет осадка	Магнитность осадка	Fe(II), mM	Количество клеток, кл./мл
№ 1	55	8.9	Коричневый	Не магнитный	0.2	7.3×10^5
№ 1 + органические кислоты	55	8.49	Черный	Сильно магнитный	3.75	2.9×10^7
№ 1 + дрожжевой экстракт	55	8.16	Черный	Слабо магнитный	9.31	3.4×10^7
№ 2	50	7.88	Темно-коричневый	Не магнитный	4.75	6.9×10^7
№ 3	50	8.0	Черный	Слабо магнитный	4.38	1.1×10^8
Контроль*	55	8.9	Коричневый	Не магнитный	0	Не обнаружено

*В качестве контроля использовали флакон с ферригидритом и пробами донных осадков и воды источника Горячинск, перед инкубацией подвергшийся стерилизации при 1 атм и 120°C.

условиях подземных водоносных горизонтов (Будагаева, Бархутова, 2015; Raposo et al., 2019; Лукина и соавт., 2023).

Проба №1/ферригидрит/органические кислоты. При добавлении в качестве акцептора электронов синтезированного ферригидрита и смеси органических кислот в качестве доноров электронов состав микробного сообщества существенно изменился. На уровне филумов уменьшилась доля представителей *Pseudomonadota* и *Nitrospirota*, за счет увеличения доли представителей *Bacillota* (синоним *Firmicutes*), Sva0485 и *Actinomycetota* (рис. 1). На уровне семейств—родов основу первичной накопительной культуры составляли филотипы, близкие к родам *Desulfotomaculum* (21.1% представленности), *Meiothermus* (12.3%) и некультивируемым представителям филума Sva0485 (14.7%) (рис. 2, табл. S1). Способность к органотрофной железоредукции показана для некоторых видов рода *Desulfotomaculum*, например, *D. reducens* MI-1 (Otwell et al., 2018). Представители некультивируемой группы Sva0485 были впервые обнаружены в биопленках шахты Ричмонд (Bond et al., 2020) и описаны как потенциальные восстановители сульфата или окисного железа. С тех пор многочисленные исследования подтвердили присутствие бактерий клады Sva0485 (относительная численность $\geq 5\%$) в кислых экосистемах, связанных с разработкой сульфидных руд (включая воду, осадки и биопленки) (Tan et al., 2019). В некоторых случаях численность этой группы достигала более 50% сообщества, как в случае осадков, отобранных в горе Сян (Китай) (Hao et al., 2007). Предпринятая недавно реконструкция четырех композитных геномов представителей этой клады, полученных из осадков шахтных вод нескольких разработок юго-восточного

Китая, позволила реконструировать их метаболизм на основе геномных данных и выделить их в новый порядок в статусе *Candidatus* внутри группы Sva0485 — *Ca. Acidulodesulfobacterales* (Tan et al., 2019). Согласно проведенному анализу геномов, представители этого порядка являются ацидофильными факультативно анаэробными автотрофами, которые, вероятно, используют кислород в качестве акцептора электронов и Fe(II) или сульфиды в качестве донора электронов при развитии в кислородосодержащих средах сульфидных месторождений — шахтных водах и на поверхности биопленки. В то же время они могут осуществлять диссимиляционное восстановление сульфатов или Fe(III) и брожение в анаэробных условиях внутри биопленок и осадков (Tan et al., 2019). Следует отметить, что помимо кислых экосистем, эта группа была обнаружена также в конкрециях гидроксидов железа из четвертичных отложений Японии (представленность 9.4%), неактивном глубоководном черном курильщике (представленность 12.3–13.8%) и железистых осадках из пресноводного озера Товути (Индонезия) (представленность ~2–20%) (Yoshida et al., 2008; Sylvan et al., 2012; Vuillemin et al., 2018), т.е. в экосистемах с нейтральными или слабощелочными условиями. Представители этой группы, но с низким (88%) уровнем идентичности, согласно анализу BLAST были идентифицированы нами в зоне питания верхнемелового водоносного горизонта Ессентукского месторождения минеральных вод. Вскрываемые воды этого участка — пресные, карбонатно-натриевого типа, теплые, окисигенированные, характеризуются повышенными значениями pH 8.5 (Zavarzina et al., в печати). Существенное накопление (до 14.7%) представителей этой группы в микрокосме с ферригидритом



Рис. 1. Таксономическое разнообразие микроорганизмов, ассоциированных с природными пробами № 1, 2 и 3 и накопительными культурами на уровне филумов.

и органическими кислотами, по сравнению с исходной пробой (ниже пределов обнаружения метода), не только подтверждает высказанные ранее предположения о метаболических особенностях этой глубокой ветви бактерий, связанных с преобразованием минералов железа, но и существенно расширяет представления об их экологии.

Проба №1/ферригидрит/дрожжевой экстракт.

При добавлении в качестве акцептора электронов синтезированного ферригидрита и донора электронов дрожжевого экстракта на уровне филумов еще больше возрасла доля представителей *Bacillota*, а вместо филума Sva0485 преимущество получили филотипы, относящиеся к филуму *Thermotogota*

(рис. 1). На более низком таксономическом уровне было зафиксировано накопление филотипов, относящихся к родам *Fervidobacterium* (14.0% представленности), *Thermincola* (11.0%) и *Desulfurispora* (8.1%) (рис. 2, табл. S1), хотя в целом сообщество отличалось высоким таксономическим разнообразием и состояло из 25 родов, представленность которых составила не менее 1%. Накопление представителей вышеуказанных родов по сравнению с исходной пробой, где они не были зафиксированы, было отмечено и в микрокосме с ферригидритом и органическими кислотами, однако там их представленность составляла не более 2% (рис. 2, табл. S1). Представители рода *Fervidobacterium* являются облигатными

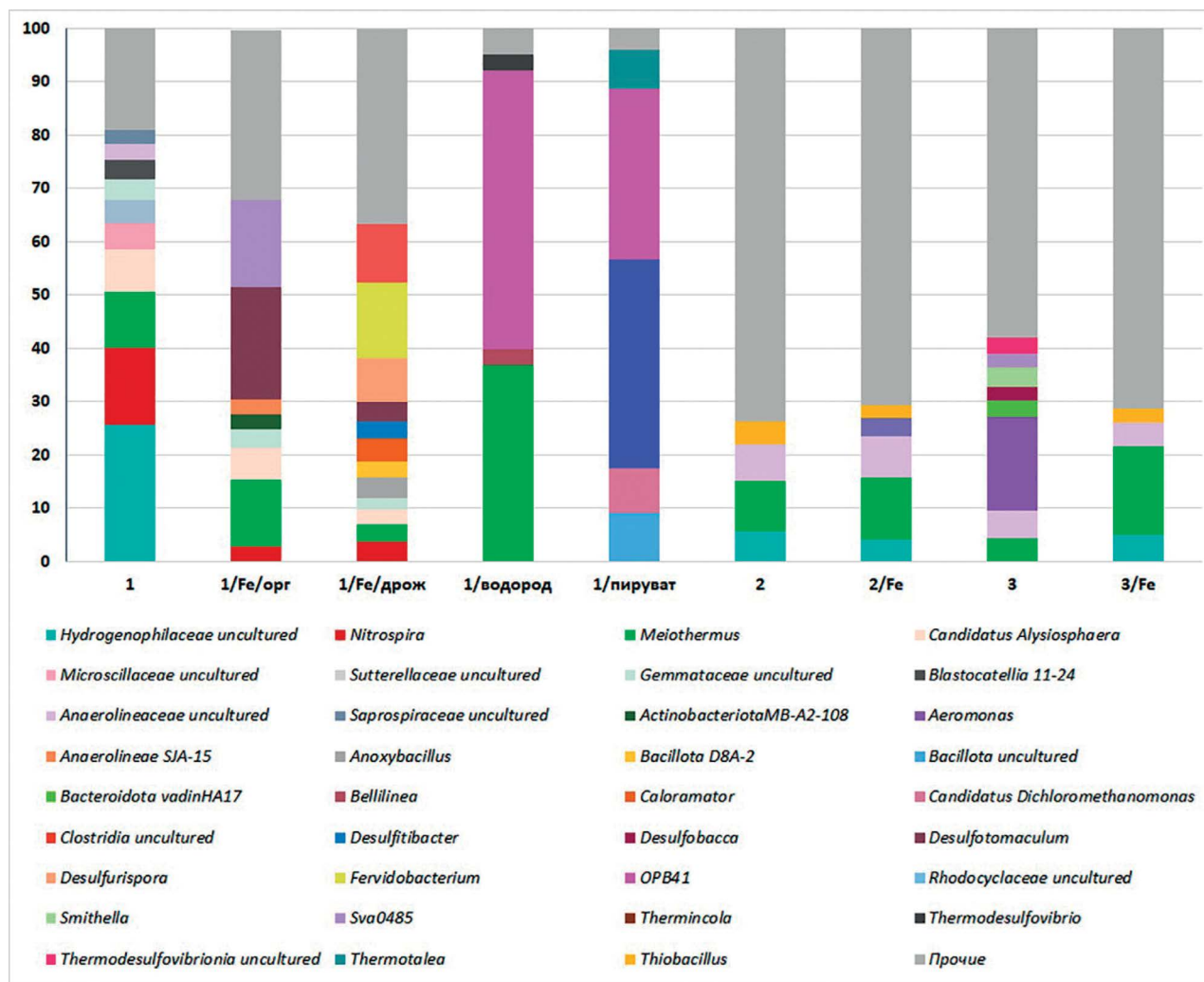


Рис. 2. Таксономическое разнообразие микроорганизмов на уровне родов, ассоциированных с пробами и накопительными культурами Горячинского месторождения подземных вод. Условные обозначения: 1 – проба № 1; 1/Fe/орг – первичная накопительная культура, полученная при добавлении ферригидрита и смеси органических кислот; 1/Fe/дрож – первичная накопительная культура, полученная при добавлении ферригидрита и дрожжевого экстракта; 1/водород – накопительная культура диссимиляционных алкалоотермофильных железоредукторов, с водородом как донором электронов; 1/пируват – накопительная культура диссимиляционных алкалоотермофильных железоредукторов, с пируватом как донором электронов; 2 – проба № 2; 2/Fe – первичная накопительная культура, полученная при добавлении ферригидрита; 3 – проба № 3; 3/Fe – первичная накопительная культура, полученная при добавлении ферригидрита.

анаэробами-органотрофами, использующими широкий спектр сахаров, полисахаридов и пептидов, в частности, дрожжевой экстракт, встречающиеся в местообитаниях, связанных с наземной вулканической активностью, характеризующихся температурами около 65°C и низкой соленостью (Podosokorskaya et al., 2011). Интересно, что все без исключения представители этого рода способны к облегченному восстановлению элементной серы, а для наиболее филогенетически близких к ним представителей рода *Thermosypho* была показана способность к облегченному брожению за счет восстановления соединений Fe(III) (Chen et al., 2021).

Хемоорганотрофные представители рода *Thermincola* широко распространены в различных экосистемах, и их метаболизм основан, в том числе, на железоредукции с использованием органических кислот, например, ацетата в качестве донора электронов (Zavarzina et al., 2007; Byrne-Bailey, 2010), кроме того, доказана их способность к электрогенезу (Marshall, May, 2009). Единственный известный на сегодняшний день представитель рода *Desulfurispora* – анаэробная термофильная бактерия, способная к восстановлению различных серных соединений, но не к железоредукции с использованием в качестве

донора электронов водорода, органических кислот, спиртов и некоторых сахаров (Kaksonen et al., 2007). Однако есть сообщения о накоплении представителей этого рода при восстановлении железосодержащих минералов — шверцманита и ярозита, осаждающихся на геохимическом барьере при смешении кислых вод с нейтральными в сульфидных месторождениях (Bao et al., 2018). Таким образом, в первичной накопительной культуре с добавлением дрожжевого экстракта в качестве дополнительного донора электронов преимущество получили термофильные анаэробные микроорганизмы, способные к анаэробному брожению и, возможно, использующие минералы трехвалентного железа для сброса избыточных электронов, а также хемоорганотрофные бактерии, использующие органические кислоты, прежде всего, ацетат, а также молекулярный водород, накапливающиеся при разложении сложных органических веществ, в качестве доноров электронов при железоредукции и способные к активному росту в условиях повышенных значений pH.

Проба № 2. Микробное сообщество пробы, отобранной с поверхности илистых осадков в 50 м ниже по течению ручья, образованного при каптаже скважины 1/76, отличалось большим по сравнению с пробой № 1 таксономическим разнообразием, и на уровне филумов (рис. 1), и на уровне семейств—родов (рис. 2, табл. S1) преимущественно бактериальных таксонов. Археи в пробе составляли не более 0.1%. Также, как и в пробе № 1, в сообществе доминировали представители филума *Pseudomonadota* (28.6%), однако уменьшилась доля представителей филумов *Nitrospirota* (2.2%) и *Acidobacteriota* (2.7%), но увеличилась доля представителей филумов *Chloroflexota* (12.9%). Существенную долю в сообществе пробы № 2 составляли филотипы, относящиеся к филуму *Desulfobacterota* (11.0%), не обнаруженные в пробе № 1. Интересным оказался тот факт, что добавление к пробе воды и ила синтезированного ферригидрита с последующей инкубацией в течение 10 сут при 50°C практически не оказало влияния на исходный состав сообщества (вторая цифра в перечислении филумов ниже). На уровне филумов сообщества пробы № 2 и первичной накопительной культуры с ферригидритом были представлены: *Nitrospirota* (2.2–2.4%), *Pseudomonadota* (28.6–26.9%), *Actinomycetota* (2.9–7.6%), *Deinococcota* (9.6–11.7%), *Acidobacteriota* (2.7–4.6%), *Chloroflexota* (12.9–17.2%), *Bacteroidota* (8.7–5.7%), *Desulfobacterota* (11.0–8.0%), Sva0485 (0.8–2.0%), *Planctomycetota* (2.8–3.3%), *Verrucomicrobiota* (2.9–1.3%), *Cyanobacteria* (4.6–1.0%) (рис. 1).

На более низком таксономическом уровне наиболее многочисленными в микробном составе исходной пробы и первичной накопительной культуры были филотипы, относящиеся к роду

Meiothermus (9.5–11.6%) и некультивируемым представителям семейств *Anaerolineaceae* (7.0–7.9%) и *Hydrogenophilaceae* (5.6–4.1%) (рис. 2, табл. S1). Сообщества также отличались высоким таксономическим разнообразием и состояли из 19 (проба № 2) и 24 (первичная накопительная культура) родов, представленность которых составила не менее 1.0%. При этом прочие минорные таксоны, относительная представленность которых была менее 1.0%, составили 48.6 и 38.3% микробного состава пробы № 2 и первичной накопительной культуры соответственно. Таким образом, можно предположить, что микробное сообщество илистых отложений в месте отбора пробы № 2 в большой степени состоит из органотрофов, и добавление ферригидрита не оказало на них существенного влияния, поскольку внесенный ил содержал достаточное количество органики, а ферригидрит, вероятно, восстанавливался преимущественно за счет облегченного брожения, при сбросе избыточных электронов.

Проба № 3. Микробное сообщество пробы, отобранной с глубины 10 см (восстановленный слой), также отличалось исключительно высоким биоразнообразием, но в целом имело большое сходство с пробой № 2 (рис. 1, 2, табл. S1). В этом случае добавление к пробе воды и ила синтезированного ферригидрита и инкубация в течение 10 сут при 50°C существенно сказались на максимально представленном в исходной пробе филотипе. Бактерии, относящиеся к роду *Aeromonas* (17% представленности в пробе № 3) в первичной накопительной культуре полностью элиминировались. Их заменили бактерии, близкие к роду *Meiothermus* (4.3–16.6%). На уровне филумов микробный состав исходной пробы № 3 и накопительной культуры с ферригидритом были представлены: *Nitrospirota* (3.1–2.8%), *Pseudomonadota* (26.6–25.9%), *Actinomycetota* (3.9–6.3%), *Deinococcota* (4.3–16.6%), *Acidobacteriota* (1.9–4.3%), *Chloroflexota* (16.2–15.4%), *Bacteroidota* (8.7–4.7%), *Desulfobacterota* (14.0–8.5%), Sva0485 (2.7–1.0%), *Planctomycetota* (2.7–3.7%), TA06 (1.9–0.1%) (рис. 1).

Получение накопительных культур диссимилиационных алкалотермофильных железоредакторов

Для получения накопительных культур диссимилиационных алкалотермофильных железоредукторов была использована первичная накопительная культура пробы № 1 с добавлением в качестве дополнительных доноров электронов смеси органических кислот, поскольку в данном случае повышалась вероятность накопления микроорганизмов, способных к диссимилиационной железоредукции. Первичная накопительная культура была пересеяна на анаэробную среду (pH 9.0) с ферригидритом

в качестве акцептора электронов и молекулярным водородом (10%, об.), формиатом, ацетатом, лактатом или пируватом, добавленных в концентрации 1 г/л, в качестве донора электронов. После 7 сут инкубации при 55°C были отобраны пробы для определения образовавшегося двухвалентного железа, измерения pH, морфологии преобладающих клеток (табл. 2).

Оценка филогенетического состава была проведена для накопительных культур, с наиболее интенсивным восстановлением ферригидрита (пируват) и с молекулярным водородом, в случае которого было возможно развитие автотрофных диссимилиационных железоредукторов. Результаты профилирования полученных сообществ по гену 16S рРНК выявили существенное сокращение микробного разнообразия в полученных накопительных культурах (рис. 1, 2, табл. S1).

В накопительной культуре с пируватом в качестве донора электронов 95.9% сообщества составляли 5 филотипов, четыре из которых относились к филуму *Bacillota* (рис. 2, табл. S1). Представители рода *Clostridium* составляли 39.2% сообщества и были наиболее близки к *Petroclostridium xylanilyticum* и некультивируемым представителям *Desulfotomaculum* sp. со сходством 99.63%. Поскольку *P. xylanilyticum* — типичная анаэробная органотрофная бактерия, разлагающая ксилан и не способная к железоредукции (Zhang et al., 2018), вероятнее всего обнаруженный филотип является представителем рода *Desulfotomaculum*. Этот род грамположительных органотрофных бактерий, для которых была показана способность не только к сульфатредукции, но и восстановлению металлов, в частности железа. Например, *D. reducens* MI-1 способен к восстановлению растворимых соединений окисного железа, а также нерастворимых оксидов и гидроксидов за счет облегченного сбраживания

пирувата (Dalla Vecchia et al., 2014). Неожиданным стало накопление в пробе филотипа, относящегося к группе OPB41, — до недавнего времени некультивируемых представителей филума *Actinomycetota* (синоним *Actinobacteriota*). Первые культивируемые бактерии этой группы, представляющие два новых рода в новом порядке *Anaerosomatales* и семействе *Anaerosomataceae* — *Anaerosoma tenue* и *Parvivirga hydrogeniphila* были выделены недавно из грязевых вулканов Тамани и водоносного горизонта Ессентукского месторождения минеральных вод (Khomyakova et al., 2022). Филотип, составляющий в накопительной культуре с пируватом 32% прочтений, имел сходство 99.6% с *P. hydrogeniphila*, т.е., скорее всего, являлся штаммом этого вида или новым видом (Yarza et al., 2014).

P. hydrogeniphila является термофильным анаэробом и облигатным автотрофным железоредуктором, использующим в качестве доноров электрона только молекулярный водород или формиат. Несмотря на то, что клетки этого филотипа имеют схожую морфологию и тенденцию к образованию колоний на минеральных частицах (рис. 3), характерные для *P. hydrogeniphila*, типовой штамм этого вида не способен развиваться при значениях pH выше 8.5 (Khomyakova et al., 2022).

Филотип, близкий к роду *Thermotalea*, составлял в накопительной культуре 7.2% прочтений. Единственный представитель рода — *Thermotalea metallivorans* — анаэробная органотрофная бактерия, способная восстанавливать гидроксиды железа и марганца (Ogg et al., 2009). Два остальных филотипа, составлявшие 9.1 и 8.4% прочтений, относились к глубокой некультивируемой ветви *Bacillota* и некультивируемому роду *Dichloromethanomona* в статусе *Candidatus*, представители которого, как предполагается, способны к анаэробному разложению дихлорметана (Kleindienst et al., 2017).

Таблица 2. Основные характеристики процесса восстановления ферригидрита накопительными культурами алкалотермофильных железоредукторов, полученных из пробы № 1 после инкубации при 55°C

Донор	pH после инкубации	Цвет осадка	Магнитность осадка	Fe(II), mM	Морфология преобладающих клеток
Молекулярный водород	8.88	Темно-коричневый	Магнитный	5.71	Короткие палочки, образующие плотные колонии на частицах минералов
Формиат	8.8	Темно-коричневый	Не магнитный	1.34	Короткие палочки, образующие плотные колонии на частицах минералов
Ацетат	8.67	Темно-коричневый	Сильно магнитный	4.38	Вибрионы и длинные палочки
Лактат	8.57	Черный	Сильно магнитный	6.53	Вибрионы и длинные палочки
Пируват	7.94	Черный	Сильно магнитный	6.98	Вибрионы и длинные палочки
Контроль	8.9	Коричневый	Не магнитный	0	Не обнаружено

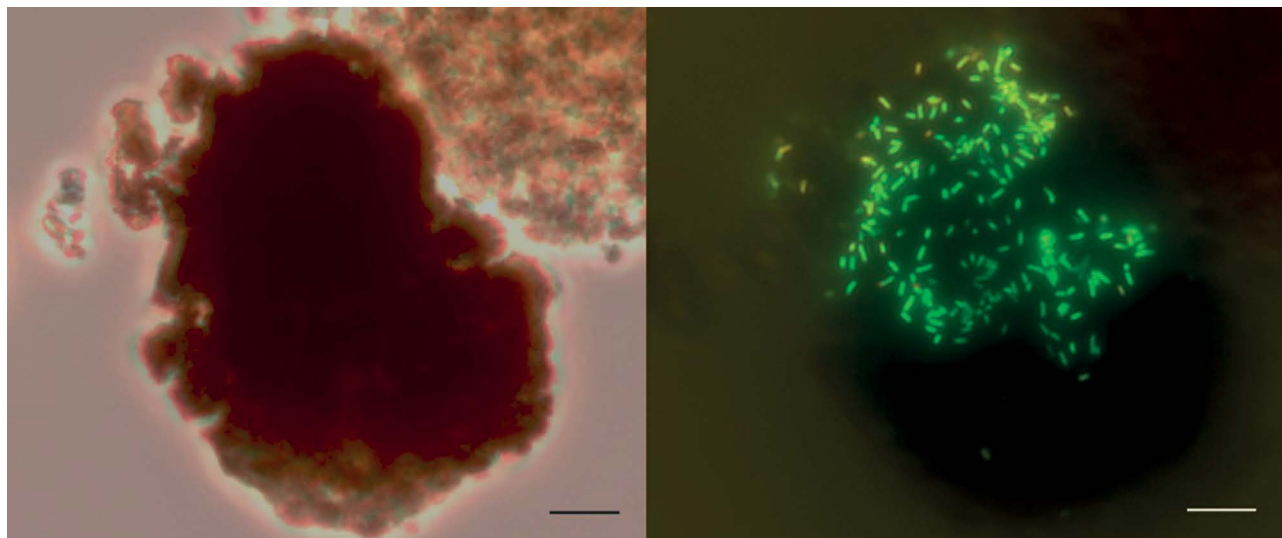


Рис. 3. Микрофотографии алкалотермофильного представителя рода *Parvivirga*, колонизирующего частицы ферригидрита на среде с молекулярным водородом в качестве донора электронов; а — фазово-контрастная микроскопия; б — флуоресцентная микроскопия того же препарата, окрашенного акридиновым оранжевым. Масштабная линейка — 10 мкм.

Накопительная культура на водороде характеризовалась практически идентичным составом сообщества с пируватом (рис. 2, табл. S1), однако филотип, близкий к *P. hydrogeniphila*, составлял в нем уже 52.3%, филотип, родственный *Candidatus* Dichloromethanomonas, обнаружен в нем не был, а 36.8% сообщества составлял филотип, близкий к *Meiothermus*, который ранее детектировался в исходной пробе и пробе с добавлением ферригидрита и органических кислот, составляя в них 10.5 и 12.3% прочтений соответственно.

Экологическая интерпретация полученных результатов

Известно, что выход Горячинских терм приурочен к разлому субширотного простирания. Источником трехвалентного железа, как потенциального акцептора электронов, здесь могут выступать железосодержащие минералы кристаллических пород — биотит, роговая обманка и амфибол или гидроокислы железа в песчаниках, составляющие до 10–20% водовмещающих пород (Ломоносов, 1974). Крайне важным является факт, что поток холодных вод в районе Горячинских терм имеет радиальный характер и направлен к очагу разгрузки, который, таким образом, имеет локальный характер и обусловлен сосредоточенным поступлением термальной воды с глубины по узкой зоне дробления кристаллических пород верхнепротерозойского возраста (рис. 4) (Плюсин и соавт., 2013).

Питание и пополнение подземных вод в данном районе происходит за счет атмосферных осадков и, в меньшей степени, конденсационных вод. В отношении формирования азотных терм Горячинска большинство исследователей придерживаются инфильтрационной гипотезы, согласно которой пресные холодные воды, попадая по трещинам на глубину, под воздействием высоких температур агрессивно взаимодействуют с вмещающими породами, изменяя свой первоначальный катионно-анионный и газовый состав (Пиннекер, 1969; Ломоносов, 1974). Исходно кислородно-азотные по газовому составу, они расходуют кислород на окислительно-восстановительные реакции, в частности, с участием двухвалентного железа, и, постепенно нагреваясь, переходят в чистые азотные термальные воды. Микроэлементный состав термальных вод Горячинска близок к составу пород Баргузинского интрузивного комплекса, в то время как содержание органического вещества идентично таковому в поверхностных водах (Гановичева, 1969). По мнению И.С. Ломоносова (1974), современные азотные термы Горячинска представляют собой разубоженные инфильтрационными водами силикатные растворы, сбросившие основной рудный груз при подъеме на поверхность. Сделанные геологические и гидрогеологические заключения позволяют предположить, что в исследуемом районе существует несколько пространственно ограниченных экологических ниш, пригодных для развития алкалотермофильных прокариот. К первой (I на рис. 4) следует отнести узкий участок дробления протерозойских кристаллических пород и залегающего

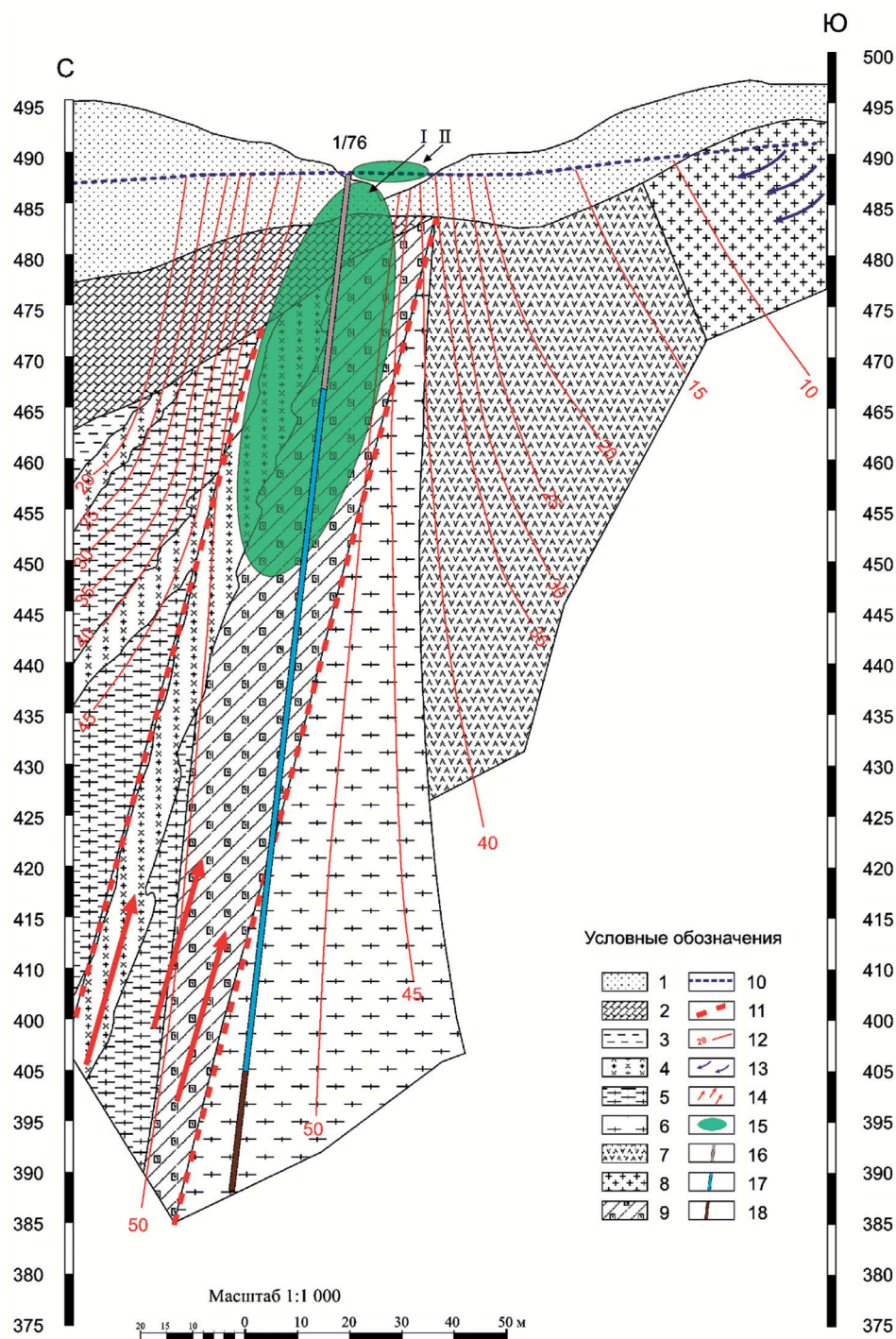


Рис. 4. Схематичный геолого-гидрогеологический разрез зоны тектонического дробления в районе Горячинского курорта. Составлен по фондовым материалам “Проект округа горно-санитарной охраны курорта Горячинск Бурятской АССР. Гидрогеологическое управление “Геоминвод”. Комплексная гидрогеологическая пария. Москва, 1984 г.”. Условные обозначения: 1 – пески четвертичного возраста; 2 – песчаники базальные, полимиктовые четвертичного возраста; 3 – песчаники; 4 – пегматиты; 5 – протерозойские плагиограниты; 6 – протерозойские гнейсоплагиограниты; 7 – протерозойские сиенит диориты и кварцевые диориты; 8 – гранодиориты; 9 – зона тектонического дробления и трещиноватости пород; 10 – пьезометрическая поверхность термальных и холодных вод; 11 – зона тектонического дробления и трещиноватости пород; 12 – изотермы через 5°C; 13 – направление движения холодных вод; 14 – направление движения горячих вод; 15 – зона развития алкалотермофильных микроорганизмов: I – подземная; II – наземная; 16–18 – конструкция скважины 1/76: 16 – обсадная труба; 17 – дырчатый фильтр; 18 – отстойник.

выше маломощного слоя песчаника, формирующие локальную зону разгрузки термальных вод, обеспечивающую возможность развития подземной термофильной микрофлоры. Вторая (II на рис. 4) поверхностная экониша формируется в русле ручья, образованного разгружающимися термальными щелочными водами. По мере удаления от скважины каменисто-песчаное дно ручья заливается за счет разлагающихся остатков высшей растительности, чему в большой степени способствуют ванночки, огороженные камнями, сделанные посетителями терм. Эти две экониши практически не различаются по температуре и pH, но резко контрастны по содержанию органического вещества — подземная алкалотермофильная микрофлора развивается в олиготрофных условиях, поверхностная — в эвтрофных.

Наши исследования в существенной степени подтвердили существование этих контрастных экониш. В результате проведенных исследований удалось доказать присутствие в них бактерий, способных к железоредукции в условиях повышенных температур и значений pH. Восстановление ферригидрита в пробах № 2 и 3, содержащих илистые осадки, богатые органикой, осуществлялось в основном за счет процесса облегченного брожения. Этот вывод обоснован тем фактом, что добавление ферригидрита практически не оказало влияния на состав и соотношение фило типов микробного сообщества первичных накопительных культур по сравнению с исходными пробами, что указывает на преимущественное развитие в них органотрофных анаэробных бактерий, осуществляющих разложение углеводов и белковых соединений. Гораздо перспективнее в смысле получения чистых культур диссимиляционных алкалотермофильных железоредукторов выглядит проба № 1, отобранная у грифона скважины 1/76 (рис. 1a). Содержания органики в исходной пробе оказалось недостаточным для восстановления ферригидрита в первичной накопительной культуре, а внесение дополнительных доноров электронов — смеси органических кислот или дрожжевого экстракта привело к существенному изменению исходного микробного состава пробы и позволило выявить фило типы, с высокой вероятностью ответственные за осуществление железоредукции в исследуемых условиях. Действительно, таксоны наиболее близкие к доминирующим в первичных накопительных культурах фило типам — представители родов *Desulfotomaculum*, *Thermincola*, некультивируемой группы Sva0485, по литературным данным являются хемоорганотрофными бактериями, способными к восстановлению железа в анаэробных условиях (Zavarzina et al., 2007; Byrne-Bailey, 2010; Otwell et al., 2018; Tan et al., 2019). Накопление представителей некультивируемой группы Sva0485 в присутствии

органических кислот и ферригидрита расширило знания о ее распространении, поскольку до сих пор фило типы этой группы обнаруживались в местообитаниях, связанных с циклами железа и серы, но характеризующихся кислыми или нейтральными условиями.

В результате проведенных исследований удалось получить несколько устойчивых накопительных культур алкалотермофильных бактерий, способных к диссимиляционной железоредукции за счет окисления молекулярного водорода или органических кислот при pH 9.0 и температуре 55°C. Существенное накопление представителей рода *Parvivirga* в литоавтотрофных условиях позволяет сделать несколько выводов об экологии этих микроорганизмов. Высокая специализация рода *Parvivirga*, заключающаяся в облигатной литоавтотрофной железоредукции (Khomyakova et al., 2022), как способе получения энергии, позволяет утверждать, что выявленный нами фило тип является представителем подземной микрофлоры Горячинских гидротерм. Отсутствие подходящих доноров электронов, а также окислительные условия в месте отбора проб объясняют его низкую представленность в исходной пробе и первичных накопительных культурах, находящуюся на пределе чувствительности метода: 0.02, 0.07% (дрожжевой экстракт), 1% (органические кислоты). В присутствии молекулярного водорода в анаэробных условиях эта группа получила значительное преимущество и составляла больше 50% сообщества.

Таким образом, наши исследования подтвердили сделанное ранее предположение Nixon et al. (2022) об отсутствии термодинамических, биохимических или кинетических ограничений для осуществления железоредукции в условиях повышенных температур и значений pH и позволяют надеяться на получение в скором времени чистых культур первых диссимиляционных алкалотермофильных железоредукторов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работы по выделению накопительных и чистых культур и анализу данных выполнены при поддержке проекта РНФ № 24-64-00023. Молекулярные исследования ААК, ААМ проведены при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Будагаева В.Г., Бархутова Д.Д. Термофильные органотрофные бактерии рода *Meiothermus* в щелочных гидротермах Прибайкалья (Бурятия) // Самарский научный вестник. 2015. № 2 (11). С. 30–32.
- Ломоносов И.С. Геохимия и формирование современных гидротерм Байкальской рифтовой зоны. Новосибирск: Наука, Сиб. отделение, 1974. 164 с.
- Лукина А.П., Кадников В.В., Русанов И.И., Авакян М.Р., Белецкий А.В., Марданов А.В., Пименов Н.В., Равин Н.В., Карначук О.В. Анаэробные *Thermodesulfovibrio* и аэробные *Meiothermus* сосуществуют в глубоководной термальной воде // Микробиология. 2023. Т. 92. С. 250–260.
- Lukina A.P., Kadnikov V.V., Rusanov I.I. et al. Anaerobic *Thermodesulfovibrio* and aerobic *Meiothermus* coexist in deep thermal water // Microbiology (Moscow). 2023. V. 92. P. 324–333.
<https://doi.org/10.1134/S0026261723600234>
- Меркель А.Ю., Тарновецкий И.Ю., Подосокорская О.А., Тошчаков С.В. Анализ систем праймеров на ген 16S рРНК для профилирования термофильных микробных сообществ // Микробиология. 2019. Т. 88. С. 671–680.
- Merkel A.Y., Podosokorskaya O.A., Toshchakov S.V., Tarnovetskiy I.Y. Analysis of 16S rRNA primer systems for profiling of thermophilic microbial communities // Microbiology (Moscow). 2019. V. 88. P. 671–680.
- Плюснин А.М., Замана Л.В., Шварцев С.Л., Токаренко О.Г., Чернявский М.К. Гидрогеохимические особенности состава азотных гидротерм Байкальской рифтовой зоны // Геология и геофизика. 2013. Т. 54. С. 647–664.
- Ясницкая Н.В., Ткачук В.Г. Гидротермальные ресурсы курорта Горячинск. Минеральные воды южной части Восточной Сибири // Гидрогеология минеральных вод и их народнохозяйственное значение / Под ред. Ткачук А.В., Толстихиной Н.И. М.–Л.: Изд-во Академии наук СССР, 1961. Т. 1. 348 с.
- Boltyanskaya Y.V., Kevbrin V.V., Grouzdev D.S., Detkova E.N., Koziaeva V.V., Novikov A.A., Zhilina T.N. *Halonatronomonas betaini* gen. nov., sp. nov., a haloalkaliphilic isolate from soda lake capable of betaine degradation and proposal of *Halarsenatibacteraceae* fam. nov. and *Halothermotrichaceae* fam. nov. within the order *Halanaerobiales* // Syst. Appl. Microbiol. 2023. V. 46. Art. 126407.
<https://doi.org/10.1016/j.syapm.2023.126407>
- Bond P.L., Smriga S.P., Banfield J.F. Phylogeny of microorganisms populating a thick, subaerial, predominantly lithotrophic biofilm at an extreme acid mine drainage site // Appl. Environ. Microbiol. 2000. V. 66. P. 3842–3849.
<https://doi.org/10.1128/aem.66.9.3842-3849.2000>
- Byrne-Bailey K.G., Wrighton K.C., Melnyk R.A., Agbo P., Hazen T.C., Coates J.D. Complete genome sequence of the electricity-producing “*Thermincola potens*” strain JR // J. Bacteriol. 2010. V. 192. P. 4078–4079.
<https://doi.org/10.1128/JB.00044-10>
- Chen Y., He Y., Shao Z., Han X., Chen D., Yang J., Zeng X. *Thermosiphon ferrireducens* sp. nov., an anaerobic thermophilic iron(III)-reducing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal sulfide deposits // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2021. V. 71. Art. 004929.
<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004929>
- Dalla Vecchia E., Suvorova E.I., Maillard J., Bernier-Latmani R. Fe(III) reduction during pyruvate fermentation by *Desulfotomaculum reducens* strain MI-1 // Geobiology. 2014. V. 12. P. 48–61.
<https://doi.org/10.1111/gbi.12067>
- Gohl D.M., MacLean A., Hauge A., Becker A., Walek D., Beckman K.B. An optimized protocol for high-throughput amplicon-based microbiome profiling // Protoc. Exch. 2016.
<https://doi.org/10.1038/protex.2016.030>
- Han S., Tang R., Yang S., Xie C.J., Narsing Rao M.P., Rensing C., Liu G.H., Zhou S.G. *Geothrix oryzisoli* sp. nov., a ferric iron-reducing bacterium isolated from paddy soil // Antonie van Leeuwenhoek. 2023. V. 116. P. 477–486.
<https://doi.org/10.1007/s10482-023-01817-0>
- Hao C., Zhang H., Haas R., Bai Z., Zhang B. A novel community of acidophiles in an acid mine drainage sediment // World J. Microbiol. Biotechnol. 2007. V. 23. P. 15–21.
[https://doi.org/10.1016/s1001-0742\(07\)60074-6](https://doi.org/10.1016/s1001-0742(07)60074-6)
- Hugerth L.W., Wefer H.A., Lundin S., Jakobsson H.E., Lindberg M., Rodin S., Engstrand L., Andersson A.F. DegePrime, a program for degenerate primer design for broad-taxonomic-range PCR in microbial ecology studies // Appl. Environ. Microbiol. 2014. V. 80. P. 5116–5123.
<https://doi.org/10.1128/AEM.01403-14>
- Jin H.S., Dhanasingh I., Sung J.Y., La J.W., Lee Y., Lee E.M., Kang Y., Lee D.Y., Lee S.H., Lee D.W. The sulfur formation system mediating extracellular cysteine-cystine recycling in *Fervidobacterium islandicum* AW-1 is associated with keratin degradation // Microb. Biotechnol. 2021. V. 14. P. 938–952.
<https://doi.org/10.1111/1751-7915.13717>
- Kaksonen A.H., Spring S., Schumann P., Kroppenstedt R.M., Puhakka J.A. *Desulfurispora thermophila* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, spore-forming sulfate-reducer isolated from a sulfidogenic fluidized-bed reactor // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2007. V. 57. P. 1089–1094.
<https://doi.org/10.1099/ijms.0.64593-0>
- Kevbrin V.V., Zavarzin G.A. The influence of sulfur compounds on the growth of halophilic homoacetic bacterium *Acetohalobium arabaticum* // Microbiology (Moscow). 1992. V. 61. P. 563–571.
- Khomyakova M., Merkel A., Kopitsyn D., Slobodkin A. *Pelovirga terrestris* gen. nov., sp. nov., anaerobic,

- alkaliphilic, fumarate-, arsenate-, Fe(III)- and sulfur-reducing bacterium isolated from a terrestrial mud volcano // *Syst. Appl. Microbiol.* 2022a. V. 45. Art. 126304.
<https://doi.org/10.1016/j.syapm.2022.126304>
- Khomyakova M.A., Zavarzina D.G., Merkel A.Y., Klyukina A.A., Pikhiteva V.A., Gavrilov S.N., Slobodkin A.I. The first cultivated representatives of the actinobacterial lineage OPB41 isolated from subsurface environments constitute a novel order *Anaerosomatales* // *Front. Microbiol.* 2022b. V. 13. Art. 1047580.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1047580>
- Kleindienst S., Higgins S.A., Tsementzi D., Chen G., Konstantinidis K.T., Mack E.E., Löffler F.E. “*Candidatus Dichloromethanomonas elyunquensis*” gen. nov., sp. nov., a dichloromethane-degrading anaerobe of the *Peptococcaceae* family // *Syst. Appl. Microbiol.* 2017. V. 40. P. 150–159.
<https://doi.org/10.1016/j.syapm.2016.12.001>
- Li Y., Yang G., Yao S., Zhuang L. *Paradesulfobacterium ferrireducens* gen. nov., sp. nov., a Fe(III)-reducing bacterium from petroleum-contaminated soil and reclassification of *Desulfotobacterium aromaticivorans* as *Paradesulfobacterium aromaticivorans* comb. nov. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2021. V. 71.
<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005025>
- Marshall C.W., May H.D. Electrochemical evidence of direct electrode reduction by a thermophilic gram-positive bacterium, *Thermincola ferriacetica* // *Energy Environ. Sci.* 2021. V. 2. P. 699–705.
<https://doi.org/10.1039/b823237g>
- Merkel A.Y., Chernyh N.A., Pimenov N.V., Bonch-Osmolovskaya, E.A., Slobodkin A.I. Diversity and metabolic potential of the terrestrial mud volcano microbial community with a high abundance of Archaea mediating the anaerobic oxidation of methane // *Life (Basel)*. 2021. V. 1. Art. 953.
<https://doi.org/10.3390/life11090953>
- Nixon S.L., Bonsall E., Cockell C.S. Limitations of microbial iron reduction under extreme conditions // *FEMS Microbiol. Rev.* 2022. V. 46. Art. fuac033.
<https://doi.org/10.1093/femsre/fuac033>
- Ogg C.D., Patel B.K. *Thermotalea metallivorans* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, anaerobic bacterium from the Great Artesian Basin of Australia aquifer // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2009. V. 59. P. 964–971.
<https://doi.org/10.1099/ijms.0.004218-0>
- Otwell A.E., Callister S.J., Sherwood R.W., Zhang S., Goldman A.R., Smith R.D., Richardson R.E. Physiological and proteomic analyses of Fe(III)-reducing co-cultures of *Desulfotomaculum reducens* MI-1 and *Geobacter sulfurreducens* PCA // *Geobiology*. 2018. V. 16. P. 522–539.
<https://doi.org/10.1111/gbi.12295>
- Podosokorskaya O.A., Merkel A.Y., Kolganova T.V., Chernyh N.A., Miroshnichenko M.L., Bonch-Osmolovskaya E.A., Kublanov I.V. *Fervidobacterium riparium* sp. nov., a thermophilic anaerobic cellulolytic bacterium isolated from a hot spring // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2011. V. 61. P. 2697–2701.
<https://doi.org/10.1099/ijms.0.026070-0>
- Raposo P., Viver T., Albuquerque L., Froufe H., Barroso C., Egas C., Rosselló-Móra R., da Costa M.S. Transfer of *Meiothermus chliarophilus* (Tenreiro et al.1995) Nobre et al. 1996, *Meiothermus roseus* Ming et al. 2016, *Meiothermus terrae* Yu et al. 2014 and *Meiothermus timidus* Pires et al. 2005, to *Calidithermus* gen. nov., as *Calidithermus chliarophilus* comb. nov., *Calidithermus roseus* comb. nov., *Calidithermus terrae* comb. nov. and *Calidithermus timidus* comb. nov., respectively, and emended description of the genus *Meiothermus* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2019. V. 69. P. 1060–1069.
<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003270>
- Stookey L.L. Ferrozine—a new spectrophotometric reagent for iron // *Anal. Chem.* 1970. V. 42. P. 779–781.
- Sylvan J.B., Toner B.M., Edwards K.J. Life and death of deep-sea vents: bacterial diversity and ecosystem succession on inactive hydrothermal sulfides // *MBio*. 2012. V. 3. Art. e00279–11.
<https://doi.org/10.1128/mBio.00279-11>
- Tan S., Liu J., Fang Y., Hedlund B.P., Lian Z.H., Huang L.Y., Li J.T., Huang L.N., Li W.J., Jiang H.C., Dong H.L., Shu W.S. Insights into ecological role of a new deltaproteobacterial order *Candidatus Acidulodesulfobacterales* by metagenomics and metatranscriptomics // *ISME J.* 2019. V. 13. P. 2044–2057.
<https://doi.org/10.1038/s41396-019-0415-y>
- Vuillemin A., Horn F., Friese A., Winkel M., Alawi M., Wagner D., Henny C., Orsi W.D., Crowe S.A., Kallmeyer J. Metabolic potential of microbial communities from ferruginous sediments // *Environ. Microbiol.* 2018. V. 20. P. 4297–4313.
<https://doi.org/10.1111/1462-2920.14343>
- Waite D.W., Chuvochina M., Pelikan C., Parks D.H., Yilmaz P., Wagner M., Loy A., Naganuma T., Nakai R., Whitman W.B., Hahn M.W., Kuever J., Hugenholtz P. Proposal to reclassify the proteobacterial classes *Deltaproteobacteria* and *Oligoflexia*, and the phylum *Thermodesulfobacteria* into four phyla reflecting major functional capabilities // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2020. V. 70. P. 5972–6016.
<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004213>
- Wolin E.A., Wolin M.J., Wolfe R.S. Formation of methane by bacterial extracts // *J. Biol. Chem.* 1963. V. 238. P. 2882–2888.
- Yarza P., Yilmaz P., Pruesse E., Glöckner F.O., Ludwig W., Schleifer K.H., Whitman W.B., Euzéby J., Amann R., Rosselló-Móra R. Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences // *Nat. Rev. Microbiol.* 2014. V. 12. P. 635–645.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro3330>
- Yoshida H., Yamamoto K., Murakami Y., Katsuta N., Hayashi, T., Naganuma T. The development of Fe-nodules surrounding biological material mediated by microorganisms // *Environ. Geol.* 2008. V. 55. P. 1363–1374.

- Zakharyuk A.G., Kopitsyn D.S., Suzina N.E., Shcherbakova V. *Pelosinus baikalensis* sp. nov., an iron-reducing bacterium isolated from a cold freshwater lake // Microbiology (Moscow). 2023. V. 92. P. 137–145. <https://doi.org/10.1134/S0026261722602913>
- Zavarzina D.G., Kolganova T.V., Boulygina E.S., Kostrikina N.A., Tourova T.P., Zavarzin G.A. *Geoalkalibacter ferrihydriticus* gen. nov. sp. nov., the first alkaliphilic representative of the family *Geobacteraceae*, isolated from a soda lake // Microbiology (Moscow). 2006. V. 75. P. 673–682. <https://doi.org/10.1134/S0026261706060099>
- Zavarzina D.G., Prokofeva M.I., Pikhtereva V.A., Klyukina A.A., Maslov A.A., Merkel A.Y., Gavrilov S.N. *Deferrivibrio essentukiensis* sp. nov., gen. nov., a representative of *Deferrivibrionaceae* fam. nov., isolated from the subsurface aquifer of Caucasian Mineral Drinking Waters // Microbiology (Moscow). 2022. V. 91. P. 143–159. <https://doi.org/10.1134/S0026261722020114>
- Zavarzina D.G., Sokolova T.G., Tourova T.P., Chernyh N.A., Kostrikina N.A., Bonch-Osmolovskaya E.A. *Thermincola ferriacetica* sp. nov., a new anaerobic, thermophilic, facultatively chemolithoautotrophic bacterium capable of dissimilatory Fe(III) reduction // Extremophiles. 2007. V. 11. P. 1–7. <https://doi.org/10.1007/s00792-006-0004-7>
- Zavarzina D.G., Maslov A.A., Merkel A.Y., Kharitonova N.A., Klyukina A.A., Baranovskaya E.I., Baydariko E.A., Potapov E.G., Zayulina K.S., Bychkov A.Y., Chernyh N.A., Bonch-Osmolovskaya E.A., Gavrilov S.N. Shadows of the past – analogs of precambrian microbial communities formed *de novo* in Caucasian Mineral Water Aquifers // mBio. 2024. under revision.
- Zhang X., Tu B., Dai L.R., Lawson P.A., Zheng Z.Z., Liu L.Y., Deng Y., Zhang H., Cheng L. *Petroclostridium xylanilyticum* gen. nov., sp. nov., a xylan-degrading bacterium isolated from an oilfield, and reclassification of clostridial cluster III members into four novel genera in a new *Hungateiclostridiaceae* fam. nov. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2018. V. 68. P. 3197–3211. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002966>
- Zhang X., Yang G., Yao S., Zhuang L. *Shewanella shenzhenensis* sp. nov., a novel Fe(III)-reducing bacterium with abundant possible cytochrome genes, isolated from mangrove sediment // Antonie van Leeuwenhoek. 2022. V. 115. P. 1245–1252. <https://doi.org/10.1007/s10482-022-01763-3>

EXPERIMENTAL ARTICLES

Alkalo-Thermophilic Iron-Reducing Bacteria of the Goryachinskoe Thermal Water Deposit

D. G. Zavarzina^{1, *}, A. A. Klyukina¹, A. Yu. Merkel¹, T. A. Maslova², A. A. Maslov³

¹Winogradsky Institute of Microbiology, FRC “Fundamentals for Biotechnology” of the RA Sciences, Moscow, 119071, Russia

²Faculty of Chemical Engineering and Ecology, Gubkin Russian State University of Oil and Gas, Moscow, 119991, Russia

³Geological Faculty, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119234, Russia

*e-mail: zavarzinatwo@mail.ru

A study of the metabolic group of iron-reducing prokaryotes that use the weakly crystalline mineral ferrihydrite as an electron acceptor has revealed its widespread distribution on Earth. However, the ability of iron reducers to develop in polyextreme conditions – at elevated pH values and temperatures – has not yet been demonstrated. To prove the existence of alkalithermophilic iron reducers, we studied water and sediment samples from the Goryachinsk nitrogen springs. These springs are confined to young tectonic faults of the Baikal rift zone, and their waters are characterized by low mineralization, high pH (8.8–9.2) and temperature (53–55°C). By adding synthesized ferrihydrite to water and bottom sediment samples from the Goryachinsk springs and incubating them under anaerobic conditions at temperatures of 50 and 55°C, enrichment cultures were obtained that reduce this mineral. Profiling of water and sediment samples and primary enrichment cultures by the 16S rRNA gene revealed their high phylogenetic diversity, represented almost exclusively by bacterial taxa. Further transfers with ferrihydrite and organic acids or hydrogen added as an electron donor allowed us to obtain stable enrichment cultures of organo- and lithotrophic alkalithermophilic iron reducers. From 30 to 50% of their total representation were representatives of the genus *Parvivirga*, one of the first cultivated representatives of the OPB41 group (now the order *Anaerosomatales*) of the phylum *Actinomycetota*.

Keywords: extremophilic prokaryotes, alkalithermophilic iron reducers, underground biosphere, hydrothermal vents, Baikal, *Parvivirga*

УДК 579.26:575.174

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА БАКТЕРИОПЛАНКТОНА ВОДОЕМОВ БАСЕЙНА КУЙБЫШЕВСКОГО ВОДОХРАНИЛИЩА В ПЕРИОД МАССОВОГО РАЗВИТИЯ ЦИАНОБАКТЕРИЙ

© 2024 г. М. В. Уманская^{а, *}, М. Ю. Горбунов^а

^аСамарский федеральный исследовательский центр РАН, Институт экологии Волжского бассейна РАН, Тольятти, 445003, Россия

*e-mail: mvumansk67@gmail.com

Поступила в редакцию 24.04.2024 г.

После доработки 08.06.2024 г.

Принята к публикации 08.06.2024 г.

Филогенетическая структура бактериопланктона залива Уса и прилегающей акватории Куйбышевского водохранилища, а также трех гидрологически связанных городских озер системы Кабан (г. Казань) была проанализирована с использованием результатов высокопроизводительного секвенирования гипервариабельной области V3–V4 гена 16S рибосомальной РНК. В исследованных водных объектах наблюдалось массовое развитие цианобактерий, в которых преобладали представители филогенетических линий *Aphanizomenon/Dolichospermum* и *Cyanobium*, а также рода *Planktothrix*. В гетеротрофном бактериопланктоне всех станций преобладали альфа- и бета-протеобактерии. Его значительную часть составляли миксотрофные бактерии с родопсиновым типом фотосинтеза (например, “*Ca. Fonsibacter*”, “*Ca. Nanopelagicus*”, “*Ca. Planctophila*”). Характерной особенностью исследованных образцов является высокая доля бактерий PVC-суперфилиума, особенно *Planctomycetota*. Была проведена оценка зависимости состава и структуры бактериопланктона от состава доминирующих цианобактериальных комплексов и выявлены группировки гетеротрофных бактерий, ассоциированные с различными цианобактериями. Наиболее многочисленная группировка формируется вокруг *Aphanizomenon–Dolichospermum–Microcystis* и в основном состоит из бактерий, входящих в фикосферу колониальных цианобактерий, а также представителей PVC-суперфилиума. Две небольшие группировки формируются вокруг *Limnothrix redekei* и *Cyanobium rubescens* и состоят из типичных планктонных бактерий, принадлежащих в основном к отряду *Flavobacteriales* и семейству *Nanopelagiaceae*.

Ключевые слова: пресные водоемы, бактериопланктон, метабаркодинг, 16S рРНК, цветение цианобактерий

DOI: 10.31857/S0026365624060139

Бактерии являются одними из древнейших обитателей Земли, распространены повсеместно, участвуют в круговороте вещества и энергии в качестве первичных продуцентов, деструкторов органического вещества и ксенобиотиков. Большая их часть из природных местообитаний практически не поддается культивированию в лабораторных условиях и не имеет выраженных морфологических признаков, по которым можно определить их таксономическую принадлежность. Однако применение молекулярных методов, таких как ПЦР-амплификация гена 16S рРНК и секвенирование природной ДНК, позволило получить первую информацию о таксономическом составе

“некультивируемого большинства” природных бактериальных сообществ (Amann et al., 1995; Zwart et al., 2002; Rappé, Giovannoni, 2003) и обнаружить не только несколько доминирующих, но и огромное число минорных и малочисленных видов, включая “темную микробную материю” (Galperin, 2007), что произвело своего рода революцию в микробной экологии.

Одной из групп “типичных пресноводных бактерий” являются цианобактерии, единственная группа царства бактерий, способная к оксигенному фотосинтезу. Во многих внутренних водоемах, особенно в подверженных интенсивному антропогенному воздействию, их развитие в летний

период часто достигает масштабов цветений, видимых невооруженным взглядом (Huisman et al., 2018). В периоды цветения в результате физиологической активности цианобактерий, их лизиса и отмирания в водную среду выделяются значительные количества органических соединений, в т.ч. специфических вторичных метаболитов. Это формирует широкие экологические ниши для потребляющих эти соединения видов гетеротрофного бактериопланктона и других гетеротрофных планктонных организмов. Поскольку многие органические соединения, выделяемые в период цветений, таксон-специфичны, гипотеза о влиянии цветений разных видов цианобактерий на состав и структуру бактериопланктона высказывается многими авторами (например, Eiler, Bertilsson, 2004).

Цианобактериальные цветения широко распространены на территории всей Европы, в том числе на территории бассейна ее крупнейшей реки, Волги. Они обычны как в водохранилищах Волжского каскада, так и во многих озерах ее бассейна. Долговременные исследования цветения цианобактерий на территории Волжского бассейна, проведенные классическими “альгологическими” методами, позволили охарактеризовать их состав, типичные доминирующие виды и закономерности сезонной сукцессии, как в Куйбышевском водохранилище, так и в ряде водоемов на территории его водосборного бассейна (Паутова, Номоконова, 1994; Биоразнообразие и типология..., 2009; Горохова, 2012; Корнева, 2015).

Исследования бактериопланктона также проводились исключительно “классическими” методами. Имеющиеся в базе данных NCBI результаты высокопроизводительного секвенирования бактериопланктона водоемов бассейна Волги были ограничены единственной пробой с неизвестным временем и местом отбора (SRR11126548), а также исследованиями трех озер системы Кабан (г. Казань) (Фролова и соавт., 2019), гидрологически связанных с рекой Казанкой, впадающей в Куйбышевское водохранилище.

В июне 2021 года мы провели исследование филогенетического состава бактериопланктона методом метабаркодирования гипервариабильного участка V3–V4 гена 16S рРНК на шести станциях Усинского залива Куйбышевского водохранилища и прилегающей части его основной акватории, впервые получив данные о составе и разнообразии бактериопланктона акватории Куйбышевского водохранилища.

Цель данной работы — провести анализ структуры бактериопланктона исследованного участка Куйбышевского водохранилища и сравнить ее с имеющимися данными об озерах системы Кабан (г. Казань) для оценки ее вариабельности в зависимости от состава доминирующих комплексов цианобактерий.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Район исследований. Куйбышевское водохранилище — крупнейшее в каскаде водохранилищ Волги. Водохранилище делится на несколько плесов, нижним из которых является Приплотинный плес площадью 398 км² (Куйбышевское водохранилище..., 2008). Справа к нему прилегает глубоко врезаемый Усинский залив общей длиной около 50 км и шириной 0.5–3.5 км, образованный затопленным участком долины реки Уса. Куйбышевское водохранилище является мезотрофно-эвтрофным, имеет умеренно минерализованную воду кальций-гидрокарбонатного типа, слабо выраженную стратификацию и относительно небольшой придонный кислородный дефицит (Куйбышевское водохранилище, 2008). Для него характерны регулярные и продолжительные цианобактериальные цветения (Паутова, Номоконова, 1994).

Верхний, Средний и Нижний Кабан — три озера на территории г. Казани, образующие единую систему и гидрологически связанные с р. Казанка у ее впадения в р. Волгу. Площади озер — 0.23, 1.38 и 0.43 км², максимальные глубины 13, 17 и 16 м. Озера системы Кабан имеют воду с повышенной минерализацией кальций-сульфатного типа, стратифицированы в летний период с гипоксическим придонным слоем (Биоразнообразие и типология..., 2009). Озера сильно антропогенно загрязнены и эвтрофированы, на них ежегодно наблюдаются интенсивные цианобактериальные цветения (Бариева и соавт., 2005; Горохова, 2014).

Отбор проб и высокопроизводительное секвенирование. Интегральные пробы воды на акватории Усинского залива и прилегающем участке Приплотинного плеса Куйбышевского водохранилища на шести станциях были отобраны в период 30.06.–05.07.2021 г. в стерильные пластиковые бутылки объемом 0.5 л. Дальнейшую обработку проб, выделение ДНК, подготовку ампликонных библиотек и парноконцевое секвенирование проводили, как описано в статье (Уманская и соавт., 2023а), но для амплификации вариабельного участка V3–V4 гена 16S рРНК использовали праймеры 341F (5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3') и 805R (5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3') (Herlemann et al., 2011) со стандартными адаптерами Illumina. Полученные последовательности депонировали в NCBI Sequence Read Archive (биопроjekt PRJNA825541, номера SRX14816844-45 и SRX14816848-51).

Для сравнения с полученными данными были дополнительно использованы результаты секвенирования проб планктона, отобранных в июле 2016 и сентябре 2017 г. из озер системы Кабан, депонированные в NCBI под номерами SRR7510928;

SRR7510929; SRR7510984; SRR7516240; SRR7516245 и SRR7516469. Эти исследования были выполнены коллективом исследователей Казанского государственного университета; методы отбора проб, их подготовки и высокопроизводительного секвенирования приведены в монографии Фроловой и соавт. (2019). Как и в нашей работе, для подготовки библиотек авторы использовали праймеры 341F и 805R (Herlemann et al., 2011). Даты и места отбора всех 12 проб представлены в табл. 1.

Биоинформатическая обработка. Для получения материалов, пригодных для проведения сравнительного анализа, все 12 ампликонных библиотек были обработаны единообразно с помощью пакета USEARCH (Edgar, 2010) со стандартными параметрами, если не указано другое. Поскольку качество обратных чтений проб из озер системы Кабан оказалось низким, их последовательности были обрезаны справа до длины 220 нк, а прямые — до длины 280 нк с помощью опции -fastx_truncate. Сырые риды из Куйбышевского водохранилища и Усинского залива были использованы без предварительной обрезки. Парные чтения были объединены; полученные объединенные последовательности ориентированы с использованием RPB training set v.18 в качестве образца, и последовательности с неопознанной ориентацией (<0.2%) отброшены. Из оставшихся последовательностей были удалены участки, соответствующие прямо-му (17 нк) и обратному (21 нк) праймерам. Затем

были удалены последовательности с ожидаемой общей ошибкой >1, а также имеющие длину менее 350 нуклеотидов. Полученная библиотека была дереплицирована с помощью команды usearch -fastx_uniques и кластеризована в отдельные оперативные таксономические единицы (ОТЕ) с порогом сходства 97% с помощью команды usearch -cluster_otus со стандартными параметрами. В результате было получено 4500 ОТЕ. Обратный поиск позволил отождествить с полученными ОТЕ 88.2% всех неотфильтрованных объединенных последовательностей.

Из общего списка ОТЕ были исключены синглтоны и даблтоны, а оставшиеся ОТЕ дополнительно сканированы на химерные последовательности с помощью online сервиса Decifer; потенциально химерные последовательности были отбракованы. Оставшиеся последовательности были классифицированы с помощью online сервисов arb-silva (ACT, база данных Silva v. 138.1) и NBC RDP (база данных RDP v. 18). Были удалены все последовательности, отнесенные к археям, хлоропластам и митохондриям. Кроме того, мы исключили из библиотеки ОТЕ с последовательностью, полностью идентичной V3–V4-участку *E. coli*, которая в значительных количествах присутствовала в библиотеках из озер системы Кабан в 2017 г. Поскольку других признаков фекального загрязнения воды в полученных библиотеках не было обнаружено, присутствие этой ОТЕ, было, вероятно, связано с лабораторным загрязнением.

Таблица 1. Показатели разнообразия в проанализированных пробах

Проба			Число ридов	Число ОТЕ	Индекс		
Код	Место отбора	Дата			Шеннона H ₂ (двоичный)	Выровненности Пиелу (E)	Обратный Симпсона (1/D)
ST3	Река Уса, у с. Шигоны	05.07.2021	56631	1849	8.10	0.746	58.2
ST4	Усинский залив, пос. Миронов	30.06.2021	89324	1144	6.15	0.606	20.5
ST5	Усинский залив, Междуреченск	30.06.2021	84009	1032	6.36	0.635	24.5
ST6	Устье Усинского залива	30.06.2021	95390	888	6.57	0.670	36.1
ST7	Куйбышевское вдхр., ниже устья залива	05.07.2021	82838	872	6.53	0.669	30.7
ST8	Куйбышевское вдхр., у с. Березовка	05.07.2021	63020	713	6.69	0.706	44.6
UK1	Оз. Верхний Кабан	20.09.2016	167977	1071	5.73	0.569	17.7
UK3	Оз. Верхний Кабан	10.07.2017	97997	740	6.69	0.702	41.8
MK1	Оз. Средний Кабан	20.09.2016	37049	645	4.57	0.490	5.84
MK3	Оз. Средний Кабан	10.07.2017	67465	639	4.45	0.477	4.30
LK1	Оз. Нижний Кабан	20.09.2016	28295	370	2.42	0.284	1.84
LK2	Оз. Нижний Кабан	10.07.2017	104163	554	3.37	0.370	2.63
Вся библиотека			974158	3031	7.06	0.611	30.9

Статистическая обработка и визуализация данных проведены с помощью программ Excel 2013, PAST v4.16 и пакетов Vegan и Phyloseq в программной среде R.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Общая характеристика филогенетической структуры бактериопланктона. В результате анализа в 12 исследованных пробах было выделено 3031 ОТЕ,

объединяющих 974158 последовательностей. Согласно классификации Silva, в объединенной библиотеке присутствовали представители 34 филумов и филумов-кандидатов. Три из них, *Proteobacteria* s.str., *Bacteroidota* s.l. и *Verrucomicrobiota* s.l., составляли в сумме более 50% всех ОТЕ. Таксономическая структура отдельных проб (доли числа обнаруженных ОТЕ, принадлежащих к разным филумам) была относительно близкой (рис. 1а).

В то же время доля последовательностей, принадлежащих к тем или иным филумам (рис. 1б),

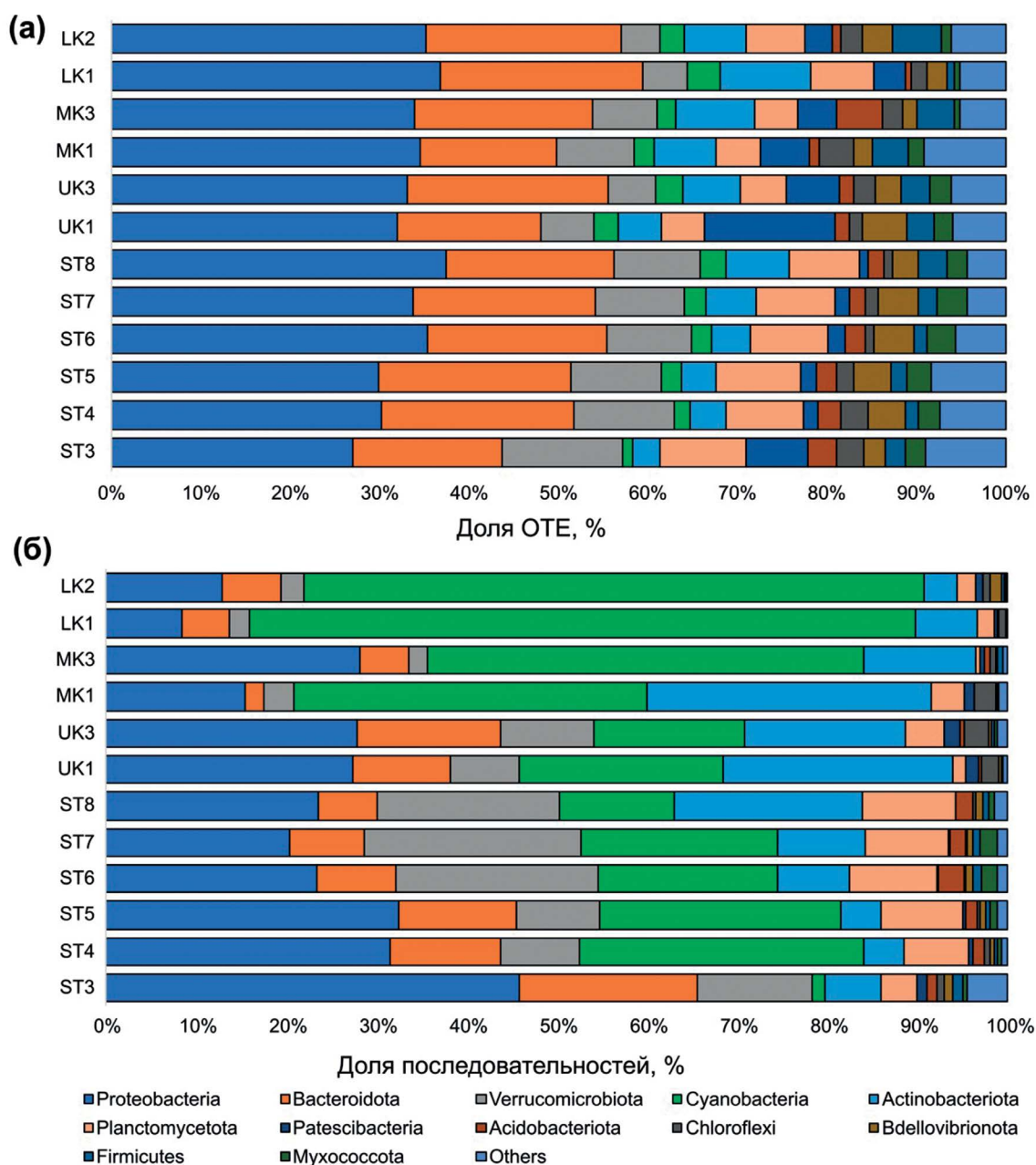


Рис. 1. Таксономическая структура отдельных проб: а — доли числа обнаруженных ОТЕ, принадлежащих к разным филумам; б — доля последовательностей, принадлежащих к разным филумам.

существенно различалась от пробы к пробе. Доля шести филумов превышала 10% хотя бы в одной пробе: *Cyanobacteriota* и *Proteobacteria* – в 11 из 12 проб каждый, *Actinomycetota*, *Verrucomicrobiota* и *Bacteroidota* – в пяти пробах, и *Planctomycetota* – в единственной пробе, ST8.

Величины индекса разнообразия Шеннона в пробах из Куйбышевского водохранилища и Усинского залива колебались в пределах 6.15–6.7; в пробах из озер Средний и особенно Нижний Кабан он был существенно ниже (~4.5 и 2.4–3.4 соответственно; табл. 1).

На речной станции ST3 разнообразие было наибольшим, а в оз. В. Кабан – промежуточным между водохранилищем и двумя остальными озерами. Наблюдается высокая корреляция ($R^2 = 0.9515$) между индексом Шеннона и интенсивностью развития цианобактерий (Суа/Вас, см. табл. 2), и несколько меньшая степенная корреляция между $1/D$ и Суа/Вас ($R^2 = 0.877$).

Кластерный анализ сообществ разных проб, проведенный с использованием количественной меры различия Брея–Куртиса и расстояния

Хеллингера, позволил выделить четыре кластера: 1 – речной (проба ST3), 2 – зону залива и водохранилище (пробы ST4–ST8) (с заметным отличием ST8 от остальных), 3 – оз. С. и Н. Кабан (пробы МК1, МК3, ЛК1 и ЛК2) и 4 – оз. В. Кабан (пробы УК1 и УК3), хотя порядок объединения этих кластеров зависел от использованной меры различия и метода кластеризации (рис. 2).

Цианобактерии. Фототрофные цианобактерии, составлявшие лишь очень небольшую долю обнаруженных ОТЕ (39 ОТЕ в объединенной библиотеке и 11–21 ОТЕ в отдельных пробах), составляли, за исключением речной ST3, существенную, а в оз. Н. Кабан даже преобладающую часть всех последовательностей бактерий (табл. 2).

Поскольку по мере усиления развития цианобактерий численность гетеротрофного планктона также возрастает или как минимум не снижается, эти данные, вероятно, могут служить оценкой интенсивности развития цианобактерий. Судя по величинам соотношения численностей ридов *Oxyphotobacteria* и хлоропластов эукариотических водорослей (табл. 2), цианобактерии доминировали

Таблица 2. Индикаторы разнообразия и интенсивности развития фототрофных цианобактерий. Суа/(Суа + Chl) – доля *Oxyphotobacteria* в суммарном количестве последовательностей *Oxyphotobacteria* и хлоропластов; Суа/Вас – доля цианобактерий в суммарном количестве последовательностей бактерий

Код пробы	ST3	ST4	ST5	ST6	ST7	ST8	UK1	UK3	MK1	MK3	LK1	LK2
Число ОТЕ	16	21	23	23	22	20	25	25	13	18	12	14
Суа/(Суа + Chl)	13.5	82.4	87.8	92.4	88.7	64.1	99.7	96.8	98.1	98.2	91.3	84.3
Суа/Вас	1.4	31.5	26.9	20.0	21.7	12.7	22.6	16.8	39.2	48.4	73.8	68.8
Индекс Бергера–Паркера	0.79	0.52	0.57	0.53	0.57	0.47	0.41	0.17	0.99	0.97	0.99	0.90
Индекс Шеннона (двоичн.)	1.43	1.68	1.83	1.76	1.69	2.55	2.82	3.65	0.06	0.23	0.04	0.59

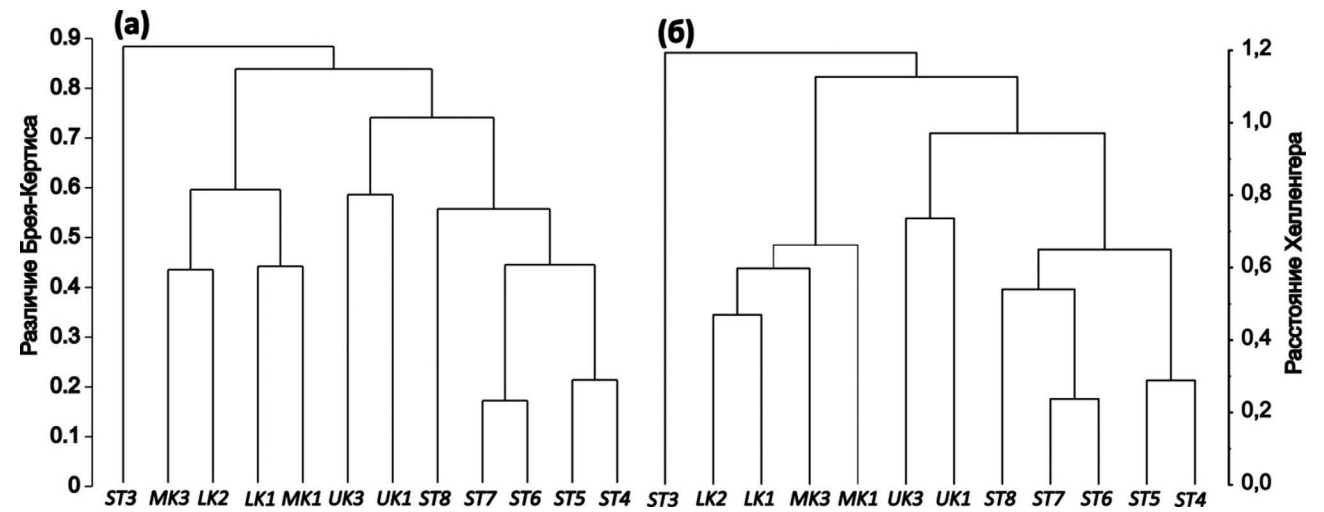


Рис. 2. Кластерный анализ различий в структуре сообществ бактерий исследуемых проб с помощью метода UPGA; а – меры различия Брея–Куртиса между векторами долей численностей ОТЕ; б – расстояния Хеллингера.

в фитопланктоне всех станций, за исключением ST3. Таким образом, цветение цианобактерий наблюдалось в 11 пробах из 12.

Развитие цианобактерий в исследованных пробах было очень контрастным. В озерах С. и Н. Кабан доля цианобактерий составляла более 39% всех бактериальных последовательностей; в оз. В. Кабан, Куйбышевском водохранилище и Усинском заливе она составляла от 12 до 30%, а в реке Уса — менее 1.4% (табл. 2). При наибольшем количестве цианобактерий, озера С. и Н. Кабан отличались их наименьшим разнообразием и наибольшим доминированием (табл. 2). В них присутствовали 11–13 ОТЕ, причем очень сильно (от 87.5 до >99.5% всех цианобактерий) доминировала единственная ОТЕ, KRB-1, с последовательностью, идентичной *Planktothrix agardhii* (*Phormidiaceae: Oscillatoriales*) (рис. 3).

Напротив, в оз. В. Кабан доминирование было низким, а число обнаруженных ОТЕ наибольшим — 21 и 19, в пробах 2016 и 2017 г. соответственно. Состав цианобактерий в эти два года заметно различался (рис. 3). В 2016 г. здесь доминировал

KRB-9, входящий в комплекс *Limnothrix planctonica* (*Limnothrichaceae: Limnothrichales* согласно классификации Silva; порядок, семейство и род CACIAM-69d в GTDB). В 2017 г. *L. planctonica* практически выпал из состава планктона, но в близких количествах развивались три ОТЕ: KRB-44 (*Cyanobium rubescens* (*Prochlorococcaceae: Synechococcales*)), KRB-12 (*Limnothrix redekei/Pseudanabaena*-кластер (*Pseudanabaenaceae: Pseudanabaenales*)) и KRB-40 (сем. *Nodosilineaceae* Strunecký and Mareš, 2023), составлявшие каждая 19–22% всех цианобактериальных последовательностей (рис. 3). В оба года в этом озере в заметных количествах (10–13%) присутствовал *Aphanizomenon flos-aquae*, а в 2017 г. и другие представители *Nostocales: Cuspidothrix, Anabaenopsis, Raphidiopsis* и *Chrysoosporum*.

В пробах из Усинского залива и Куйбышевского водохранилища наблюдалась промежуточная ситуация: 13–15 ОТЕ и доминирование на уровне 47–57%. Доминирующая ОТЕ (KRB-3) имеет последовательность, идентичную *Aphanizomenon flos-aquae*. И, наконец, на речной станции, единственной, где последовательности эукариотических

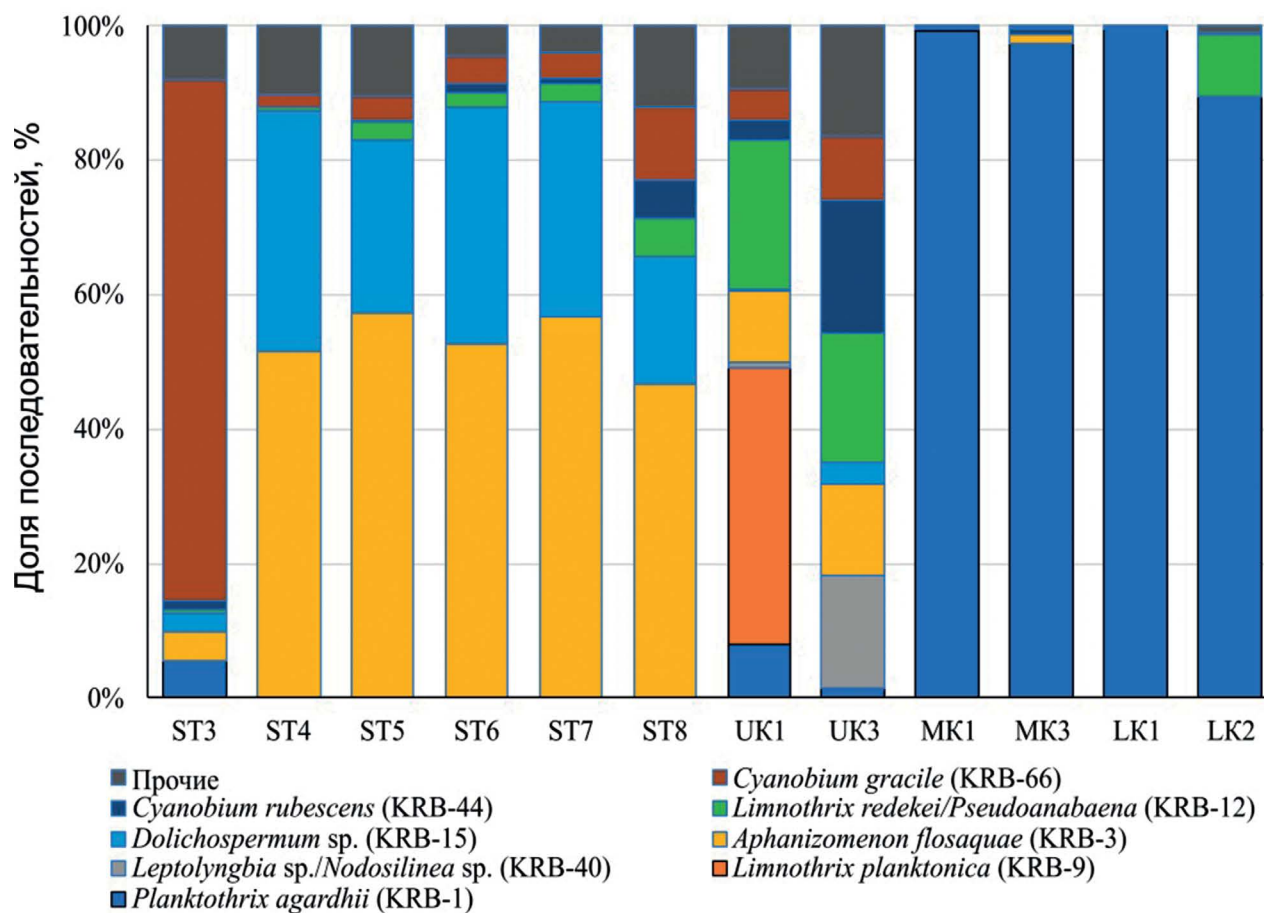


Рис. 3. Структура основных ОТЕ цианобактерий в исследованных пробах. “Прочие” — ОТЕ, ни в одной из проб не достигавшие 1% общей численности цианобактерий.

хлоропластов преобладали над цианобактериями, последние были представлены почти исключительно филоотипом *Cyanobium* из подгруппы *Cyanobium gracile* PCC6307 (рис. 3).

В целом, в полученном списке ОТЕ цианобактерий преобладали представители сем. *Aphanizomenonaceae* (9 ОТЕ), представленные, в порядке убывания числа последовательностей, родами *Aphanizomenon*, *Dolichospermum*, *Cuspidothrix*, *Anabaenopsis*, *Raphidiopsis* и *Chrysosporum*, причем три последних были отмечены только в оз. В. Кабан. Пять ОТЕ принадлежали к *Cyanobium*-кластеру, четыре — к роду *Chaemesiphon*, и три — к сем. *Nodosilineaceae*. Интересно также обнаружение в оз. Н. Кабан ОТЕ, идентичной по последовательности *Prochlorothrix hollandica* PCC 9006^T (вероятно, это первое обнаружение этого рода в Волжском бассейне), а в р. Уса — недавно описанной из Ладожского озера *Altericista lacusladoga* Averina et al., 2021.

Разнообразие цианобактерий, оцениваемое по индексу Шеннона, было очень низким. В пробах из оз. С. и Н. Кабан оно не превышало 0.4; в пробах из р. Уса, Усинского залива и большей части Куйбышевского водохранилища колебалось в пределах 1–1.25 и лишь в пробах ST8 и из оз. В. Кабан составляло 1.65–2.18. При этом за исключением речной станции, величина индекса Шеннона для цианобактерий в лотических пробах обратно коррелировала с их процентным вкладом в число последовательностей и поэтому оказывала очень высокое влияние на общее разнообразие сообщества.

Гетеротрофные бактерии. Из дальнейшего анализа исключены 39 ОТЕ, принадлежащих к *Cyanobacteria* s.str., т.е. к классу *Cyanobacteriia* [= *Oxyphotobacteria*], но не представители двух известных сегодня нефототрофных классов филума *Cyanobacteria*, *Sericytochromatia* и *Vampirivibrionia* (= *Melainabacteria*), часто рассматриваемые как самостоятельные филумы. Все эти ОТЕ можно определить как гетеротрофные, учитывая, однако, что в их составе присутствуют многочисленные миксотрофные формы.

В составе гетеротрофного бактериопланктона всех проб преобладают α - и β -протеобактерии; доля γ -протеобактерий мала, и, за исключением проб ST3 и МК3, не превышает 5% от общей численности (рис. 4).

Намного более существенный вклад вносят актинобактерии, в основном класс *Actinobacteriia*, однако на станциях озер системы Кабан, особенно летом 2016 г., заметную часть составляют и *Acidimicrobiia*. Велик также вклад *Verrucomicrobiota*, особенно на ST6–ST8 акватории Куйбышевского водохранилища. Среди других филумов можно отметить также *Planctomycetota*, особенно класс *Planctomycetia*, доля которых на станциях Усинского залива и Куйбышевского водохранилища приближается к 10%. Значительно и суммарное обилие

Bacteroidetes s.str., но оно в большей или меньшей степени распределено по пяти классам этого филума, каждый из которых достигает заметных количеств, >5%, только в одной–двух пробах, и только *Flavobacteriia* — в четырех (рис. 4). Остальные классы имеют еще меньшее значение: так, доля *Blastocatellula* (*Acidobacteriota*) и *Poliangia* (*Mixococcota*) превышает 1% на станциях водохранилища и залива, но они почти отсутствуют в р. Уса и озерах системы Кабан; распределение *Anaerolineae* (*Chloroflexota*) почти противоположно. *Oligoflexia* (*Bdellovibrionota*), составляющие около 3% последовательностей в пробе LK3, минорны во всех остальных пробах. В вариации долей *Phicisphaerae* (*Planctomycetota*) и *Vampirovibrionota* (= *Melainabacteriia*, *Cyanobacteria*) не наблюдается очевидной закономерности (рис. 4).

Доминирующие ОТЕ гетеротрофных бактерий. В качестве доминирующих мы рассматриваем ОТЕ, доля которых в общем количестве нецианобактериальных последовательностей по крайней мере в одной из проб превышает 1%. Общее число таких ОТЕ составило 84, причем лишь 27 из них присутствуют во всех пробах, и ни в одной из проб не обнаружены все доминирующие ОТЕ. В сумме доминирующие ОТЕ составляют не менее 60% всех последовательностей, за исключением пробы ST3, где их сумма составила менее 41%. Только у одной ОТЕ, KRB-4, относительная численность превышает 1% во всех пробах, но 15 из них имеют среднюю относительную численность более 1%. Таксономическая принадлежность этих ОТЕ по классификатору Silva и наиболее близкие последовательности, определенные до вида, в базе данных NT NCBI показаны в табл. 3.

В ряде случаев сходство выделенных нами ОТЕ с ближайшим по последовательности валидным видом или видом-кандидатом составляет <99%. Однако в этих случаях в базе данных NCBI и базе геномов (GTDB) присутствуют последовательности 16S рРНК некультивируемых клонов, выделенных из природной среды с почти полным сходством (табл. 4).

Таксономически в составе доминантов преобладают протеобактерии (25 ОТЕ, в т.ч. 11 α - и 12 β -протеобактерий (*Burkholderiales*). За ними следуют *Verrucomicrobiota* (16 ОТЕ), *Bacteroidetes* (15 ОТЕ), *Actinobacteria* (11) и *Planctomycetota* (8). *Vampirivibrionota* представлены 3 ОТЕ, *Patescibacteria* — 2, *Acidobacteriota*, *Kapabacteria*, *Oligoflexia* и *Chloroflexota* — по единственной ОТЕ. Большинство доминирующих актинобактерий входят в отр. *Ca. Nanopelagicales* (6 ОТЕ) и сем. *Ilumatobacteraceae* (отр. *Acidimicrobiales*, 4 ОТЕ), еще одна ОТЕ принадлежит к Luna-кластеру в сем. *Microbacteriaceae*. Семь из 15 ОТЕ *Bacteroidetes* принадлежат к отр. *Flavobacteriales*, причем пять из них — к р. *Flavobacterium*; еще четыре к отр. *Chitinophagales* и по две — к *Cytophagales* и *Sphingobacteriales*.

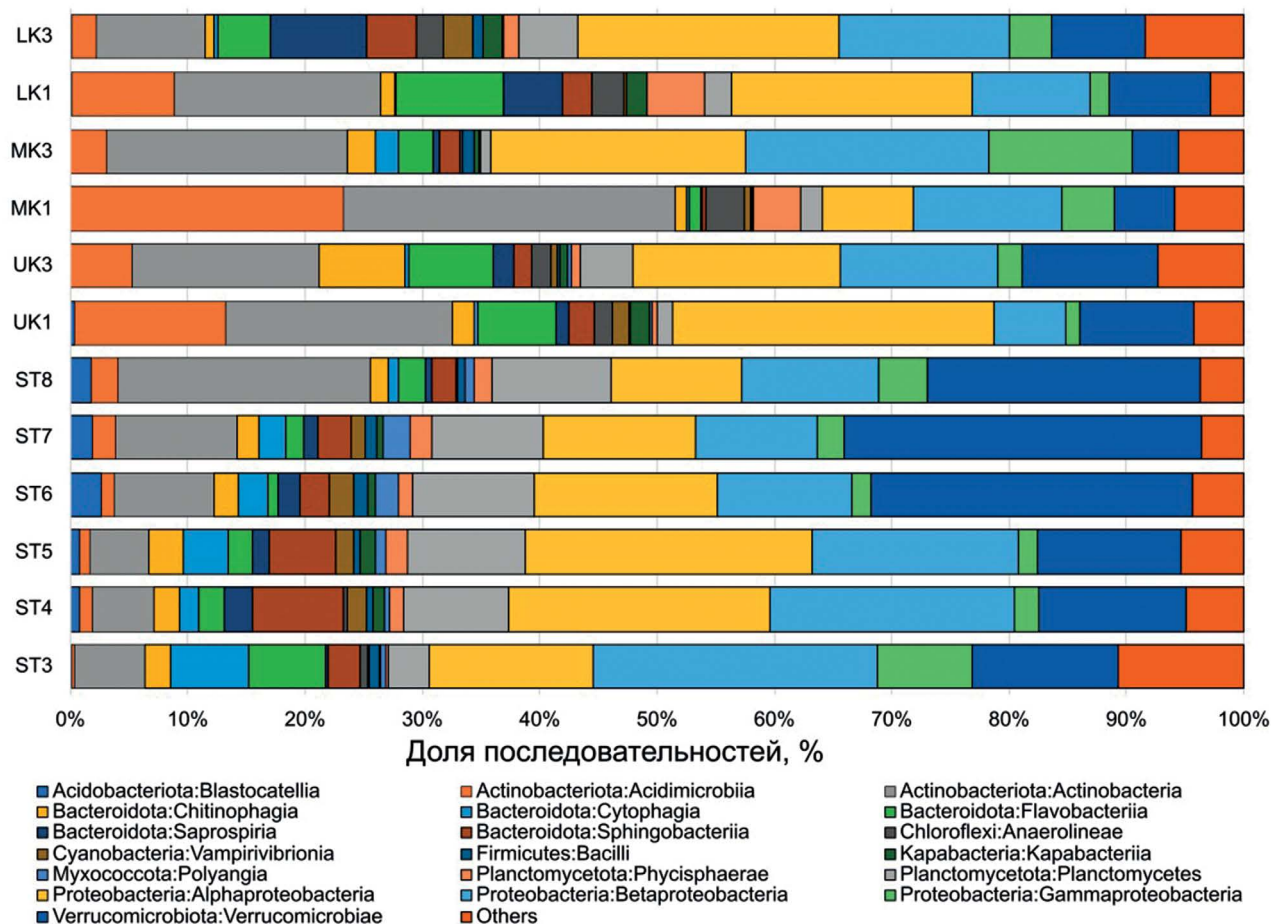


Рис. 4. Таксономическая структура гетеротрофного бактериопланктона в отдельных пробах на уровне классов: доля последовательностей, принадлежащих к разным таксонам.

Половина доминирующих ОТЕ в типе *Planctomycetota* принадлежит к типовому сем. *Planctomycetaceae*. ОТЕ KRB-38, очень отдаленно сходная с *Fuerstiella marisgermanici* NH11 (*Planctomycetota*: *Rubinisphaerae* = *Planctomycetaceae* s.str.), оказалась идентичной по последовательности участку 16S рРНК из метагенома *Planctomyces bekefi* phe10_nw2017 (GCA_007922685.1); еще одна ОТЕ, KRB-34, была сходна с ним на 96,9%, и, вероятно, принадлежит другому виду *Planctomyces* s.str.; две остальных ОТЕ наиболее близки к gtdb-роду JACQFH01, геномы которого выделены из активного ила и подземных вод. Наиболее близкими к ним из культивируемых видов являются (пресноводные) представители pp. *Planctopirus* и *Schlesneria*. Еще две ОТЕ принадлежат к *Pirellulaceae*, и по одной — к *Isosphaerales* и *Phycisphaerales* SM1A02 (=CL500-3, “*Ca. Nemodlikiaceae*”).

В составе *Verrucomicrobiota* присутствуют ОТЕ отрядов *Chthoniobacterales* (= *Terrimicrobiales* García-López et al. 2020), *Methylacidiphilales*, *Opitutales*, *Pedospaerales* (= *Limisphaerales* Podosokorskaya et al. 2023) и *Verrucomicrobiales*.

Анализ распределения доминирующих ОТЕ гетеротрофных бактерий в отдельных пробах с помощью кластерного анализа с использованием в качестве меры сходства хордового расстояния (Legendre, Gallagher, 2001) позволил разделить доминирующие ОТЕ на кластеры, преимущественно развивающиеся в разных группах проб (рис. 5).

Кластер А (рис. 5) объединяет пробы залива и водохранилища, в которых в составе цианобактерий доминировал *A. flos-aquae* (рис. 3). 18 из 33 ОТЕ этого кластера принадлежат к PVC-суперфилуму: 12 — к *Verrucomicrobiota* и 6 — к *Planctomycetota*. Этот кластер делится на три подкластера, различающихся по географическому положению проб. Подкластер А1 состоит из 10 ОТЕ, восемь из которых относятся к различным отрядам и семействам *Verrucomicrobiota*, а две оставшихся — к *Planctomycetota*, сем. *Planctomycetaceae* и отр. *Isosphaerales*.

Среди ОТЕ подкластера А2 по одной ОТЕ принадлежали к *Acidomicrobiota* (KRB-21)

Таблица 3. Таксономическая принадлежность доминирующих ОТЕ гетеротрофных бактерий

ОТЕ	Таксономическая принадлежность (по классификатору ARB-Silva)	Ближайший культивируемый вид или вид-кандидат	Сходство	Код Genbank
KRB-2	<i>Proteobacteria: Alphaproteobacteria:</i> <i>Ca. Pelagibacterales: Clade III</i>	<i>Ca. Fonsibacter ubiqvis</i> LSUCC0530	100	CP024034
KRB-4	<i>Actinobacteriota: Actinobacteria: Frankiales:</i> <i>Sporichthyaceae</i>	<i>Ca. Planktophila vernalis</i> MMS-IIA-15	98.03	CP016776
KRB-5	<i>Actinobacteriota: Actinobacteria: Frankiales:</i> <i>Sporichthyaceae: hgcI clade</i>	<i>Ca. Nanopelagicus limnes</i> MMS-21-122, <i>Ca. Nanopelagicus</i> <i>abundans</i> MMS-IIB-91	100	CP016768 CP016779
KRB-7	<i>Verrucomicrobiota: Verrucomicrobiae:</i> <i>Chthoniobacterales: Terrimicrobiaceae:</i> <i>Terrimicrobium</i>	<i>Terrimicrobium</i> <i>sacchariphilum</i> NM-5	93.6	NR_133878
KRB-11	<i>Actinobacteriota: Acidimicrobiia: Microtrichales:</i> <i>Ilumatobacteraceae: CL500-29</i>	<i>Ilumatobacter fluminis</i> WaFiHa-786	94.31	MT825235
KRB-18	<i>Proteobacteria: Alphaproteobacteria:</i> <i>Acetobacterales: Acetobacteraceae: Roseomonas</i>	<i>Roseomonas vinacea</i> M2-9	96.27	MN968958
KRB-26	<i>Verrucomicrobiota: Verrucomicrobiae:</i> <i>Chthoniobacterales: Chthoniobacteraceae: LD29</i>	<i>Prostheco bacter de jone gii</i> CG69	85.65	OK513264
KRB-30	<i>Proteobacteria: Gammaproteobacteria:</i> <i>Burkholderiales: Comamonadaceae: Limnohabitans</i>	<i>Limnohabitans planktonicus</i> Rim42, <i>Limnohabitans parvus</i> II-B4	98.83	HE600685 NR_125542
KRB-8	<i>Proteobacteria: Alphaproteobacteria:</i> <i>Sphingomonadales: Sphingomonadaceae:</i> <i>Sphingorhabdus</i>	<i>Sphingorhabdus planktonica</i> 21YS05S-0R27 <i>Sphingorhabdus rigui</i> HME8676	100	MZ976831 KC157048
KRB-22	<i>Actinobacteriota: Actinobacteria: Frankiales:</i> <i>Sporichthyaceae: hgcI clade</i>	<i>Ca. Planktophila sulfonica</i> MMS-IA-56	100	CP016773
KRB-10	<i>Proteobacteria: Gammaproteobacteria:</i> <i>Nitrosomonadales: Nitrosomonadaceae: Ellin6067</i>	<i>Usitatibacter palustris</i> Swamp67	93.68	NR_181165
KRB-13	<i>Verrucomicrobiota: Verrucomicrobiae:</i> <i>Verrucomicrobiales: Rubritaleaceae: Luteolibacter</i>	<i>Luteolibacter gellanilyticus</i> CB-286403	96.49	NR_158117
KRB-14	<i>Verrucomicrobiota: Verrucomicrobiae:</i> <i>Verrucomicrobiales: Verrucomicrobiaceae:</i> <i>Prostheco bacter</i>	<i>Prostheco bacter</i> <i>vanneervanii</i> DSM 12252	97.89	AJ966883
KRB-51	<i>Proteobacteria: Gammaproteobacteria:</i> <i>Burkholderiales: Burkholderiaceae:</i> <i>Polynucleobacter</i>	<i>Polynucleobacter</i> <i>acidiphobus</i> HIN8	99.77	AB599871
KRB-17	<i>Actinobacteriota: Actinobacteria: Frankiales:</i> <i>Sporichthyaceae: hgcI clade</i>	<i>Acidothermus cellulolyticus</i> 11B	91.65	NR_074501

и *Planctomycetaceae: Planctomycetota* (KRB-38) с последовательностью, идентичной *P. bekefii*. Еще три ОТЕ принадлежали к *Verrucomicrobiota*, и одна — к классу *Alphaproteobacteria* (группа *Roseomonas*). Зоной их преимущественного развития было устье Усинского залива и основная акватория водохранилища (пробы ST6 и ST7).

ОТЕ подкластера A3 характерны для центральной части залива (пробы ST4 и ST5), где в период наших наблюдений происходило наиболее интенсивное

развитие *A. flos-aquae*. В этих пробах относительно высокое развитие получают такие ОТЕ, как KRB-10 (*Betaproteobacteria*) и KRB-23 (*Bacteroidetes: Sphingobacteriales: NS11-12*). В эту же группу входит ОТЕ-34, принадлежащий к р. *Planctomyces* s.str. (сходство с *P. bekefii* — 96.9%).

Кластер Б (рис. 5) образуют ОТЕ, преимущественно развивающиеся в озерной системе Кабан. Объединение проб в этом кластере имеет “лестничный” характер с значительными различиями между

Таблица 4. Ближайшие последовательности 16S рРНК в базе полных геномов (GTDB) и некультивируемых клонов в базе Genbank (NCBI)

OTE	Ближайшая последовательность в базе GTDB	Сходство	Шифр Genbank	Место выделения	Ближайший (один из) некультивируемый клон	Сходство	Шифр Genbank	Место выделения
KRB-4	<i>Nanorelagiaceae: Planktophila</i> sp015660815	98.51	GCA_015660815	США, East River	<i>Ca. Planktophila</i> sp. IMCC27705	100	MT656636	Корея, пресные воды
KRB-7	<i>Terrimicrobiaceae: UBA967</i> sp018402345	98.24	GCA_018402345	Россия, оз. Шунет	Lake bacterium P38.12	100	AY752089	Франция, оз. Павен
KRB-11	<i>Plumatobacteraceae: BACL27</i> sp003569125	94.53	GCA_003569125	Япония, оз. Бива	Actinobacterium T016	100	JN634169	США, пресноводное водохранилище
KRB-18	<i>Acetobacteraceae: Roseomonas</i> B sp020250005	100	GCA_020250005	США, оз. Шамплейн, колония <i>Microcystis</i>	Bacterium clone AB_03_142	100	KC666988	Франция, оз. Вильре (Villerest)
KRB-26	<i>Chthoniobacteriales: JACTMZ01: JACT-MZ01</i> sp018883245	98.80	GCA_018883245	Бразилия, озерная вода	Bacterium clone NN83	99.77	JN869104	Китай, оз. Тайху
KRB-10	<i>Usititibacteraceae: UKL13-2</i> sp001602455	100	GCA_001602455	США, оз. Уппер Klamath, колония <i>Aphanizomenon</i>	Beta proteobacterium clone LiJU-9-233	100	AY509483	Швеция, оз. Лиммарен
KRB-13	<i>Akkermansiaceae: Luteolibacter</i> sp018969605	100	GCA_018969605	Китай, речная вода, загрязненная шахтными стоками	Bacterium clone Nan153	100	JN941870	Китай, оз. Наньху
KRB-14	<i>Verrucomicrobiaceae: Prostheobacter</i> sp016713245	99.77	GCA_016713245	Дания, активный ил	Bacterium clone M0509_89	99.77	EU104166	Новая Зеландия, активный ил
KRB-17	<i>Nanorelagiales: UBA5976: _ATZT02</i> sp.014190035	100	GCA_014190035	Япония, оз. Бива	Bacterium clone C-104	100	KC836023	Китай, оз. Тайху

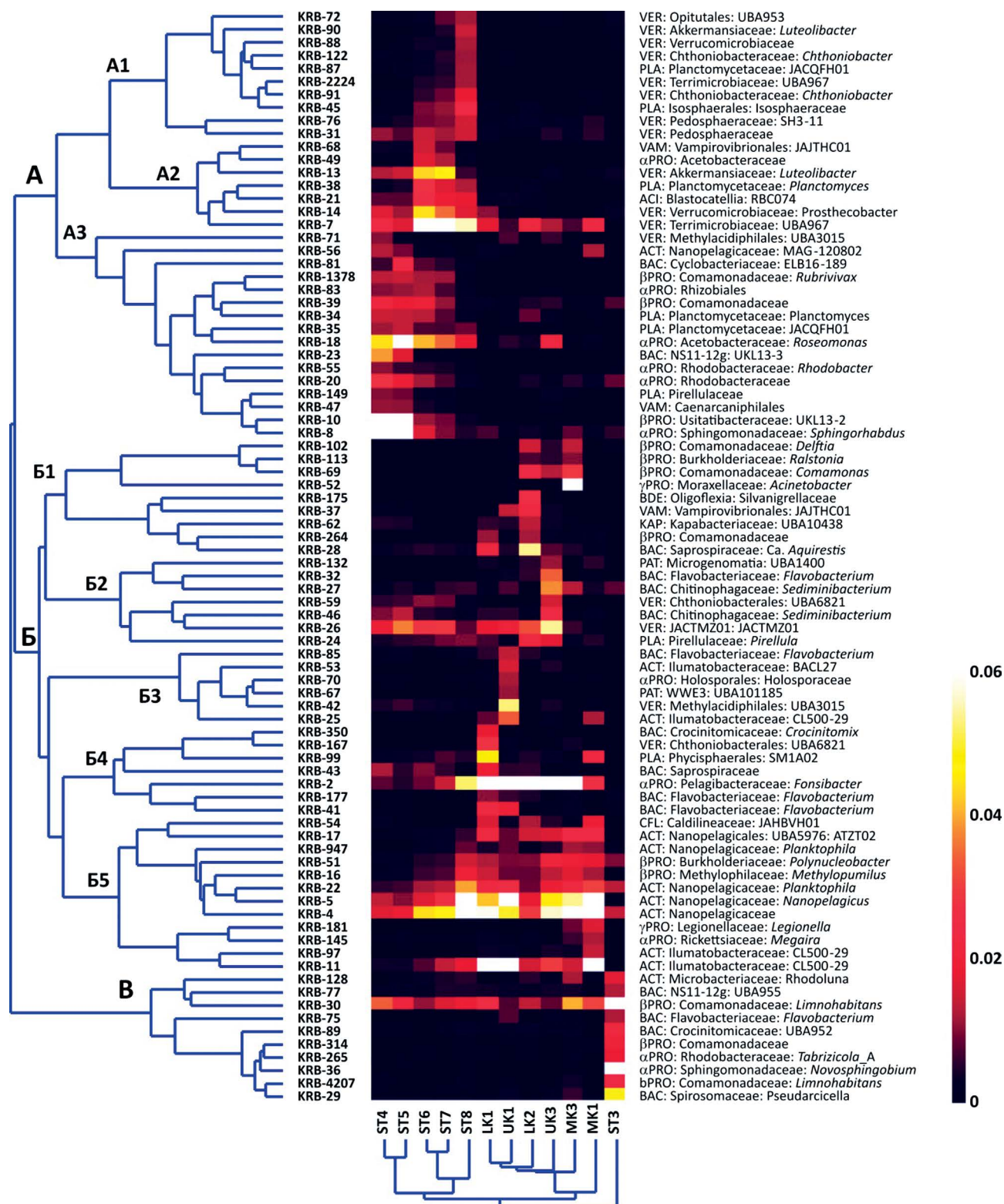


Рис. 5. Результаты двустороннего (two-way) кластерного анализа доминирующих ОТЕ гетеротрофных бактерий по доле численности с использованием хордового расстояния в качестве меры сходства. Справа — консенсусная таксономическая принадлежность ОТЕ по базам данных ARB-Silva и GTDB. Трехбуквенные обозначения филумов/классов: ACI — ацидобактерии; ACT — актинобактерии; BAC — *Bacteroidota*; BDE — *Bdellovibrionota* = *Oligoflexota*; CFL — *Chloroflexota*; KAP — *Kapabacterota*; PAT — *Patescibacteria*; PLA — *Planctomycetota*; a-, b-, и g-PRO — протеобактерии; VAM — *Vampirovibrionota*; VER — *Verrucomicrobiota*.

всеми пробами. ОТЕ кластера Б делятся на пять подкластеров, четыре из которых (подкластеры Б1–Б4) приурочены каждый к 1–2 пробам. Так, подкластер Б1 образован ОТЕ, преимущественно развивающимися в пробе LK2 (оз. Н. Кабан, 2017 г.) или в пробе МК3 (оз. С. Кабан, 2017 г.). Пять ОТЕ этого кластера принадлежат к некультивируемым формам, ближайшие аналоги которых выделяются именно из различных водных объектов. Однако протеобактерии KRB-52, 69, 102 и 113 (соответственно, комплекс *Acinetobacter baumannii/pittii/calcoaceticum*, *Comamonas testosteroni/thiooxidans*, *Delftia* sp. и *Ralstonia pickettii*), хотя и спорадически отмечаются в планктоне озер, более характерны для почв и клинического материала.

ОТЕ подкластеров Б-2 и Б-3 приурочены, преимущественно, к пробам из оз. В. Кабан (рис. 5). В пробе UK1 (2016 г.), с доминированием KRB-9 (*Limnothrix planctonica*), преимущественное развитие получили ОТЕ подкластера Б3, в частности, KRB-42 (*Methylococcoides*: *Verrucomicrobiales*) и KRB-25 (*Ilumatibacteraceae* CL500-29: *Acidimicrobiia*: *Actinomycetota*). В этой пробе, кроме того, наблюдалась наибольшая (23.3%) доля главного доминанта среди гетеротрофных бактерий, KRB-2 (*Fonsibacter*: *Pelagibacteraceae*: *Alfaproteobacteria*). В 2017 г. структура бактериопланктона в этом озере значительно изменилась; сходство Брея–Куртиса между пробами UK1 и UK3 составляет только 0.4. Среди цианобактерий доминирование от KRB-9 перешло к KRB-12, KRB-40 и KRB-44 (рис. 3). Состав гетеротрофного планктона также значительно изменился; в нем получили наибольшее развитие ОТЕ кластера Б2 (рис. 5). Две из них принадлежат к роду *Sediminibacterium* (*Chitinophagales*: *Bacteroidetes*), KRB-46 и KRB-27, еще две – к некультивируемым таксонам *Verrucomicrobiota* и одна – к сем. *Pirellulaceae*: *Planctomycetota*. Здесь же в число доминантов вошел единственный представитель *Patescibacteria*, KRB-132. ОТЕ подкластера Б4 в той или иной степени приурочены к единственной пробе LK1 (Н. Кабан, 2016 г.). К нему, однако, принадлежит и главный гетеротрофный доминант в озерах системы Кабан, KRB-2 (*Fonsibacter*).

Подкластер Б5 объединяет ОТЕ, развивающиеся во всех пробах системы Кабан и в части проб водохранилища. Более половины ОТЕ, входящих в этот подкластер – пресноводные актинобактерии отр. *Nanopelagicales* (5 ОТЕ) и *Ilumatobacterales* СК500-13 (*Acidimicrobiia*, 2 ОТЕ). Еще одна ОТЕ принадлежит к отр. *Caldilineales* (*Anaerolineae*: *Chloroflexota*), и четыре – к протеобактериям, в частности, KRB-16 (*Ca. Methyloporumilus*: *Betaproteobacteria*) и KRB-51 (*Polynucleobacter*: *Betaproteobacteria*).

По составу гетеротрофных бактерий резко выделяется речной участок (ст. ST3, кластер В, рис. 5). В этой пробе очень невелика доля цианобактерий

(рис. 1, табл. 2), представленных в основном *Cyanobium gracile* (KRB-66) (рис. 4). Кластер В объединяет десять ОТЕ-доминантов, отсутствующих или слабо представленных практически во всех остальных пробах (рис. 5). Наиболее многочисленная ОТЕ из этого кластера – KRB-30 (*Limnolobus planktonicus*), причем в реке ее доля более чем вдвое больше, чем в остальных пробах.

Связи между доминирующими видами цианобактерий и ОТЕ гетеротрофных бактерий. По данным неметрического шкалирования (рис. 6) доминирующие ОТЕ прокариот разбиваются на пять группировок.

В четыре из них входит хотя бы одна ОТЕ цианобактерий. Цианобактерии KRB-3 (*A. flos-aqua*), KRB-15 (*Dolichospermum*) и KRB-33 (*M. aeruginosa*) образуют тесную группировку, окруженную многочисленными ОТЕ гетеротрофных бактерий, в том числе входящими в фикосферу *Aphanizomenon* и *Microcystis* (KRB-10, KRB-23 и KRB-18) и обогащенную представителями PVC-надфиума. Еще одна группировка формируется вокруг ОТЕ KRB-44 (*C. rubescens*) и KRB-40 (*Nodosilineaceae*) и включает в себя три ОТЕ актинобактерий сем. *Nanopelagicaceae* и три представителя *Bacteroidetes*. KRB-12 (*L. redekei*/*Pseudanabaena*) и связанная с ней нефототрофная цианобактерия KRB-37 (*Vampirovibrionales*) также формируют достаточно плотную группировку, включающую 3 ОТЕ актинобактерий, 2 – *Bacteroidetes* и KRB-2 (*Fonsibacter*), основного доминанта озер системы Кабан. В отличие от них, небольшая очень “рыхлая” визуальная группа, сформированная вокруг KRB-1 (*P. agardhii*) лишена облигатно планктонных представителей, зато включает ОТЕ KRB-52 (*Acinetobacter*), KRB-69 (*Comamonas testosteroni*) и KRB-181 (*Legionella*), имеющих определенное клиническое значение.

ОБСУЖДЕНИЕ

Филогенетическая структура бактериопланктона исследованных водоемов бассейна Средней Волги является, в целом, типичной для пресных континентальных водоемов (Zwart et al., 2002; Newton et al., 2011; Chiriac et al., 2023). Основной вклад в нее по числу последовательностей вносили цианобактерии, протеобактерии, актинобактерии и бактерии PVC-суперфиума, причем протеобактерии, *Bacteroidota* и *Verrucomicrobiota* преобладали и по числу ОТЕ (рис. 1). Высокая доля бактерий PVC-суперфиума, *Verrucomicrobiota* и особенно *Planctomycetota*, является характерной особенностью исследованных проб.

Среди цианобактерий в исследованных водоемах преобладали представители рода *Planktothrix* (*Microcoleaceae*: *Oscillatoriales*), а также филогенетических линий *Aphanizomenon*/*Dolichospermum* (*Aphanizomenonaceae*) и *Cyanobium* (*Prochlorococcaceae*). К числу субдоминантов принадлежали

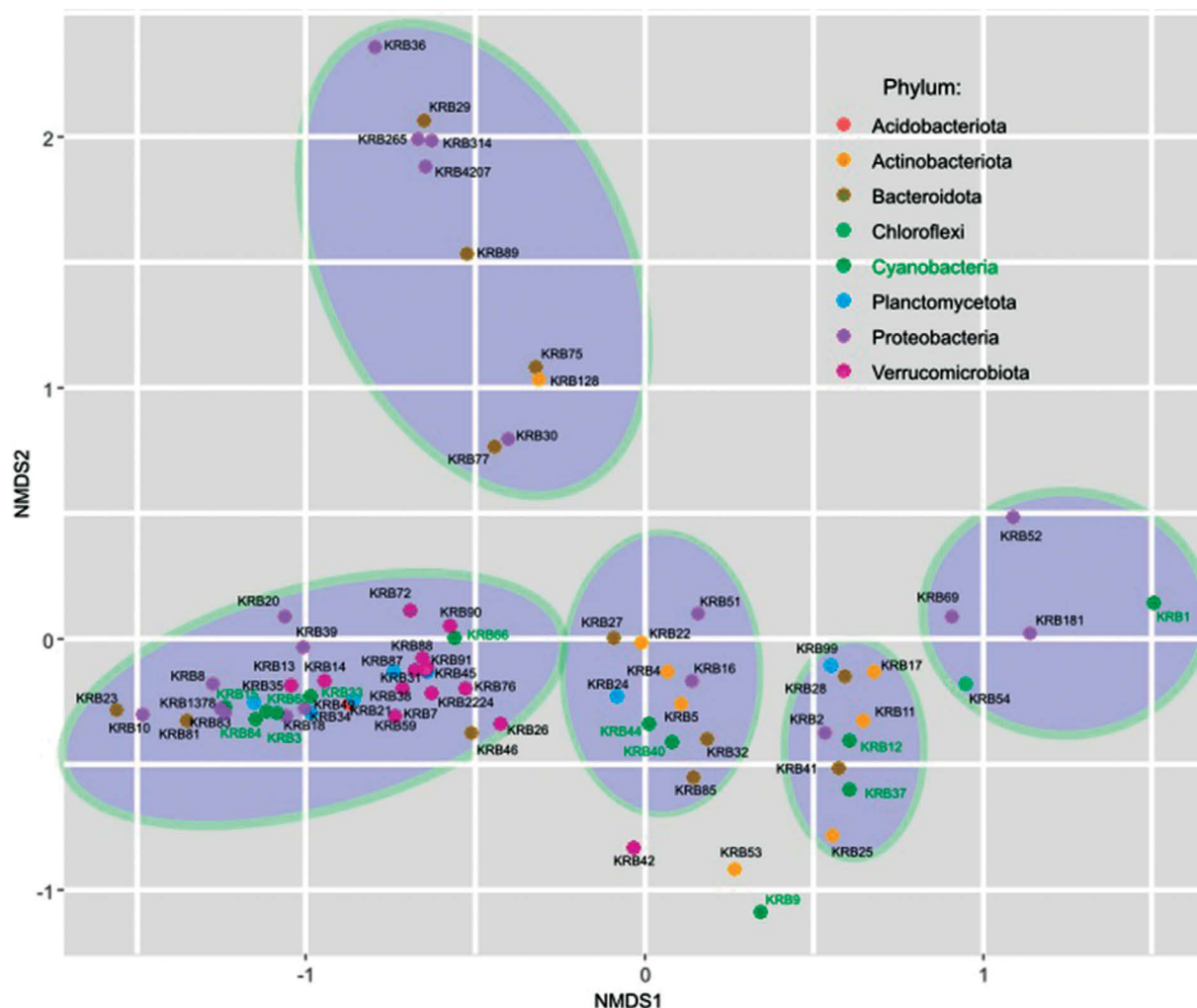


Рис. 6. Неметрическое шкалирование доминирующих ОТЕ по величинам несходства Брея–Кертиса. Темно-серыми овалами показаны визуально выделяемые группировки ОТЕ.

мелкие безгетероцистные нитчатые цианобактерии: *Pseudanabaena*, *Limnothrix*, *Geitlerinema*, *Leptolyngbia* и др. Эти филогенетически далекие формы довольно близки по экологическим потребностям и в функциональной классификации фитопланктона (Reynolds et al., 2002) объединяются вместе с *Planktothrix* в функциональную группу (кодон) S1.

Заметную долю гетеротрофных бактерий во всех пробах составляли миксотрофные бактерии с родопсиновым типом фотосинтеза (Pitt et al., 2019; Mondav et al., 2020; Chiriac et al., 2023), как, например, *Ca. Fonsibacter*, *Ca. Methylopusillus*, *Ca. Nanopelagicus*, *Ca. Planctophila* и виды Луна-кластера, а также аэробные аноксигенные хлорофототрофные бактерии, как, например, *Limnohabitans* (Kasalický et al., 2018) и некоторые другие протеобактерии.

Представленные данные указывают на значительные вариации состава сообществ планктонных

бактерий и позволяют разделить весь массив данных на 4 группы (рис. 3): речной участок, представленный пробой S3, акваторию Приплотинного плеса и Усинского залива Куйбышевского водохранилища (пробы S4–S8, с заметным отличием ST8 от остальных), озеро Верхний Кабан (пробы UK1 и UK3) и озера Средний и Нижний Кабаны (остальные пробы).

Лотическая станция (ST3) наиболее сильно отклоняется по составу бактериопланктона от всех остальных станций (рис. 3–5). В ней очень невелика доля цианобактерий (рис. 1a), которые представлены в основном ОТЕ кластера *Cyanobium gracile* (рис. 4). Она отличается очень большим числом уникальных ОТЕ, отсутствующих во всех остальных пробах (549), которое более чем в 4 раза превышает число уникальных ОТЕ в остальных пробах, изменяющееся от 3 на ст. ЛК-1 до 126 на ст. МК-3. Среди ОТЕ, доминирующих на этой

станции, присутствуют не только близкие к выделенным из потамопланктона (KRB-29, *Aquirufa antheringensis* и KRB-314, *Rhodoferax bucti*) или из почвы/водоносных горизонтов (KRB-36, *Novosphingobium subterraneum*), но и такие считающиеся лимнопланктонными виды, как *Limnohabitans planktonicus*, *L. australis* и *Rhodoluna limnophila* (KRB-30, KRB-4207 и KRB-128). Последовательности, включенные в KRB-128 (Luna-кластер), присутствовали также в озерах системы Кабан, но детальный анализ показал, что в них они были представлены последовательностями, близкими или идентичными *Ca. Aquiluna* (не показано).

На всех лентических станциях в момент отбора проб происходило цветение цианобактерий. Это ярко иллюстрируется как долей последовательностей цианобактерий в пробах, так и отношением числа последовательностей *Oxyphotobacteria* к числу хлоропластных последовательностей (табл. 2). Последний показатель может служить грубым индикатором доли цианобактерий в фитопланктоне, несмотря на то, что число копий рибосомного оперона в хромосоме (Schirrmeister et al., 2012), плоидность (Griese et al., 2011), а также число хлоропластов в клетках эукариотических водорослей (Karlusich et al., 2023) варьирует в широких пределах как от вида к виду, так и в течение жизненного цикла. В пробах из Усинского залива и Приплотинного плеса цветение цианобактерий подтверждается микроскопически (Уманская и соавт., 2023б). К сожалению, в озерах системы Кабан синхронные микроскопические данные, насколько нам известно, отсутствуют.

При этом пробы трех лентических групп существенно различаются по составу цианобактерий. В озерах С. и Н. Кабан доля последовательностей цианобактерий была наибольшей, однако из-за экстремально сильного доминирования единственной ОТЕ, KRB-1 (*P. agardhii*) наблюдалось наименьшее разнообразие. В оз. В. Кабан доминирование было низким, а число обнаруженных ОТЕ цианобактерий — наибольшим. При этом доминирующая в 2016 г. ОТЕ, KRB-9 (*L. planctonica*), в 2017 г. практически выпала из состава планктона, а в состав доминантов вошли три ОТЕ: KRB-44 (*Cyanobium rubescens*), KRB-12 (*Limnothrix redekei*/*Pseudanabaena*-кластер) и KRB-40 (сем. *Nodosilineaceae* Strunecký and Mareš, 2023). Доминирование KRB-44, принадлежащего к преимущественно металимническому и фикозеритрин-синтезирующему субальпийскому-1 комплексу (Callieri et al., 2012), позволяет высказать осторожное предположение, что незадолго до отбора произошла заметная эрозия металимниона озера. В целом, во всех озерах Кабан доминировали различные представители функционального комплекса S1. Необходимо отметить, что в конце XX века в озерах Кабан наблюдались цветения *A. flos-aqua* и *Microcystis aeruginosa*

(Бариева и соавт., 2005), но уже в 2011 г. в них приобрели доминирующее положение цианобактерии функционального комплекса S1, преимущественно *P. agardhii* (Горохова, 2012). ОТЕ, доминирующая в пробах из Усинского залива и Куйбышевского водохранилища (KRB-3), имеет последовательность, идентичную *Aphanizomenon flos-aquae*. По данным многолетних микроскопических наблюдений, этот вид преобладает в начальной фазе, а часто и в течение всего периода летнего цианобактериального цветения в Куйбышевском водохранилище (Паутова, Номоконова, 1994; Корнева, 2015). Значительная часть гетеротрофных видов-доминантов, выделенных в нашем исследовании, имеют некультивируемые аналоги, выделенные из воды озер с “цветением” цианобактерий. Это, например, клоны из озер КНР, оз. Бива (Япония), а также GCA_020250005 из колонии *Microcystis* и UKL13-2 из колонии *Aphanizomenon flos-aqua* (Driscoll et al., 2017) (табл. 4).

Характерной чертой всех станций залива и водохранилища, в которых в составе цианобактерий доминировал *A. flos-aquae*, является высокая доля представителей PVC-суперфилума в составе гетеротрофного бактериопланктона. Это, видимо, отражает весьма благоприятные условия для развития этой группы либо в водохранилище вообще, либо в исследованный период времени, что подтверждается и повышенной долей этой группы на всех станциях водохранилища и залива (рис. 1б). Они были наиболее сильно представлены в пробе ST8, расположенной выше устья Усинского залива. Причина настолько сильной таксономической селективности этой станции непонятна; возможно, она связана с гидротехническими работами при строительстве моста через водохранилище выше по течению. В устье Усинского залива и основной акватории водохранилища (пробы ST6 и ST7, подкластер A2) преимущественное развитие получила ОТЕ KRB-38 с последовательностью, идентичной *P. bekefii*. Этот вид тесно ассоциирован с цветением цианобактерий (Fuerst, 1995), хотя не входит в фикосферу какого-либо вида. На станциях центральной части Усинского залива (пробы ST4 и ST5) в период наших наблюдений происходило наиболее интенсивное развитие *A. flos-aquae*. В этих пробах относительно высокое развитие получили такие ОТЕ, как KRB-10 и KRB-23, которые идентичны последовательностям UKL13-2 и UKL13-3, ассоциированным с колониями *A. flos-aquae* (Driscoll et al., 2017); несколько других ОТЕ оказались близки к последовательностям, так или иначе ассоциированным с цветением *Microcystis*.

Состав гетеротрофного бактериопланктона в пробах из озер Кабан с цветением цианобактерий комплекса S1 значительно отличался от водохранилища, однако различия между отдельными пробами из озер были высокими и не зависели

от доминирующего вида цианобактерий (рис. 5). Во всех пробах системы Кабан и в части проб водохранилища в больших количествах присутствовал KRB-2, *Ca. Fonsibacter ubiquis* (*Ca. Pelagibacterales: Alphaproteobacteria*), а также несколько эупланктонных актинобактерий отр. *Nanopelagicales* и *Ilumatobacterales* и бетапротееобактерий, входящих в подкластер Б5 на рис. 5. Одной из характерных ОТЕ является, например, метилотроф KRB-16, *Ca. Methylopusillus planctonicus* (*Betaproteobacteria*), наиболее интенсивно развивавшийся в пробе S8 водохранилища и пробе МК3 (оз. С. Кабан). Этот вид характерен для многих стратифицированных озер, однако интересно отметить, что его развитие в Цюрихском озере было ассоциировано с металимническим цветением *Planktothrix rubescens* (Salcher et al., 2015).

Отличие состава и структуры бактериопланктона озер Кабан от водохранилища может быть связано с различными гидрологическими и гидрохимическими условиями, однако, поскольку в пробах озер Кабан не обнаружено повышенного обилия известных видов-индикаторов повышенной минерализации, микроаэробных и анаэробных видов, то этот фактор, вероятно, не имеет большого значения. Более существенным фактором может быть интенсивное антропогенное загрязнение озер Кабан (и особенно оз. С. Кабан) с окружающей городской территории, именно с которым может быть связано присутствие в составе доминантов проб LK2 и МК3 протеобактерий, близких к оппортунистическим патогенам и обитателям почв, и лишь спорадически отмечающихся в планктоне озер.

Определенное воздействие на результаты могло оказать также некоторое различие в методах отбора проб. Использование в озерах системы Кабан при отборе проб сети Апштейна (Фролова и соавт., 2019), которая, хотя и не задерживает подавляющую часть бактериопланктона, безусловно, концентрировала метазоопланктон, крупные протисты и массивные колонии фитопланктона (в том числе, цианобактерии *Microcystis* и *Aphanizomenon*) вместе с ассоциированными с ними бактериями. О возможном влиянии концентрирования зоопланктона может свидетельствовать некоторое обогащение проб из озер Кабан ОТЕ, принадлежащими к отр. *Rickettsiales* (0.789% против 0.278% в реке и водохранилище).

Однако все полученные нами данные явно указывают на существование различных комплексов гетеротрофных бактерий, ассоциированных с теми или иными ОТЕ цианобактерий. Характерно, что в состав крупной ассоциации с цианобактериями KRB-3 (*A. flos-aqua*), KRB-15 (*Dolichospermum*) и KRB-33 (*M. aeruginosa*) вошли не только ОТЕ, входящие в фикосферу *Aphanizomenon* и *Microcystis*, но и значительное число свободноживущих

представителей PVC-надфилума. Компактные ассоциации, формирующиеся вокруг ОТЕ KRB-44 (*C. rubescens*) + KRB-40 (*Nodosilineaceae*) и KRB-12 (*L. redekei/Pseudanabaena*), состоят из типичных планктонных бактерий, выделенных преимущественно из аэробного слоя пресных озер. Однако группа гетеротрофных бактерий, связанная с *P. agardhii*, лишена облигатно планктонных представителей. Складывается ощущение, что массовое развитие *P. agardhii* оказывает ингибирующее действие на большинство типичных организмов пресноводного бактериопланктона.

Таким образом, различия в составе “цветущего” комплекса цианобактерий сопровождаются столь же заметными различиями в составе гетеротрофного бактериопланктона. Часть из ОТЕ, тесно ассоциированных с определенными видами цианобактерий, весьма вероятно, входят в состав их фикосферы (как, например, KRB-10 и KRB-23), но большинство других, вероятно, являются свободноживущими, как, например, ОТЕ, принадлежащие к сем. *Nanopelagicaceae*, *Comanodonadaceae* или р. *Planctomyces* s.str. Поэтому, несмотря на то что полученные данные не являются однозначным доказательством причинно-следственной связи между составом цианобактерий и гетеротрофного планктона, авторы считают, что развитие тех или иных видов цианобактерий является одним из существенных факторов, влияющим на состав бактериопланктона изученного района.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят неизвестного рецензента за его конструктивные комментарии и предложения, которые позволили значительно улучшить текст рукописи.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-14-20005, <https://rscf.ru/project/23-14-20005>.

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

- Бариева Ф.Ф., Халиулина Л.Ю., Мингазова Н.М., Фитопланктон городских водоемов и водотоков // Экология города Казани / Казань: Изд-во "ФЭН" АН РТ, 2005. С. 236–247.
- Биоразнообразие и типология карстовых озер Среднего Поволжья. Под ред. Мингазовой Н.М. Казань: Казанский гос. ун-т, 2009. 225 с.
- Горохова О.Г. Фитопланктон озерной системы Кабан в 2011 году // Георесурсы. 2012. Т. 7. № 49. С. 24–28.
- Корнева Л.Г. Фитопланктон водохранилищ Волги. Кострома: Костромской печатный дом, 2015. 284 с.
- Паутова В.Н., Номоконова В.И. Продуктивность фитопланктона Куйбышевского водохранилища. Тольятти: ИЭВБ РАН, 1994. 188 с.
- Куйбышевское водохранилище (научно-информационный справочник). Под ред. Розенберга Г.С., Выхристюк Л.А. Тольятти: ИЭВБ РАН, 2008. 124 с.
- Уманская М.В., Горбунов М.Ю., Быкова С.В., Тарасова Н.Г. Разнообразие и трансформация сообщества планктонных пресноводных протистов в эстуарной зоне притока крупного равнинного водохранилища: метабаркодирование гена 18S-рибосомной РНК // Известия РАН. Сер. биол. 2023а. № 4. С. 426–443.
- Umanakaya M.V., Gorbunov M.Y., Bykova S.V., Tarasova N.G. Diversity and transformation of the community of planktonic freshwater protists in the estuarine tributary zone of a large plainland reservoir: metabarcoding of the 18S ribosomal RNA gene // Biol. Bull. 2023a. V. 50. P. 707–723.
- Уманская М.В., Горбунов М.Ю., Краснова Е.С., Тарасова Н.Г. Сравнительный анализ структуры сообщества цианобактерий участка равнинного водохранилища по результатам микроскопического учета и 16S-метабаркодирования // Биосфера. 2023б. Т. 15. С. 246–260.
- Фролова Л.Л., Свердруп А.Э., Маланин С.Ю., Деревенская О.Ю., Хусаинов А.М., Харченко А.М. Метагеном гидробионтов озер Кабан города Казани: анализ видового разнообразия гидробионтов по маркерным генам. Казань: Казанский (Приволжский) федеральный университет, 2019. 218 с.
- Amann R.I., Ludwig W., Schleifer K.H. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation // Microbiol. Rev. 1995. V. 59. P. 143–169.
- Callieri C., Cronberg G., Stockner J.G. Freshwater *Picocyanobacteria*: single cells, microcolonies and colonial forms // Ecology of Cyanobacteria II: Their diversity in space and time / Ed. Whitton B.A. Dordrecht: Springer Netherlands, 2012. P. 229–269.
- Chiriac M.C., Haber M., Salcher M.M. Adaptive genetic traits in pelagic freshwater microbes // Environ. Microbiol. 2023. V. 25. P. 606–641.
- Driscoll C.B., Otten T.G., Brown N.M., Dreher T.W. Towards long-read metagenomics: complete assembly of three novel genomes from bacteria dependent on a diazotrophic cyanobacterium in a freshwater lake co-culture // Stand. Genomic Sci. 2017. V. 12. <https://doi.org/10.1186%2Fs40793-017-0224-8>
- Edgar R.C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST // Bioinform. 2010. V. 26. P. 2460–2461.
- Eiler A., Bertilsson S. Composition of freshwater bacterial communities associated with cyanobacterial blooms in four Swedish lakes // Environ. Microbiol. 2004. V. 6. P. 1228–1243.
- Fuerst J.A. The planctomycetes: emerging models for microbial ecology, evolution and cell biology // Microbiology (Reading). 1995. V. 141. P. 1493–1506.
- Galperin M.Y. Dark matter in a deep-sea vent and in human mouth // Environ. Microbiol. 2007. V. 9. P. 2385–2391.
- Griese M., Lange C., Soppa J. Ploidy in cyanobacteria // FEMS Microbiol. Lett. 2011. V. 323. P. 124–131.
- Herlemann D.P., Labrenz M., Jürgens K., Bertilsson S., Waniek J.J., Andersson A.F. Transitions in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea // ISME J. 2011. V. 5. P. 1571–1579.
- Huisman J., Codd G.A., Paerl H.W., Ibelings B.W., Verspagen J.M., Visser P.M. Cyanobacterial blooms // Nat. Rev. Microbiol. 2018. V. 16. P. 471–483.
- Karlusich J.J.P., Pelletier E., Zinge L., Lombard F., Zingone A., Colin S., Gasol J.M., Dorrell R.G., Henry N., Scalco E., Acinas S.G., Wincker P., de Vargas C., Bowler C. A robust approach to estimate relative phytoplankton cell abundances from metagenomes // Mol. Ecol. Resour. 2023. V. 23. P. 16–40.
- Kasalický V., Zeng Y., Piwoż K., Šimek K., Kratochvilová H., Koblížek M. Aerobic anoxygenic photosynthesis is commonly present within the genus *Limnohabitans* // Appl. Environ. Microbiol. 2018. V. 84. Art. e02116-17.
- Legendre P., Gallagher E.D. Ecologically meaningful transformations for ordination of species data // Oecologia. 2001. V. 129. P. 271–280.
- Mondav R., Bertilsson S., Buck M., Langenheder S., Lindström E.S., Garcia S.L. Streamlined and abundant bacterioplankton thrive in functional cohorts // mSystems. 2020. V. 5. Art. e00316-20.
- Newton R.J., Jones S.E., Eiler A., McMahon K.D., Bertilsson S. A guide to the natural history of freshwater lake bacteria // MMBR. 2011. V. 75. P. 14–49.
- Pitt A., Schmidt J., Koll U., Hahn M.W. *Rhodoluna limnophila* sp. nov., a bacterium with 1.4 Mbp genome size isolated from freshwater habitats located in Salzburg, Austria // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2019. V. 69. P. 3946–3954.
- Rappé M.S., Giovannoni S.J. The uncultured microbial majority // Annu. Rev. Microbiol. 2003. V. 57. P. 369–394.
- Reynolds C.S., Huszar V., Kruk C., Naselli-Flores L., Melo S. Towards a functional classification of the freshwater phytoplankton // J. Plankt. Res. 2002. V. 24. P. 417–428.

Salcher M.M., Neuenschwander S.M., Posch T., Pernthaler J. The ecology of pelagic freshwater methylotrophs assessed by a high-resolution monitoring and isolation campaign // ISME J. 2015. V. 9. P. 2442–2453.

Schirrmeister B.E., Dalquen D.A., Anisimova M. Bagheri H.C., Gene copy number variation and its

significance in cyanobacterial phylogeny // BMC Microbiol. 2012. V. 12. Art. 177.

Zwart G., Crump B.C., Kamst-van Agterveld M.P., Hagen F., Han S.K. Typical freshwater bacteria: an analysis of available 16S rRNA gene sequences from plankton of lakes and rivers // Aquat. Microb. Ecol. 2002. V. 28. P. 141–155.

EXPERIMENTAL ARTICLES

Phylogenetic Structure of Bacterioplankton in Water Bodies of the Kuibyshev Reservoir Basin During the Period of Mass Development of Cyanobacteria

M. V. Umanskaya^{1, *}, M. Yu. Gorbunov¹

¹Samara Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences, Institute of Ecology of the Volga Basin of the Russian Academy of Sciences, Togliatti, 445003, Russia

*e-mail: mvumansk67@gmail.com

The phylogenetic structure of the bacterioplankton of the Usa Bay and the adjacent aquatory of the Kuibyshev Reservoir, as well as three hydrologically connected urban lakes of the Kaban system (Kazan), was analyzed using the results of high-throughput sequencing of the V3–V4 hypervariable region of the 16S ribosomal RNA gene. In the studied water objects, mass cyanobacterial development was observed, dominated by members of the *Aphanizomenon/Dolichospermum* and *Cyanobium* phylogenetic lines and the genus *Planktothrix*. Alpha- and betaproteobacteria dominated in the heterotrophic bacterioplankton of all stations. A significant proportion of its composition was made up of mixotrophic bacteria with the rhodopsin type of photosynthesis (for example, *Ca. Fonsibacter*, *Ca. Nanopelagicus*, *Ca. Planctophila*). A characteristic feature of the studied samples is a high proportion of bacteria of PVC superphylum, especially *Planctomycetota*. An assessment was made of the dependence of the composition and structure of bacterioplankton on the composition of the dominant cyanobacterial complexes, and groups of heterotrophic bacteria associated with various cyanobacteria were identified. The most numerous group is formed around *Aphanizomenon–Dolichospermum–Microcystis* and mainly consists of bacteria that are part of the phycosphere of colonial cyanobacteria, as well as representatives of the PVC superphylum. Two small groups are formed around *Limnothrix redekei* and *Cyanobium rubescens* and consist of typical planktonic bacteria, belonging mainly to the order *Flavobacteriales* and the family *Nanopelagicaceae*.

Keywords: freshwater bodies, bacterioplankton, metabarcoding, 16S rRNA, cyanobacterial bloom

УДК 579.26+579.68

БАКТЕРИАЛЬНЫЕ СООБЩЕСТВА РЕКИ СЕЛЕНГИ, ЕЕ ПРИТОКОВ И СЕЛЕНГИНСКОГО МЕЛКОВОДЬЯ В ЛЕТНИЙ ПЕРИОД 2021 ГОДА¹

© 2024 г. А. С. Захаренко^{а, *}, И. В. Томберг^а, С. В. Букин^а, В. В. Блинов^а, Т. И. Земская^а

^аЛимнологический институт СО РАН, Иркутск, 664033, Россия

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

Поступила в редакцию 27.05.2024 г.

После доработки 13.06.2024 г.

Принята к публикации 25.06.2024 г.

Получены первые данные о разнообразии и структуре бактериальных сообществ в реке Селенге, ее притоках и придельтовой акватории (Селенгинское мелководье) в летний многоводный период 2021 г. На российской части реки Селенги вниз по течению выявлена тенденция постепенного уменьшения химических показателей (щелочности, минерализации, концентраций сульфат- и хлорид-ионов). Как и ранее, химический состав вод реки Селенги определялся водностью и антропогенной нагрузкой, тогда как влияние вод притоков было локальным. На расстоянии 1 км от устьев в зоне смешения речной воды с озерной химический состав и таксономическая структура бактериальных сообществ были близки отмечаемым в пелагиали озера Байкал. Во всех проанализированных библиотеках гена 16S рРНК выявлено 9 общих фил бактерий с преобладанием представителей *Pseudomonadota* (51.71–76.83%) в речных сообществах и *Actinomycetota* — (17.28–66.32%) в сообществах Селенгинского мелководья. Наиболее значительные различия таксономического состава бактериальных сообществ отмечены на уровне рода. Предположено существование на всем протяжении реки Селенги устойчивого бактериального сообщества, основными представителями которого являются бактерии родов *Limnohabitans*, *Pseudarcicella*, *Rhodoluna* и *Polynucleobacter*, доминирующие и в малых реках Южного Байкала. Сравнительный анализ разнообразия сообществ притоков не выявил существенного влияния на микробиомы реки Селенги и озера Байкал: в литорали и пелагиали озера выявлены лишь некоторые речные бактериальные таксоны.

Ключевые слова: река Селенга, Селенгинское мелководье, физико-химические параметры, бактериальные сообщества, ген 16S рРНК, разнообразие, качество вод

DOI: 10.31857/S0026365624060146

Река Селенга является самым крупным притоком озера Байкал. Она поставляет в озеро за год в среднем около 30 км³ воды, что составляет половину всего притока (Атлас Байкала, 1993). При впадении в оз. Байкал Селенга образует обширную дельту с большим количеством протоков, стариц и пойменных озер площадью около 600 км² (Иванов и соавт., 2007). Самая большая протока дельты — Харауз, через которую в зависимости от сезона проходит 30–80% водного стока реки. Протока Средняя, расположенная в центральной части дельты, характеризуется переменным водообменом: полноводна в период паводков, имеет близкий к озерному режим в летнюю межень и полностью перемерзает в верхнем течении зимой (Томберг и соавт., 2006).

Большая часть годового стока (56%) р. Селенги формируется на территории России. В российской части в Селенгу впадает около 30 притоков, основные из них (Джида, Чикой, Темник, Хилок, Уда) находятся в пределах буферной экологической зоны озера Байкал. Воды рек Чикой, Джида и Темник характеризуются преимущественно дождевым типом питания, р. Уда — снеговым, а р. Баян-Гол подпитывается стоком из озера Гусиное, испытывающего значительную антропогенную нагрузку (Иванова, 2021). В бассейне Селенги расположено большое количество промышленных и сельскохозяйственных предприятий, а также населенных пунктов, сточные воды которых сбрасывают в реку и ее притоки. Наибольший объем загрязняющих

¹Дополнительные материалы размещены в электронном виде по DOI статьи: <https://doi.org/10.31857/S0026365624060146>

веществ в р. Селенгу вносятся с притоками Хилок и Чикой (Зомонова и соавт., 2014), в бассейнах которых осуществляется добыча полезных ископаемых (Государственный доклад, 2018). На качество воды р. Джиды оказывают влияние сбросы шахтных и дренажных вод недействующего ОАО “Джидинский вольфрамомолибденовый комбинат”, содержащие значительное количество меди, цинка, кадмия, фтора и сульфатов. В реку Уда осуществляется сброс сточных вод с ОАО “Авиационный завод” и с очистных сооружений Улан-Удэнской ТЭЦ-1.

Качество воды в Селенге на территории России во многом определяется качеством поступающих с монгольской территории вод и водным режимом. Неблагоприятные климатические условия в бассейне реки (длительное маловодье) привели к поступлению на российскую территорию вод, обогащенных сульфатами, соединениями фосфора, азота и ПАУ (Гармаев, Христофоров, 2010; Сорокикова и соавт., 2013). В летний и осенний периоды большое влияние оказывают дождевые паводки, химический состав которых определяется районами их формирования (Сорокикова и соавт., 1992, 1995; Синюкович и соавт., 2011; Томберг и соавт., 2020). Таксономический состав бактериальных сообществ р. Селенги и ее притоков не был изучен.

Микробные сообщества очень чувствительны к факторам окружающей среды (Smith, 2007; Zeglin, 2015; Balmonte et al., 2016; Mai et al., 2018; O'Brien et al., 2023). При изменении экологического состояния речных экосистем отмечена смена таксономического разнообразия бактериальных сообществ (Hooper et al., 2005; Xie et al., 2021). В ряде исследований показано влияние на структуру речных сообществ аллохтонной микрофлоры, поступающей с водами притоков или с выпадающими осадками (Crump et al., 2004; Fortunato, 2012; Read et al., 2015; Ruiz-Gonzalez et al., 2015). Привносимые аллохтонные вещества также оказывали влияние на спектр доминирующих источников углерода, питательных субстратов и, в конечном итоге, на состав микробных сообществ (Sinsabaugh, Findlay 2003; Balmonte et al., 2016; O'Brien et al., 2023). Еще одним фактором, определяющим разнообразие бактериальных сообществ, являлось изменение стока реки и ее притоков (Doherty et al., 2017; O'Brien et al., 2023), что ранее отмечено и в малых реках южной оконечности Байкала (Zemskaya et al., 2022).

Цель наших исследований — изучение разнообразия и структуры бактериальных сообществ в реке Селенге (на расстоянии 356 км), ее притоках и Селенгинском мелководье в период дождевого паводка в июле–августе, а также оценка влияния параметров окружающей среды на структуру бактериальных сообществ и, следовательно, на качество воды.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования и отбор образцов. Пробы воды отбирали в российской части р. Селенги, на устьевых участках некоторых ее притоков (реки Джиды, Темник, Баян-Гол, Чикой, Уда), в устьях двух проток дельты р. Селенги (Харауз (Kh) и Средняя (S)) и на Селенгинском мелководье, напротив этих проток (рис. 1). Исследовано 14 речных образцов, включая устья проток дельты и 28 проб, отобранных на акватории Селенгинского мелководья, в июле–августе 2021 года. В реках, включая Kh и S, пробы отбирали из поверхностного слоя воды; на Селенгинском мелководье — на расстояниях 1, 3, 5, 7 и 10 км от проток на трех горизонтах: из поверхностного и придонного слоев и из слоя в градиенте суммы ионов.

Физико-химические характеристики водной среды. В работе использовали комплекс гидрохимических и молекулярно-биологических методов. Вертикальное распределение температуры (T), суммы ионов (Sc), насыщения растворенного кислорода (O_2) в водной толще Селенгинского мелководья определяли многопараметрическим CTD-профилографом (water quality profiler) AAQ177 Rinko (“JFE Advantech”, Япония). Минерализацию рассчитывали по измеренной электропроводности воды с учетом уравнений зависимости от температуры, давления и ионного состава для условий байкальской воды (Блинов и соавт., 2006). В речных пробах температуру измеряли кондуктометром HORIBA ES-51 (Япония). Для анализа значений pH использовали pH-метр “Эксперт-001” (Россия) с комбинированным электродом и термокомпенсатором. Химический анализ проводили общепринятыми в гидрохимии пресных вод методами (Барам и соавт., 1999; Руководство ..., 2009; Wetzel, Likens, 2000). Общий азот, фосфор и органическое вещество анализировали в нефiltroванных образцах, биогенные элементы и главные ионы — в образцах, отфильтрованных через мембранные фильтры с диаметром пор 0.45 мкм. Концентрацию биогенных элементов определяли на спектрофотометре “UNICO-2100” (США): нитриты — с реактивом Грисса, аммонийный азот — индофенольным методом, фосфаты — методом Дениже–Аткинса с использованием хлорида двухвалентного олова в качестве восстановителя. Общий фосфор и азот измеряли на спектрофотометре после высокотемпературного окисления персульфатом калия, органическое вещество анализировали методами бихроматного (БО) и перманганатного окисления (ПО). Анионы (HCO_3^- , Cl^- , SO_4^{2-} , NO_3^-) определяли ВЖХ с непрямым УФ-детектированием (“Милихром А-О2”, Россия), ионы Ca^{2+} и Mg^{2+} — методом абсорбции, Na^+ и K^+ — плазменной эмиссией (“ААС-30”, Германия).

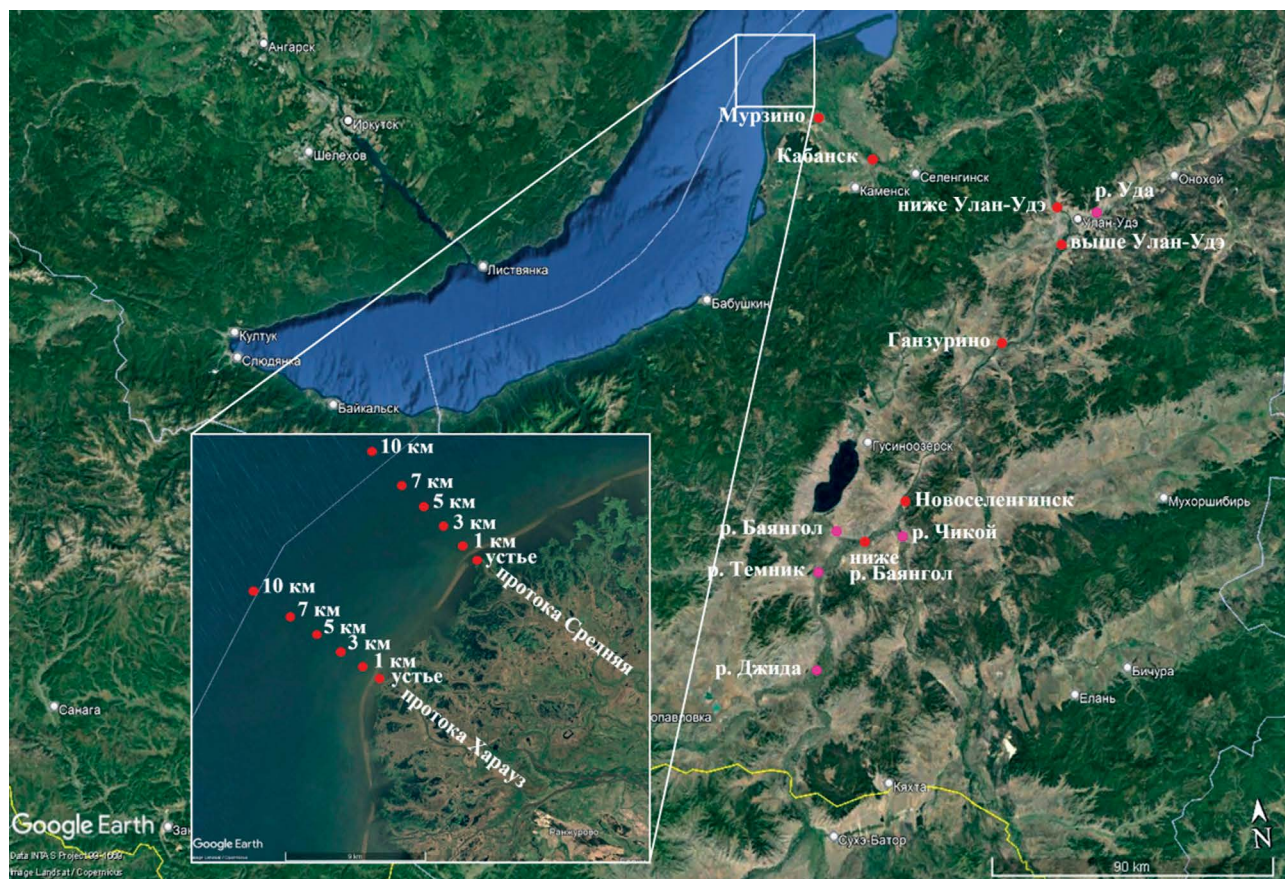


Рис. 1. Карта-схема района исследований и мест отбора проб, построенная с использованием карт Google Earth Pro <https://www.google.com/intl/ru/earth/ver-100sions/#earth-pro>. ● — приток.

Выделение ДНК и секвенирование. Пробы воды (1–2.5 л) фильтровали через мембраны (1–2 на пробу) диаметром 47 мм с размером пор 0.2 мкм (“Millipore”, Германия) с использованием вакуумного насоса. ДНК выделяли методом фенол-хлороформной экстракции (Sambrook et al., 1989). Для амплификации варибельной области V2–V3 гена 16S рРНК использовали универсальные праймеры B_V23F (5'-AGTGGCGGACGGGTGAGTAA) и B_V23R (5'-CCGCGGCTGCTGGCAC) (Sahm et al., 2013). Библиотеки ампликонов для анализа на приборе Illumina MiSeq готовили с использованием набора NEBNext Ultra II (“New England Biolabs”). Библиотеки анализировали с помощью набора Illumina MiSeq Standard Kit v.3 (“Illumina”) в Центре коллективного пользования “Геномные технологии, протеомика и клеточная биология” Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной микробиологии (г. Пушкин).

Биоинформатический и статистический анализы. Первичный биоинформатический анализ библиотек генов 16S рРНК проведен, как описано ранее (Захаренко и соавт., 2024 в печати). Дальнейший

анализ проводили в Mothur в соответствии с рекомендациями MiSeq SOP (Kozich et al., 2013). Последовательности группировали в операционные таксономические единицы (ОТЕ) на основе 97% сходства и классифицировали до отдельных бактериальных филотипов в соответствии с базой данных SILVA 138_1 (<http://www.arb-silva.de>). Чтобы свести к минимуму случайные ошибки секвенирования, ОТЕ с низким содержанием (<5 прочтений) были исключены из анализа. Все ресурсоемкие операции выполнены с использованием высокопроизводительного кластера “Академик В.М. Матросов” Центра коллективного пользования “Иркутский суперкомпьютерный центр СО РАН”. Данные секвенирования депонированы в архив GenBank, секцию SRA под номером PRJNA1114396.

Анализ факторов, влияющих на структуру бактериальных сообществ, проводили с помощью метода главных компонент (PCA). Сходство бактериальных сообществ оценивали путем расчета матрицы дистанций Брея–Кертиса, которая использована для построения графика непараметрического многомерного шкалирования (NMDS)

и тепловых карт, а также для выполнения иерархической кластеризации. Для сравнения разнообразия на уровне рода построена тепловая карта для 51 наиболее распространенного рода с относительной численностью $\geq 1\%$. Эти расчеты выполнены с использованием программных пакетов *cluster*, *vegan* и *heatmap* для языка R (<http://www.r-project.org/index.html>) в среде Rstudio (<http://www.rstudio.com/>). График NMDS визуализирован с помощью веб-инструмента MicrobiomeAnalyst (Chong et al., 2020), пакеты *ggplot2* и *ggbiplot* R использованы для визуализации графика PCA; *stats* использован для статистического анализа. Ближайшие гомологи для каждой последовательности 16S рРНК найдены с использованием алгоритма BLAST и базы данных NCBI nt (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Предсказание для сообществ относительной представленности генов, относимых к различным функциональным категориям из базы данных KEGG (Kanehisa, Goto, 2000), выполнено с помощью PICRUSt2 алгоритма (Douglas et al., 2020) путем поиска ближайшего гомологичного аннотированного референсного генома для каждой ОТЕ.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Физико-химические характеристики исследованных объектов приведены в таблице.

Уровень воды в р. Селенге в период отбора проб (гидропост г. Улан-Удэ) колебался от 173 см до 233 см, по данным Дальневосточного управления по гидрометеорологии и мониторингу окружающей среды. Эти значения превысили пороговое значение уровня воды в 230 см, что характеризовало исследуемый период как многоводный. Температура воды в реке Селенге и протоках ее дельты варьировала от 20.0 до 21.7°C, в притоках была ниже (16.1–19.1°C), за исключением р. Баян-Гол (28.1°C). На Селенгинском мелководье температура воды соответствовала периоду прямой стратификации, понижаясь с глубиной с 16.2 до 5.2°C. Воды исследуемого района охарактеризованы как нейтральные или слабощелочные (рН 7.19–8.68), наиболее низкие значения зарегистрированы в р. Селенге и ее притоках. Суммарное содержание главных ионов в отобранных образцах варьировало в широких пределах. В воде притоков Селенги наименьшие и наибольшие их значения выявлены в реках Чикой и Баян-Гол: 58 и 532 мг/л соответственно. В р. Селенге минерализация уменьшалась вниз по течению по мере разбавления водами притоков с низким содержанием солей: от 201 до 120 мг/л, а на Селенгинском мелководье снижалась с удалением от устьев проток: от 120 до 94 мг/л, что соответствует данным, полученным ранее (Сорокикова и соавт., 1995; Томберг и соавт., 2020).

Концентрация растворенного кислорода в воде изменялась от 7.1 до 12.96 мг/л, наиболее низкие значения этого показателя выявлены в речных водах (ниже 8.47 мг/л). Содержание биогенных элементов в воде р. Селенги и ее притоков было достаточно высоким, что объясняется поступлением азота и фосфора с бассейна в условиях паводка (таблица). Паводок же стал основной причиной повышения содержания органического вещества в воде: значения БО и ПО в период исследования составляли 5.0–16.5 и 1.6–4.6 мг С/л соответственно, с максимальными значениями в р. Баян-Гол.

Анализ физико-химических данных с помощью метода главных компонент выявил два кластера: первый включал речные пробы и поверхностную пробу на расстоянии 1 км от устья протоки Kh; второй – 27 образцов из зоны Селенгинского мелководья (рис. 2).

Наиболее отличались по анализируемым параметрам воды р. Баян-Гол, где наблюдались максимальные значения Т, Sc, Cl⁻, SO₄²⁻, HCO₃⁻, БО и ПО (таблица). Значения БО и ПО в водах Селенгинского мелководья были ниже, чем таковые в речных водах, что свидетельствует об активных процессах трансформации органического вещества в озере. На Селенгинском мелководье уменьшение концентрации главных ионов и биогенных элементов до значений, характерных для байкальских вод, наблюдалось уже на расстоянии 1 км от устья проток в основном за счет разбавления речной воды озерной.

Бактериальное α - и β -разнообразие. В результате секвенирования вариабельной области V2–V3 гена 16S рРНК получено 42 библиотеки, содержащих суммарно 1176002 фрагментов генов со средней длиной 378 п.н. (после выравнивания, кластеризации, удаления химер и ОТЕ, содержащих менее 5 последовательностей), которые объединены в 3992 ОТЕ на уровне сходства 97%. Количество ОТЕ в образцах варьировало от 376 до 2022, с минимальным количеством на глубине 5 м и на расстоянии один километр от устья протоки S и максимальным – в р. Уде. Альфа-разнообразие на разных участках реки Селенги оставалось относительно постоянным (дополнительные материалы, табл. S1). Индекс Шеннона, показатель богатства и равномерности, был выше для сообществ р. Селенги (4.32–4.59), исключая устье протоки S (2.84), по сравнению с притоками (3.38–4.23). В Селенгинском мелководье индекс Шеннона варьировал в более широких пределах (3.18–4.56). Наибольшее разнообразие видов (Chao 1, 1956–2821) также отмечено в р. Селенге, исключая устье протоки S (582), минимальное – в притоках (1066–2143) и Селенгинском мелководье (663–2027). Кривые разрежения, построенные для генетического расстояния 0.03 для сообществ Селенгинского мелководья, имели более крутой

Таблица. Химические параметры исследуемых проб воды. Т – температура, Sc – сумма ионов, БО – бихроматная окисляемость, ПО – перманганатная окисляемость. Нд – нет данных

Об-разцы	Место отбора, расстояние от устья протоки (км), глубина отбора (м)	pH	°C	мг/л	мг/л	мг/л			мг N/л		мг P/л	мг C/л	
			T	Sc	O ₂	HCO ₃ ⁻	Cl ⁻	SO ₄ ²⁻	NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻	PO ₄ ³⁻	ПО	БО
1	р. Джида	7.68	18.5	181	7.72	120.5	0.75	16.5	<0.010	0.12	0.001	2.3	8.1
2	р. Темник	7.29	16.1	92	8.29	58.2	0.17	11.5	0.012	0.09	0.001	2.4	7.9
3	р. Баян-Гол	7.87	28.1	532	Нд	326.4	13.67	50.4	<0.010	0.11	0.001	4.6	16.5
4	р. Чикой	7.3	18.3	58	8.47	38.8	0.23	4.0	<0.010	0.05	0.005	1.6	5.0
5	р. Уда	7.19	19.1	108	8.17	75.5	0.65	5.5	<0.010	0.08	0.020	2.3	5.5
6	р. Селенга (ниже р. Баян-Гол)	7.63	20.1	197	7.76	126.7	2.03	19.2	<0.010	0.10	0.007	3.1	7.3
7	р. Селенга (п. Новоселенгинск)	7.67	21.6	201	Нд	131.5	1.71	17.5	0.013	0.12	0.013	2.7	6.8
8	р. Селенга (с. Ганзурино)	7.67	21.6	174	7.22	116.3	1.36	14.6	<0.010	0.12	0.014	2.4	8.1
9	р. Селенга (выше г. Улан-Удэ)	7.72	21.1	174	7.27	115.6	1.38	14.4	<0.010	0.10	0.016	2.4	7.2
10	р. Селенга (ниже г. Улан-Удэ)	7.72	20.6	167	7.14	112.2	1.35	13.7	<0.010	0.13	0.016	1.7	7.5
11	р. Селенга (с. Кабанск)	7.74	20	160	8.34	107.2	1.32	12.9	<0.010	0.11	0.020	2.4	6.8
12	р. Селенга (с. Мурзино)	7.64	20.1	154	7.50	101.1	1.40	12.8	<0.010	0.11	0.018	2.3	6.8
13	р. Селенга (устье Kh)	8.35	20.3	109	Нд	71.9	0.97	8.4	0.025	0.11	0.021	2.8	6.4
14	р. Селенга (устье S)	8.68	21.7	120	7.1	85.2	0.44	5.4	<0.010	0.09	0.028	1.7	10.1
15	Kh 1 км 0 м	7.74	16.2	102	7.7	68.4	0.71	6.9	0.017	0.09	0.017	2.1	4.7
16	Kh 1 км 5 м	8.12	13	94	10.4	64.2	0.47	6.0	<0.010	0.04	0.007	1.2	2.9
17	Kh 3 км 0 м	8.39	12.1	97	10.7	66.3	0.56	6.3	<0.010	0.03	0.004	1.0	3.2
18	Kh 3 км 10 м	8.3	11.1	97	11.5	67.0	0.43	5.8	<0.010	0.03	0.002	0.8	1.7
19	Kh 3 км 18 м	8.52	8.9	96	12.0	66.3	0.44	5.6	<0.010	0.02	0.011	0.6	1.2
20	Kh 5 км 0 м	8.49	11.2	98	11.2	67.0	0.41	5.9	<0.010	0.03	0.004	0.8	3.0
21	Kh 5 км 10 м	8.46	9.8	98	11.7	67.7	0.38	5.8	<0.010	0.02	0.003	0.7	1.5
22	Kh 5 км 22 м	8.08	5.7	96	11.9	66.3	0.34	5.5	0.010	0.02	0.002	0.4	1.4
23	Kh 7 км 0 м	8.06	15.8	108	10.1	74.2	0.60	7.4	<0.010	0.04	0.006	1.7	5.1
24	Kh 7 км 15 м	8.16	8.9	100	12.1	70.4	0.44	6.1	0.010	0.01	0.003	0.5	1.3
25	Kh 7 км 27 м	7.99	6	98	12.9	68.5	0.43	6.0	0.010	0.02	0.001	0.3	1.3
26	Kh 10 км 0 м	8.29	14.7	102	10.9	70.4	0.51	6.8	<0.010	0.03	0.004	1.2	2.2
27	Kh 10 км 40 м	8.03	6	100	13	69.8	0.46	6.0	<0.010	0.03	0.002	0.3	1
28	Kh 10 км 100 м	7.92	5.7	97	13	67.2	0.40	5.9	0.010	0.05	0.004	0.2	1.4
29	S 1 км 0 м	8.07	14.8	104	10.2	70.6	0.62	7.0	<0.010	0.04	0.006	1.6	4.7
30	S 1 км 5 м	8.1	14.1	103	10.4	69.9	0.61	7.1	<0.010	0.04	0.006	1.3	4.6
31	S 3 км 0 м	8.13	14.8	104	10.4	70.6	0.52	7.1	<0.010	0.04	0.007	1.5	4.4
32	S 3 км 7 м	8.28	11.3	96	11.9	65.8	0.45	6.2	<0.010	0.02	0.003	0.8	2.7
33	S 3 км 23 м	7.97	6.3	95	12.5	65.1	0.42	5.8	<0.010	0.03	0.001	0.3	1.1
34	S 5 км 0 м	7.93	14.3	97	10.9	65.1	0.51	6.8	<0.010	0.04	0.004	1.4	3.7
35	S 5 км 10 м	8.26	8.9	96	12.7	65.8	0.42	6.0	<0.010	0.01	<0.001	0.5	1.3
36	S 5 км 45 м	7.87	5.8	96	12.5	65.4	0.39	5.9	<0.010	0.04	<0.001	0.2	1.1
37	S 7 км 0 м	8.42	12.8	96	11.9	65.8	0.46	6.0	<0.010	0.01	<0.001	0.6	2.4
38	S 7 км 20 м	7.97	6.6	94	12.5	65.1	0.42	5.7	0.011	0.03	0.002	0.3	2.3
39	S 7 км 75 м	7.9	5.1	94	12.7	65.1	0.41	5.6	<0.010	0.04	<0.001	0.2	1.2
40	S 10 км 0 м	8.38	12.2	96	12.4	65.8	0.47	6.0	<0.010	0.01	<0.001	0.5	2.2
41	S 10 км 15 м	8.22	7.7	106	12.5	76.9	0.42	5.7	<0.010	0.02	<0.001	0.3	1.8
42	S 10 км 190 м	7.69	5.2	97	10.8	67.2	0.48	5.5	<0.010	0.01	0.006	0.2	2.2

наклон, по сравнению с речными, предполагая, что текущая глубина секвенирования достаточна для получения полной информации о бактериальном разнообразии (данные не показаны).

Анализ β -разнообразия с использованием матрицы дистанций Брея–Кертиса показал разделение бактериальных сообществ на два кластера (речные и сообщества Селенгинского мелководья), что соответствовало кластеризации по химическому составу воды (рис. 3).

В речном кластере наиболее схожи сообщества из р. Селенги и устья протоки Kh, тогда как сообщество устья протоки S отличалось от всех анализируемых сообществ. Достоверность различий между кластерами подтверждена статистическими тестами PERMANOVA (значение F: 15.016; R-квадрат: 0.43505; значение p: 0.001) и ANOSIM (R: 0.77954; значение p < 0.001).

Филогенетическое разнообразие бактериальных сообществ. Проанализированные библиотеки 16S рРНК содержали 9 общих фил бактерий: *Acidobacteriota*, *Actinomycetota*, *Bacteroidota*, *Bdellovibrionota*, *Chloroflexota*, *Cyanobacteria*, *Patescibacteria*, *Pseudomonadota*, *Verrucomicrobiota*. Представители *Pseudomonadota* и *Actinomycetota* преобладали во всех сообществах, но *Pseudomonadota* — преимущественно в речных сообществах (51.71–76.83%), а *Actinomycetota* — в сообществах Селенгинского мелководья (17.28–66.32%). Вклад *Bacteroidota* в речных сообществах был выше (4.71–25%), чем на мелководье (0.89–11.59%). Сообщество устья протоки S отличалось от остальных отсутствием представителей класса *Alphaproteobacteria*, что отмечено нами и в зимний период (Захаренко и соавт., 2024 в печати).

Минорные группы (*Acidobacteriota*, *Bacteria_unclassified*, *Deinococcota*, *Dependentiae*,

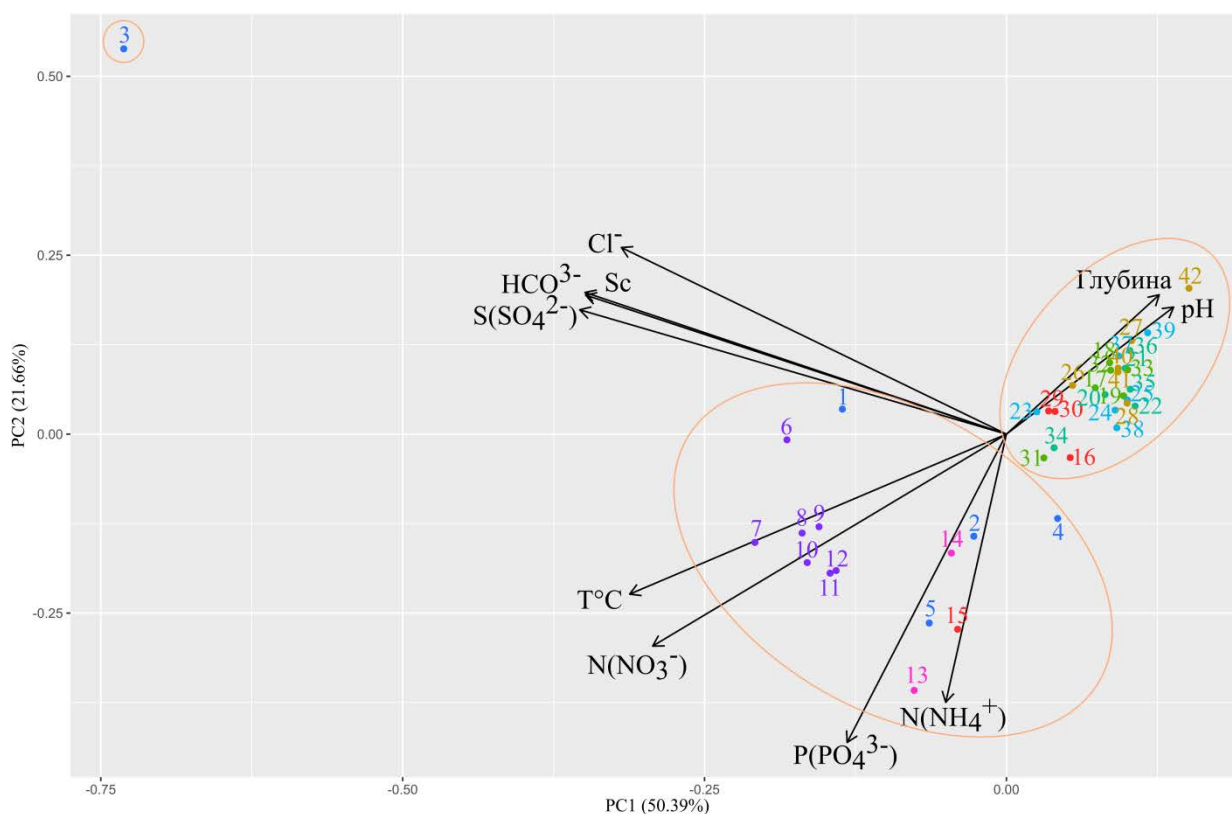


Рис. 2. Диаграмма рассеяния точек в пространстве первых двух главных компонент (PCA), построенная на основе физико-химических параметров. Стрелками отображены векторы, направленные по градиентам изменения исследуемых показателей в образцах. 1 — р. Джиды, 2 — р. Темник, 3 — р. Баян-Гол, 4 — р. Чикой, 5 — р. Уда, 6 — р. Селенга (ниже р. Баян-Гол), 7 — р. Селенга (п. Новоселенгинск), 8 — р. Селенга (с. Ганзурино), 9 — р. Селенга (выше г. Улан-Удэ), 10 — р. Селенга (ниже г. Улан-Удэ), 11 — р. Селенга (с. Кабанск), 12 — р. Селенга (с. Мурзино), 13 — устье Kh, 14 — устье S, 15 — Kh 1 км 0 м, 16 — Kh 1 км 5 м, 17 — Kh 3 км 0 м, 18 — Kh 3 км 10 м, 19 — Kh 3 км 18 м, 20 — Kh 5 км 0 м, 21 — Kh 5 км 10 м, 22 — Kh 5 км 22 м, 23 — Kh 7 км 0 м, 24 — Kh 7 км 15 м, 25 — Kh 7 км 27 м, 26 — Kh 10 км 0 м, 27 — Kh 10 км 40 м, 28 — Kh 10 км 100 м, 29 — S 1 км 0 м, 30 — S 1 км 5 м, 31 — S 3 км 0 м, 32 — S 3 км 7 м, 33 — S 3 км 23 м, 34 — S 5 км 0 м, 35 — S 5 км 10 м, 36 — S 5 км 45 м, 37 — S 7 км 0 м, 38 — S 7 км 20 м, 39 — S 7 км 75 м, 40 — S 10 км 0 м, 41 — S 10 км 15 м, 42 — S 10 км 190 м; ● — приток, ● — р. Селенга, ● — устья приток р. Селенги; расстояние от устья: ● — 1 км, ● — 3 км, ● — 5 км, ● — 7 км, ● — 10 км.

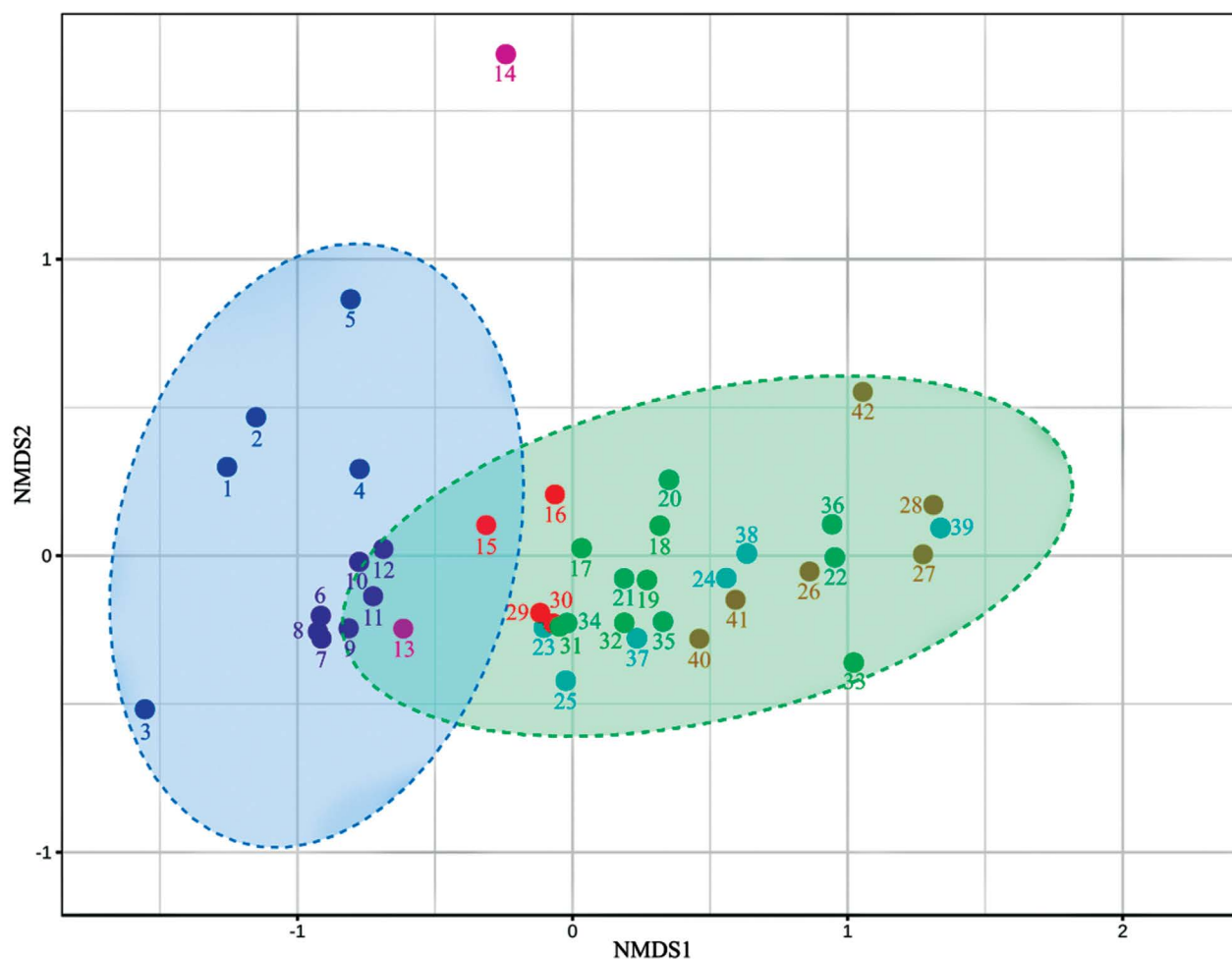


Рис. 3. График неметрического многомерного шкалирования (NMDS) несхожести бактериальных сообществ (бета-разнообразие для кластерного расстояния 0.03). Нумерация образцов приведена в таблице и в подписи к рис. 2.

Desulfobacterota, *Elusimicrobiota*, *Fibrobacterota*, *Firmicutes*, *Fusobacteriota*, *Gemmatimonadota*, *Margulisbacteria*, *Myxococcota*, *Nitrospirota*, *Planctomycetota*, *Proteobacteria_unclassified*, SAR324_clade(Marine_group_B), *Spirochaetota*, WPS-2), как правило, составляли менее 1% и в сумме не превышали 2.1% от общего количества последовательностей в сообществах.

Значительные различия таксономического состава между бактериальными сообществами исследуемых районов выявлены на уровне рода (рис. 4).

Следует отметить, что только 17 ОТЕ являлись общими для всех 42 образцов, которые составляли 0.43% от всего количества ОТЕ и 33.18% от общего количества чтений. Они относились к таким родам как *Limnohabitans*, *Polynucleobacter*, *hgcI_clade*, *Sporichthyaceae_unclassified*, *Luteolibacter*, *Rhodoluna*, *Rhodoferrax*, MWH-Ta3 (*Microbacteriaceae*), *Pseudarcicella*, *Candidatus_Planktoluna*, *Methylothera*, uncultured *Oxalobacteraceae*.

Доминирующую позицию во всех речных сообществах занимали бактерии родов *Limnohabitans* до 42.5% (*Gamma*proteobacteria) и *Rhodoluna* до 15.8%. В сообществах рек Джиды (15.2%), Чикой (12.2%), Уда (18.1%) и в устье протоки S (23%) в заметных количествах выявлены представители *Pseudarcicella* (*Bacteroidota*), которые используют различные вещества, обнаруженные в экссудатах водорослей (углеводы, аминокислоты, пируват), в качестве единственного источника углерода (Kämpfer et al., 2012; Shao et al., 2020).

В речных бактериальных сообществах выявлено 659 уникальных ОТЕ — это 16.51% от всего количества ОТЕ и 0.59% от общего количества чтений. Наиболее многочисленными из них принадлежали родам *Comamonadaceae_unclassified*, *Arcobacteraceae_unclassified*, *Sulfuricurvum*, *Saccharimonadales_unclassified*, *Limnohabitans* (другая ОТЕ), *Rhodocyclaceae_unclassified*.

Сообщества притоков различались между собой и от сообществ селенгинских вод наличием

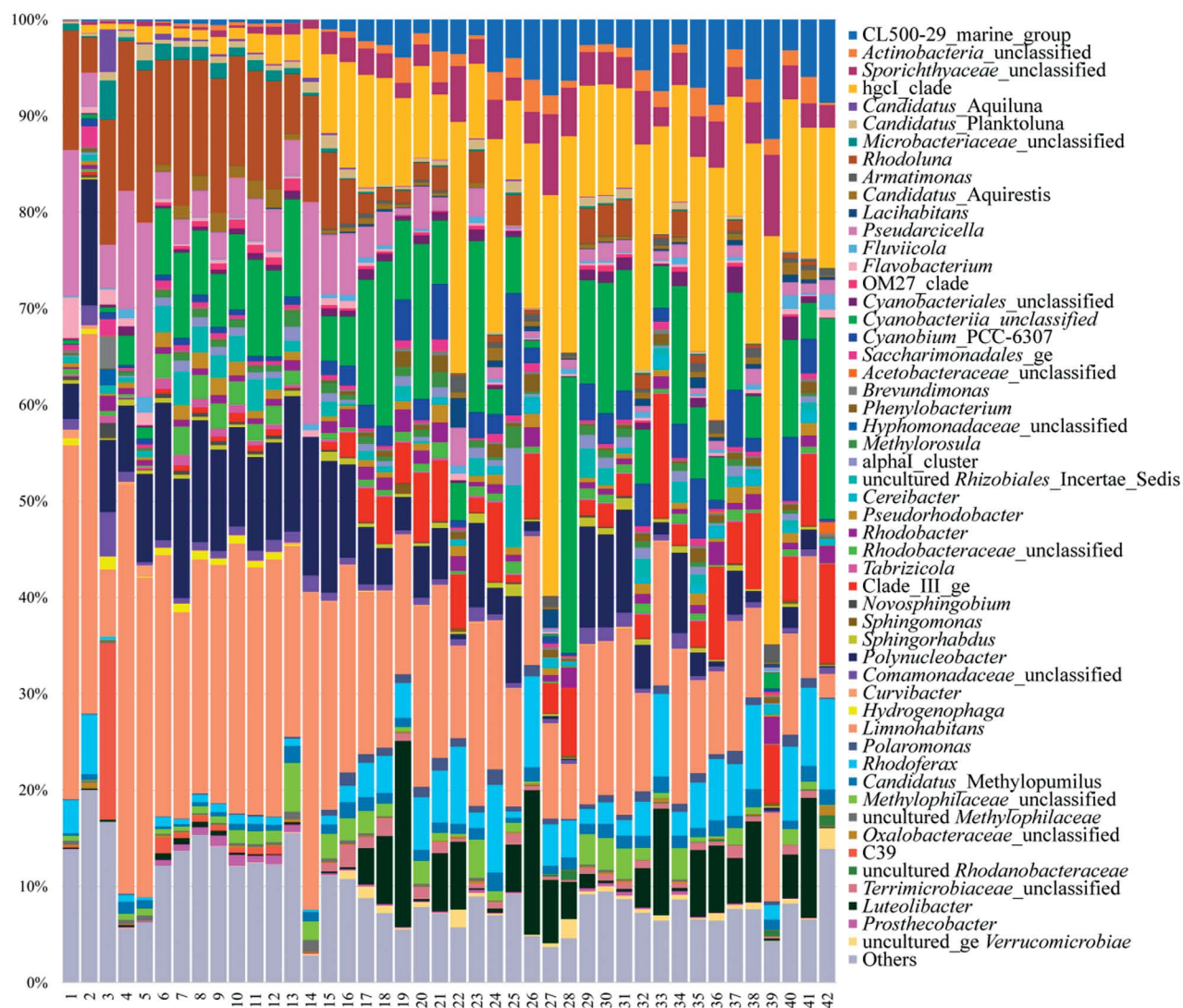


Рис. 4. Таксономический состав на уровне рода бактериальных сообществ исследуемых проб воды по результатам анализа фрагментов гена 16S рРНК. Нумерация образцов приведена в таблице и в подписи к рис. 2.

родов, вклад которых не превышал 4.5%, за исключением сообщества р. Баян-Гол. В последнем доминировали последовательности рода C39 (18%, *Gammaproteobacteria*), вклад которых в других сообществах был минимальным либо отсутствовал. Кроме того, в сообществе р. Баян-Гол отмечена максимальная относительная численность последовательностей *Candidatus_Aquiluna* (4.4%), *Microbacteriaceae_unclassified* (4%), *Brevundimonas* (3.3%), *Hyphomonadaceae_unclassified* (1.7%), *Novosphingobium* (1.5%), *Comamonadaceae_unclassified* (4.6%), и низкая — последовательностей *Limnohabitans* (7%), в сравнении с другими речными сообществами.

Анализ пространственной изменчивости не выявил существенных различий в относительной численности доминирующих родов бактериальных

сообществ между различными участками реки Селенги и устьем протоки Kh, несмотря на поступление с притоками аллохтонной микрофлоры: относительная численность *Limnohabitans* варьировала от 19.8 до 28%, *Polynucleobacter* — 9.7–14.3%, *Rhodoluna* — 6.2–15.2%, *Cyanobacteriia_unclassified* — 5.6–10.1% (рис. 4).

Отчетливые изменения в составе бактериальных сообществ, сопряженные с физико-химическими условиями, отмечены в зоне смешения речных вод с озерными. Бактерии рода *Limnohabitans*, доминировавшие в реках, в сообществах Селенгинского мелководья составляли существенно меньшую долю (8.6–21.5%), а в пелагиали Байкала на расстоянии 10 км от устьев протоков р. Селенги их вклад понижался до 2.5%. Количество последовательностей ультрамикробактерии рода *Polynucleobacter*

(*Gammaproteobacteria*), составляющих значительный процент в речных сообществах, уменьшалось по мере удаления в открытый Байкал.

В сообществах Селенгинского мелководья наблюдалось возрастание относительной численности фил *Actinomyces*, *Cyanobacteria* и *Verrucomicrobiota*, а также количества последовательностей бактерий родов *Rhodospirillum* (*Gammaproteobacteria*) и *Clade III* (*SAR11*, *Alphaproteobacteria*). Наиболее многочисленная ОТЕ клады *SAR11* имела 100% сходство с *Candidatus Fonsibacter ubique* (KY290650), которая является типичным представителем пелагиали озера Байкал (Cabello-Yeves et al., 2020). Только в воде Селенгинского мелководья выявлены представители таких родов, как *CL500-29_marine_group*, *Armatimonas*, *Lacihabitans*, *Cyanobacteriia_unclassified*, *SAR11_clade* (*Clade Ia*), *Flavobacterium*, *Fluviicola*, *Bacteria_unclassified*, *env.OPS_17_ge* (*Sphingobacteriales*), *Alkanindiges*. Количество ОТЕ, принадлежащих данным родам, составляло 574 — это 14.38% от всего количества ОТЕ и 2.71% от общего количества чтений.

Представители *Actinomyces* в речных сообществах в значительной мере представлены бактериями рода *Rhodospirillum*, а в сообществах мелководья — последовательностями *hgcl_clade*, *Sporichthyaceae_unclassified* и *CL500-29_marine_group*, которые часто находят в пресноводных озерах разного трофического статуса. Аналогичная дифференциация актинобактерий выявлена в сообществах придельтовой акватории р. Селенги в зимний период (Bashenkhaeva et al., 2023; Захаренко и соавт., 2024 в печати) и в приустьевой акватории малых рек Южного Байкала в летний период (Zemskaya et al., 2022).

На тепловой карте корреляционных связей между доминирующими родами бактерий и физико-химическими параметрами (рис. S1) выявлено два кластера: один включает роды, преобладающие в сообществах Селенгинского мелководья; второй — роды, преобладающие в речных сообществах. Преобладающие в Селенгинском мелководье и открытом Байкале представители родов *Clade III*, *Rhodospirillum*, *CL500-29_marine_group* отрицательно коррелировали с концентрациями главных ионов, биогенных элементов, значениями химического окисления органических веществ (БО и ПО) и температурой, а также положительно коррелировали с глубиной водной толщи. Доминирующие в речных образцах последовательности родов *Rhodospirillum*, *Polynucleobacter*, *S39* положительно взаимосвязаны с теми же физико-химическими параметрами и отрицательно — с глубиной и pH.

Предсказанные для сообществ относительные доли генов из различных функциональных “KEGG” категорий показали, что в реках и поверхностных образцах Селенгинского мелководья более распространены пути азотного и серного

метаболизма, биосинтез и метаболизм гликанов, а также метаболизм и биосинтез таких кофакторов и витаминов, как фолат и порфирин (рис. S2). Схожие пути метаболизма отмечены для сообществ четырех притоков (исключая сообщества р. Баян-Гол) и устья протоки S, где преобладали пути биосинтеза и биodeградации комплекса аминокислот; деградации бензоата; метаболизма бутаноата, гликоксилатного и дикарбоксилатного метаболизма и деградации жирных кислот. Пути предсказанного метаболизма для сообществ р. Селенги хотя и были схожи с таковыми притоков и поверхностных образцов Селенгинского мелководья, но формировали отдельную кладу.

Для бактериальных сообществ Селенгинского мелководья велика относительная доля генов путей метаболизма углеводов (цитратный цикл, метаболизм пирувата, крахмала, сахарозы, фруктозы, маннозы и др.) и различных аминокислот. Максимальная доля генов этих путей выявлена в сообществах из глубинных слоев водной толщи на расстоянии 7 км и 10 км от проток. В этих сообществах отмечено преобладание генов, отвечающих за энергетический метаболизм (фиксация углерода у фотосинтезирующих организмов, метаболизм метана, окислительное фосфорилирование); метаболизм кофакторов и витаминов; метаболизм нуклеотидов; метаболизм лекарств и биосинтез монобактама.

ОБСУЖДЕНИЕ

Река Селенга — основной приток озера Байкал, поэтому оценка качества поступающих в нее вод и аллохтонных организмов была предметом неоднократных исследований в периоды с разной водностью (Сорокикова и соавт., 1992, 1995; Синюкович и соавт., 2010; Ковадло и соавт., 2010; Сулова и соавт., 2017; Томберг и соавт., 2020). В период летнего паводка 2021 г. на российском участке Селенги отмечены более высокие концентрации гидрокарбонат-, сульфат- и хлорид-ионов по сравнению с маловодным периодом (Синюкович и соавт., 2010; Сорокикова и соавт., 2013), что обусловлено формированием паводковой волны в засушливых районах Монголии, выходом речных вод на пойму и растворением солей, накопившихся в почве за сухой период. Подобные ситуации были отмечены и ранее, например, в августе 1993 г. (Сорокикова и соавт., 1995). На российской части реки Селенги вниз по течению выявлена тенденция постепенного уменьшения химических показателей (щелочности, минерализации, концентраций сульфат- и хлорид-ионов), что ранее отмечено и в других крупных реках (например, Дунай) (Liska et al., 2008). Воды р. Селенги отличались от большинства рек, впадающих в озеро, более высокими значениями

минерализации и других химических параметров (Вотинцев и соавт., 1965). Маломинерализованные воды притоков оказывали на Селенгу локальное воздействие, разбавляя ее воды и тем самым уменьшая содержание солей в ней. Аналогичное влияние притоков на селенгинские воды было отмечено в предыдущих исследованиях (Сороковикова и соавт., 2009; Синюкович и соавт., 2010; Чебыкин и соавт., 2012; Томберг и соавт., 2020). Содержание биогенных элементов и органического вещества в речной воде в паводок было более высоким по сравнению с наблюдаемыми в межень, что обусловлено поступлением этих компонентов с бассейна. Таким образом, полученные нами данные согласуются с выводами Сороковиковой и соавторов (2013) о влиянии водности и антропогенной нагрузки на химический состав вод реки Селенги и ее притоков.

По-прежнему, мощным фильтром для селенгинских вод является дельта реки с многочисленными протоками, которые различаются по глубине, скоростям течений, водному стоку (Дельта..., 2008). Благодаря активным биохимическим процессам в дельте и разбавлению речных вод на Селенгинском мелководье, уже на расстоянии 1 км от протока воды по химическим и микробиологическим данным в разные периоды наблюдений мало отличались от таковых в пелагиали озера Байкал (Sorokovikova et al., 2013; Томберг и соавт., 2014; Домышева и соавт., 2019; Захаренко и соавт., 2024 в печати). Наличие так называемых “барьерных зон”, защищающих пелагиаль озера Байкал от чуждых его экосистеме веществ, было подтверждено ранее в районах впадения крупных (Селенги и Верхней Ангары) и малых рек Южного Байкала (Максименко и соавт., 2008, 2012; Zemskaya et al., 2022).

Таксономический состав микробных сообществ ранее был исследован лишь в воде Селенгинского мелководья с использованием метода флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) (Максименко и соавт., 2008) и с помощью высокопроизводительного секвенирования (Bashenkaeva et al., 2023; Захаренко и др., 2024 в печати). По нашим данным, структура бактериальных сообществ и метаболический потенциал в р. Селенге и ее притоках отличались от наблюдаемых в Селенгинском мелководье. Как и в других реках мира, в исследованных нами экотопах наиболее многочисленны бактериальные таксоны *Pseudomonadota* и *Actinomycetota*, встречающиеся во всех сообществах в разных пропорциях. Доминирование бактерий этих фил также отмечено в речном бактериопланктоне рек Миссисипи (Staley et al., 2013), Енисей (Kolmakova et al., 2014), Темза (Read et al., 2015), Дунай (Savio et al., 2015), Сена (Bagagnan et al., 2024) и малых реках Южного Байкала (Zemskaya et al., 2022).

Представители данных таксонов часто доминировали в озерах (Newton et al., 2011), в том числе в пелагиали оз. Байкал (Zakharenko et al., 2019). Одним из факторов распределения клад и триб *Actinomycetota* является pH (Newton et al., 2011), что согласуется и с нашими данными. Относительная численность доминирующих родов и клад актинобактерий коррелировала с глубиной, температурой, БО и ПО, что свидетельствует о широком спектре факторов, влияющих на развитие этого таксона в исследуемых районах.

Различие между речными и озерными сообществами достоверно сопряжено с глубиной водной толщи. В Селенгинском мелководье преобладали представители родов *Clade III ge*, *Rhodoferrax*, *CL500-29_marine_group*, положительно коррелирующие с этим параметром, тогда как в речных сообществах доминировали последовательности родов *Rhodoluna*, *Polynucleobacter* и *C39*, отрицательно связанные с глубиной и pH. Представители этих родов являются участниками различных метаболических процессов. Например, бактерии родов *Rhodoluna* и *Pseudarcicella* способны ассимилировать аммоний и другие биогенные элементы (Hahn, 2016; Horsley, 1979), представители *CL500-29_marine_group* – различные органические вещества (Gómez-Consarnau et al., 2012), а бактерии рода *Rhodoferrax* – участвовать в круговороте углерода, денитрификации, окислении серы и широкого спектра органических доноров электронов (Finneran et al., 2003; Jin et al., 2020). Широкие метаболические возможности таксонов могут объяснить сходство предсказанного метаболического потенциала сообществ, несмотря на различие таксономического состава и доминирующих родов бактерий.

Структура бактериальных сообществ притоков и р. Селенги не была идентичной, что ранее отмечено и при исследовании сообществ притоков рек Желтой и Миссисипи (Zhao et al., 2020; Payne et al., 2017). На разных участках р. Селенги таксономический состав бактериальных сообществ мало различался, что наблюдалось и в р. Сена (Bagagnan et al., 2024). Сравнительный анализ разнообразия сообществ притоков не выявил их существенного влияния на микробиом Селенги. Это может быть обусловлено существованием на всем протяжении реки Селенги устойчивого “основного бактериального сообщества”, существование которого в реках было предложено Staley et al. (2013). К основным представителям такого сообщества в р. Селенге могут быть отнесены бактерии родов *Limnohabitans*, *Pseudarcicella*, *Rhodoluna* и *Polynucleobacter*, которые доминировали и в малых реках Южного Байкала (Zemskaya et al., 2019, 2022) и которые обладают широким метаболическим потенциалом. *Polynucleobacter* – космополитный род бактерий, рост которого в основном

зависит от органических кислот, высвобождаемых в результате фотохимического расщепления сложного растворенного органического вещества (Watanabe et al., 2009; Jezberová et al., 2010). По данным Balmonde et al., 2016, экофизиологическая гибкость представителей *Limnohabitans* позволяет им выживать в мутных, насыщенных органическим углеродом и гипоксических паводковых водах. Кроме того, бактерии *Limnohabitans* и *Pseudarcicella* могут быть потенциальными индикаторами восстановления речных экосистем (Yang et al., 2019).

В бактериальных сообществах Селенгинского мелководья в летний и в зимний периоды доминирующими таксонами являлись представители *Pseudomonadota*, *Actinomycetota*, *Cyanobacteria* (Захаренко и соавт., 2024 в печати). Представители этих филумов хотя и были сходными на уровне рода, но различались вкладом в разных сообществах. Например, вклад представителей *Gammaproteobacteria* в бактериальные сообщества в зимний и летний периоды варьировал от 13.3 до 49% и от 8.2 до 25% соответственно, а представителей *Campylobacterota*, представленных в основном сероокисляющими родами *Sulfuricurvum* и *Sulfurospirillum*, не превышал 12.8 и 0.3% соответственно. Изменчивость в структуре сообществ, скорее всего, является следствием влияния комплекса гидрологических и физико-химических факторов, достоверно взаимосвязанных ($p_{\text{value}} < 0.05$) с относительной численностью разных таксонов.

Как следует из наших данных, доминирующие в речных сообществах роды бактерий отсутствовали или вносили небольшой вклад в сообщества мелководья, что свидетельствует о незначительном влиянии бактериального сообщества реки Селенги на озерные. О похожей закономерности в районах впадения рек в озера сообщалось ранее (Cavaco et al., 2019; Mohiuddin et al., 2019; Nakatsu, et al., 2019; Xie et al., 2021). Как и в других экосистемах (лотических, озерных), основными факторами, влияющими на структуру и разнообразие бактериальных сообществ в исследуемых нами реках и Селенгинском мелководье, являлись температура, pH, содержание биогенных элементов, органического вещества и глубина водной толщи. Также очевидно, что микроорганизмы, поступающие с водами реки Селенги, оказывают локальное влияние на микробиом озера Байкал.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Микробиологические исследования выполнены в рамках государственного задания ЛИН СО РАН 0279-2022-0004. В рамках государственного задания ЛИН СО РАН 0279-2021-0005 выполнены гидрохимические исследования.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Атлас Байкала. Под ред. Галазия Г.И. М: Роскартография, 1993. 160 с.
- Барам Г.И., Верещагин А.Л., Голобокова Л.П. Применение микроколоночной высокоэффективной жидкостной хроматографии с УФ-детектированием для определения анионов в объектах окружающей среды // Журнал аналитической химии. 1999. Т. 54. С. 962–965.
- Блинов В.В., Гранин Н.Г., Гнатовский Р.Ю., Жданов А.А., Римкус С. Определение водных масс в озере Байкал методом ТС-анализа // География и природ. ресурсы. 2006. № 2. С. 63–69.
- Вотинцев К.К., Глазунов И.В., Толмачева А.П. Гидрохимия рек бассейна озера Байкал. М.: Наука, 1965. 492 с.
- Гармаев Е.Ж., Христофоров А.В. Водные ресурсы рек бассейна озера Байкал: основы их использования и охраны. Новосибирск: Академическое изд-во "Гео", 2010. 231 с.
- Государственный доклад "О состоянии озера Байкал и мерах по его охране в 2017 году". Иркутск: АНО "КЦ Эксперт", 2018. 340 с.
- Дельта реки Селенги – естественный биофильтр и индикатор состояния озера Байкал. Под ред. Тулохонова А.К., Плюснина А.М. Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2008. 314 с.
- Домышева В.М., Сорокикова Л.М., Синюкович В.Н., Онищук Н.А., Сакирко М.В., Томберг И.В., Жученко Н.А., Голобокова Л.П., Ходжер Т.В. Ионный состав воды озера Байкал, его притоков и истока реки Ангара в современный период // Метеорология и гидрология. 2019. № 10. С. 77–86.
- Domysheva V.M., Sorokovikova L.M., Sinyukovich V.N., Onishchuk N.A., Sakirko M.V., Tomberg I.V., Zhuchenko N.A., Golobokova L.P., Khodzher T.V. Ionic composition of water in Lake Baikal, its tributaries, and the Angara River source during the modern period // Russ. Meteorol. Hydrol. 2019. V. 44. P. 687–694.
- Захаренко А.С., Томберг И.В., Суслова М.Ю., Букин С.В., Блинов В.В., Земская Т.И. Структура бактериальных сообществ в зоне впадения реки Селенги в озеро Байкал // Водные ресурсы. 2024. В печати.

- Зомонова Э.М., Гомбоев Б.О., Зандакова А.Б. Моделирование переноса загрязняющих веществ по реке Селенге на территории Монголии и России // Водное хозяйство России. 2014. № 6. С.4–21.
- Иванов В.В., Каратаев В.Н., Лабутина И.А. Морфология и динамика дельты р. Селенги // Вест. Моск. ун-та. Сер. 5: География. 2007. № 4. С. 48–54.
- Иванова О.И. Анализ составляющих водного баланса речных бассейнов в период формирования дождевых паводков рек Селенга и Онон // Общество. Среда. Развитие. 2021. № 1. С. 127–139.
- Ковадло А.С., Дрюккер В.В. Изучение бактериопланктона реки Селенги и оценка качества вод по микробиологическим показателям // Известия ИГУ. Серия “Науки о земле”. 2010. Т. 3. № 2. С. 80–87.
- Максименко С.Ю., Земская Т.И., Павлова О.Н., Иванов В.Г., Бурюхаев С.П. Микробное сообщество водной толщи на биогеохимическом барьере “река Селенга–озеро Байкал” // Микробиология. 2008. Т. 77. С. 660–667.
- Maksimenko S.Yu., Zemskaya T.I., Pavlova O.N., Ivanov V.G., Buryukhaev S.P. Microbial community of the water column of the Selenga River-Lake Baikal biogeochemical barrier // Microbiology (Moscow). 2008. V. 77. P. 587–594.
- Максименко С.Ю., Иванов В.Г., Бурюхаев С.П., Шимараев М.Н., Земская Т.И. Структура микробных сообществ в зоне впадения р. Верхняя Ангара в оз. Байкал // Гидробиол. журнал. 2012. Т. 48. № 2. С. 55–68.
- Maksimenko S.Yu., Ivanov V.G., Buryukhaev S.P., Shimarayev M.N., Zemskaya T.I. Structure of microbial communities in the zone of emptying the upper Angara River into Lake Baikal // Hydrobiol. J. 2012. V. 48. № 4. P. 53–65.
- Руководство по химическому анализу поверхностных вод суши. Под ред. Боевой Л.В. Ростов-на-Дону: НОК, 2009. 1045 с.
- Синюкович В.М., Сорокикова Л.М., Томберг И.В., Тулохонов А.К. Изменение климата и химический сток реки Селенги // ДАН (Науки о земле). 2010. Т. 433. С. 817–821.
- Сорокикова Л.М., Авдеев В.В. Первичная продукция и деструкция органического вещества р. Селенги // Водные ресурсы. 1992. № 5. С. 163–165.
- Сорокикова Л.М., Поповская Г.И., Томберг И.В., Синюкович В.Н., Кравченко О.С., Мариняте И.И., Башенхаева Н.В., Ходжер Т.В. Качество воды р. Селенга на границе с Монголией в начале XXI в // Метеорология и гидрология. 2013. № 2. С. 93–103.
- Sorokovikova L.M., Popovskaya G.I., Tomberg I.V., Sinyukovich V.N., Kravchenko O.S., Marinaite I.I., Bashenkhaeva N.V., Khodzher T.V. The Selenga River water quality on the border with Mongolia at the beginning of the 21st century // Russ. Meteorol. Hydrol. 2013. V. 38. P. 126–133.
- Сорокикова Л.М., Синюкович В.Н., Дрюккер В.В., Потемкина Т.Г., Нецветаева О.Г., Афанасьев В.А. Экологические особенности р. Селенги в условиях наводнения // География и природ. ресурсы. 1995. № 4. С. 64–71.
- Сорокикова Л.М., Синюкович В.Н., Нецветаева О.Г., Томберг И.В., Селько Н.П. Поступление сульфатов и азота в озеро Байкал с водами его притоков // География и природ. ресурсы. 2009. № 1. С. 61–65.
- Суслова М.Ю., Пестунова О.С., Парфенова В.В. Оценка качества вод р. Селенги и ее дельты по санитарно-микробиологическим показателям // Гидробиол. журнал. 2017. Т. 53. № 1. С. 74–84.
- Suslova M.Yu., Pestunova O.S., Parfenova V.V. Water quality assessment in the Selenga River and its delta in terms of sanitary and microbiological indices // Hydrobiol. J. 2017. V. 53. № 3. P. 70–81.
- Томберг И.В., Синюкович В.Н., Сорокикова Л.М., Раднаева Л.Д., Павлов И.А., Ширеторова В.Г., Чернышов М.С., Тулохонов А.К. Особенности химического состава вод реки Селенги в период зимней межени 2017–2018 года // География и природ. ресурсы. 2020. Т. 41. № 3. С. 81–88.
- Томберг И.В., Сорокикова Л.М., Поповская Г.И., Башенхаева Н.В., Синюкович В.Н., Иванов В.Г. Динамика концентраций биогенных элементов и фитопланктона в устье р. Селенги и на Селенгинском мелководье (оз. Байкал) // Водные ресурсы. 2014. Т. 41. С. 596–605.
- Tomberg I.V., Sorokovikova L.M., Popovskaya G.I., Bashenkhaeva N.V., Sinyukovich V.N., Ivanov V.G. Concentration dynamics of biogenic elements and phytoplankton at Selenga R. Mouth and in Selenga Shallows (Lake Baikal) // Water Resources. 2014. V. 41. P. 687–696.
- Томберг И.В., Сорокикова Л.М., Синюкович В.Н., Погодаева Т.В. Сток ионов в дельте р. Селенги в условиях малой водности // Метеорология и гидрология. 2006. № 12. С. 87–95.
- Чебыкин Е.П., Сорокикова Л.М., Томберг И.В., Воднева Е.Н., Рассказов С.В., Ходжер Т.В., Грачев М.А. Современное состояние вод р. Селенги на территории России по главным компонентам и следовым элементам // Химия в интересах устойчивого развития. 2012. Т. 20. С. 613–631.
- Chebykin E.P., Sorokovikova L.M., Tomberg I.V., Rasskazov S.V., Khodzher T.V., Grachev M.A. Current state of the Selenga River waters in the russian territory concerning major components and trace elements // Chem. Sustain. Develop. 2012. V. 20. P. 561–580.
- Bagagnan S., Guérin-Rechdaoui S., Rocher V., Alphonse V., Moilleron R., Jusselme M.D. Spatial and temporal characteristics of microbial communities in the Seine River in the greater Paris area under anthropogenic perturbation // Heliyon. 2024. V. 10. I. 9. Art. e30614.
- Balmonte J.P., Arnosti C., Underwood S., McKee B.A., Teske A. Riverine bacterial communities reveal environmental disturbance signatures within the

- Betaproteobacteria* and *Verrucomicrobia* // Front. Microbiol. 2016. V. 7. Art. 1441.
- Bashenkhaeva M., Yeletskaya Y., Tomberg I., Marchenkov A., Titova L., Galachyants Y. Free-living and particle-associated microbial communities of Lake Baikal differ by season and nutrient intake // Diversity. 2023. V. 15. Art. 572.
- Cabello-Yeves P.J., Zemskaya T.I., Zakharenko A.S., Sakirko M.V., Ivanov V.G., Ghai R., Rodriguez-Valera F. Microbiome of the deep Lake Baikal, a unique oxic bathypelagic habitat // Limnol. Oceanogr. 2020. V. 65. P. 1471–1488.
- Cavaco M.A., St Louis V.L., Engel K., St Pierre K.A., Schiff S.L., Stibal M., Neufeld J.D. Freshwater microbial community diversity in a rapidly changing High Arctic watershed // FEMS Microbiol. Ecol. 2019. V. 95. Art. fiz161.
- Chong J., Liu P., Zhou G., Xia J. Using MicrobiomeAnalyst for comprehensive statistical, functional, and meta-analysis of microbiome data // Nat. Protoc. 2020. V. 15. P. 799–821.
- Crump B.C., Hopkinson C.S., Sogin M.L., Hobbie J.E. Microbial biogeography along an estuarine salinity gradient: combined influences of bacterial growth and residence time // Appl. Environ. Microbiol. 2004. V. 70. P. 1494–1505.
- Doherty M., Yager P.L., Moran M.A., Coles V.J., Fortunato C.S., Krusche A.V., Medeiros P.M., Payet J.P., Richey J.E., Satinsky B.M., Sawakuchi H.O., Ward N.D., Crump B.C. Bacterial biogeography across the amazon river-ocean continuum // Front. Microbiol. 2017. V. 8. Art. 882.
- Douglas G.M., Maffei V.J., Zaneveld J.R., Yurgel S.N., Brown J.R., Taylor C.M., Huttenhower C., Morgan G.I. Lan-gillePICRUSt2 for prediction of metagenome functions // Nat. Biotechnol. 2020. V. 38. P. 685–688.
- Finneran K.T., Johnsen C.V., Lovley D.R. *Rhodoferrax ferrireducens* sp. nov., a psychrotolerant, facultatively anaerobic bacterium that oxidizes acetate with the reduction of Fe(III) // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2003. V. 53. P. 669–673.
- Fortunato C., Herfort L., Zuber P., Baptista A.M., Crump B.C. Spatial variability overwhelms seasonal patterns in bacterioplankton communities across a river to ocean gradient // ISME J. 2012. V. 6. P. 554–563.
- Gómez-Consarnau L., Lindh M.V., Gasol J.M., Pinhassi J. Structuring of bacterioplankton communities by specific dissolved organic carbon compounds // Environ. Microbiol. 2012. V. 14. P. 2361–2378.
- Hahn M.W. *Rhodoluna* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. New York: John Wiley & Sons, 2016. P. 1–9.
- Hooper D.U., Chapin F.S., Ewel J., Hector A., Inchausti P., Lavorel S., Lawton J.H., Lodge D., Loreau M., Naeem S., Schmid B., Setälä H., Symstad A.J., Vandermeer J., Wardle D.A. Effects of biodiversity on ecosystem functioning: a consensus of current knowledge // Ecol. Monogr. 2005. V. 75. P. 3–35.
- Horsley R.W. The Heterotrophic, Nitrate-Reducing Bacterial Flora of Grasmere, English Lake District // J. Appl. Bacteriol. 1979. V. 46. P. 507–520.
- Jezberová J., Jezbera J., Brandt U., Lindström E.S., Langenheder S., Hahn M.W. Ubiquity of *Polynucleobacter necessarius* ssp. *asymbioticus* in lentic freshwater habitats of a heterogeneous 2000 km² area // Environ. Microbiol. 2010. V. 12. P. 658–669.
- Jin C.-Z., Zhuo Y., Wu X., Ko S.-R., Li T., Jin F.-J., Ahn C.-Y., Oh H.-M., Lee H.-G., Jin L. Genomic and metabolic insights into denitrification, sulfur oxidation, and multidrug efflux pump mechanisms in the bacterium *Rhodoferrax sediminis* sp. nov. // Microorganisms. 2020. V. 8. Art. 262.
- Kämpfer P., Busse H.J., Longaric I., Rosselló-Móra R., Galatis H., Lodders N. *Pseudarcicella hirudinis* gen. nov., sp. nov., isolated from the skin of the medical leech *hirudo medicinalis* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2012. V. 62. P. 2247–2251.
- Kanehisa M., Goto S. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes // Nucleic Acids Res. 2000. V. 28. P. 27–30.
- Kolmakova O.V., Gladyshev M.I., Rozanov A.S., Peltek S.E., Trusova M.Y. Spatial biodiversity of bacteria along the largest Arctic River determined by next-generation sequencing // FEMS Microbiol. Ecol. 2014. V. 89. P. 442–450.
- Kozich J.J., Westcott S.L., Baxter N.T., Highlander S.K., Schloss P.D. Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform // Appl. Environ. Microbiol. 2013. V. 79. P. 5112–5120.
- Liška I., Wagner F., Slobodnik J. Joint Danube Survey 2. Final Scientific Report. International Commission for the Protection of the Danube River, Vienna. 2008. 242 p.
- Mai Y.-Z., Lai Z.-N., Li X.-H., Peng S.-Y., Wang C. Structural and functional shifts of bacterioplanktonic communities associated with spatiotemporal gradients in river outlets of the subtropical Pearl River Estuary, South China // Mar. Pollut. Bull. 2018. V. 136. P. 309–321.
- Mohiuddin M.M., Botts S.R., Paschos A., Schellhorn H.E. Temporal and spatial changes in bacterial diversity in mixed use watersheds of the Great Lakes region // J. Great Lakes Res. 2019. V. 45. P. 109–118.
- Nakatsu C.H., Byappanahalli M.N., Nevers M.B. Bacterial community 16S rRNA gene sequencing characterizes riverine microbial impact on Lake Michigan // Front. Microbiol. 2019. V. 10. Art. 996.
- Newton R.J., Jones S.E., Eiler A., McMahon K.D., Bertilsson S. A guide to the natural history of freshwater lake bacteria // Microbiol. Mol. Boil. Rev. 2011. V. 75. P. 14–49.
- O'Brien L., Siboni N., Seymour J.R., Balzer M., Mitrovic S. Tributary inflows to a regulated river influence bacterial communities and increase bacterial carbon assimilation // Microb. Ecol. 2023. V. 86. P. 2642–2654.

- Payne J.T., Millar J.J., Jackson C.R., Ochs C.A. Patterns of variation in diversity of the Mississippi river microbiome over 1,300 kilometers // *PLoS One*. 2017. V. 12. Art. e0174890.
- R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2022. <http://www.r-project.org/index.html>
- Read D.S., Gweon H.S., Bowes M.J., Newbold L.K., Field D., Bailey M.J., Griffiths R.I. Catchment-scale biogeography of riverine bacterioplankton // *ISME J*. 2015. V. 9. P. 516–526.
- RStudio Team. RStudio: Integrated Development for R. RStudio, PBC, Boston, MA. 2022. <http://www.rstudio.com/>
- Ruiz-González C., Niño-García J.P., Giorgio P.A. Terrestrial origin of bacterial communities in complex boreal freshwater networks // *Ecol. Lett.* 2015. V. 18. P. 1198–1206.
- Sahm K., John P., Nacke H., Wemheuer B., Grote R., Daniel R., Antranikian G. High abundance of heterotrophic prokaryotes in hydrothermal springs of the Azores as revealed by a network of 16S rRNA gene-based methods // *Extremophiles*. 2013. V. 17. P. 649–662.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edn. New York: Cold Spring Harbor, 1989. 1546 p.
- Savio D., Sinclair L., Ijaz U.Z., Parajka J., Reischer G.H., Stadler P., Blaschke A.P., Blöschl G., Mach R.L., Kirschner A.K.T., Farnleitner A.H., Eiler A. River bacterioplankton diversity. Bacterial diversity along a 2600 km river continuum // *Environ. Microbiol.* 2015. V. 17. P. 4994–5007.
- Sinsabaugh R.L., Findlay S.E.G. Dissolved organic matter: out of the black box into the mainstream // *Aquatic ecosystems: inter activity of dissolved organic matter* / Eds. Findlay S.E.G., Sinsabaugh R.L. Elsevier, San Diego, CA, 2003. P. 479–498.
- Shao Q., Lin Z., Zhou C., Zhu P., Yan X. Succession of bacterioplankton communities over complete *Gymnodinium*-diatom bloom cycles // *Sci. Total. Environ.* 2020. V. 709. Art. 135951.
- Smith V.H. Microbial diversity – productivity relationships in aquatic ecosystems // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2007. V. 62. P. 181–186.
- Sorokovikova L.M., Popovskaya G.I., Belykh O.I., Tomb-erg I.V., Maksimenko S.Yu., Bashenkhaeva N.V., Ivanov V.G., Zemskaya T.I. Plankton composition and water chemistry in the mixing zone of the Selenga River with Lake Baikal // *Hydrobiologia*. 2012. V. 695. P. 329–341.
- Staley C., Unno T., Gould T., Jarvis B., Phillips J., Cotner J., Sadowsky M. Application of Illumina next-generation sequencing to characterize the bacterial community of the Upper Mississippi River // *J. Appl. Microbiol.* 2013. V. 115. P. 1147–1158.
- Watanabe K., Komatsu N., Ishii Y., Negishi M. Effective isolation of bacterioplankton genus *Polynucleobacter* from freshwater environments grown on photochemically degraded dissolved organic matter // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2009. V. 67. P. 57–68.
- Wetzel R.G., Likens G.E. Limnological analyses. New York: Springer-Verlag, 2000. 429 p.
- Xie G., Tang X., Shao K., Zhu G., Gao G. Bacterial diversity, community composition and metabolic function in Lake Tianmuhu and its dammed river: effects of domestic wastewater and damming // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2021. V. 213. Art. 112069.
- Yang Y., Li S., Gao Y., Chen Y., Zhan A. Environment-driven geographical distribution of bacterial communities and identification of indicator taxa in Songhua River // *Ecol. Indic.* 2019. V. 101. P. 62–70.
- Zakharenko A.S., Galachyants Y.P., Morozov I.V., Shubenkova O.V., Morozov A.A., Ivanov V.G., Pimenov N.V., Krasnopeev A.Y., Zemskaya T.I. Bacterial communities in areas of oil and methane seeps in pelagic of Lake Baikal // *Microb. Ecol.* 2019. V. 78. P. 269–285.
- Zeglin L.H. Stream microbial diversity in response to environmental changes: review and synthesis of existing research // *Front. Microbiol.* 2015. V. 6. Art. 454.
- Zemskaya T.I., Bukin S.V., Bukin Y.S., Chernitsina S.M., Pogodaeva T.V., Rusanov I.I., Shubenkova O.V., Zakharenko A.S., Pimenov N.V. Taxonomic diversity and metabolic activity of microbial communities in rivers and estuarine waters of Southern Baikal in summer // *J. Great Lakes Res.* 2022. V. 48. P. 125–142.
- Zemskaya T.I., Bukin S.V., Zakharenko A.S., Chernitsyna C.M., Shubenkova O.V. Microbial communities in the estuarine water areas of the rivers in the south-eastern part of Lake Baikal // *Limnol. Freshwat. Biol.* 2019. V. 4. P. 259–265.
- Zhao M.M., Wang S.-m., Chen Y.-p., Wu J.-h., Xue L.-g., Fan T.T. Pollution status of the Yellow River tributaries in middle and lower reaches // *Sci. Total Environ.* 2020. V. 722. Art. 137861.

EXPERIMENTAL ARTICLES

Bacterial Communities of the Selenga River, Its Tributaries and Selenginskoe Shallow Water in the Summer Period of 2021**A. S. Zakharenko^{1, *}, I. V. Tomberg¹, S. V. Bukin¹, V. V. Blinov¹, T. I. Zemskaya¹**¹*Limnological Institute SB RAS, Irkutsk, 664033, Russia***e-mail: zakharenko@lin.irk.ru*

The first data on the diversity and structure of bacterial communities in the Selenga River, its tributaries and delta waters (Selenga shallow water) during the summer high-water period of 2021 were obtained. A tendency towards a gradual decrease in chemical indicators (alkalinity, mineralization, concentrations of sulfate and chloride ions) was revealed downstream in the Russian part of the Selenga River. As before, the chemical composition of the Selenga River waters was determined by water content and anthropogenic load, while the influence of tributary waters was local. At a distance of 1 km from the mouths in the mixing zone of river water and lake water, the chemical composition and taxonomic structure of bacterial communities were close to those observed in the pelagic zone of Lake Baikal. In all analyzed 16S rRNA gene libraries, 9 common bacterial phyla were identified, with a predominance of *Pseudomonadota* (51.71–76.83%) in river communities and *Actinomycetota* (17.28–66.32%) in the communities of the Selenga shallows. The most significant differences in the taxonomic composition of bacterial communities were noted at the genus level. It is assumed that there is a stable bacterial community throughout the Selenga River, the main representatives of which are bacteria of the *Limnohabitans*, *Pseudarcicella*, *Rhodoluna*, and *Polynucleobacter* genera, which also dominate in the small rivers of Southern Baikal. Comparative analysis of the diversity of tributary communities did not reveal a significant impact on the microbiomes of the Selenga River and Lake Baikal: only a few river bacterial taxa were identified in the littoral and pelagic zones of the lake.

Keywords: Selenga River, Selenga shallow waters, physicochemical parameters, bacterial communities, 16 S rRNA gene, diversity, water quality

УДК 579.26+57.083.18

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОСТАВА КИШЕЧНОЙ МИКРОБИОТЫ РЫЖЕЙ ВЕЧЕРНИЦЫ ПОСРЕДСТВОМ БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА И ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ 16S рРНК

© 2024 г. И. В. Попов^{a, b, *}, И. М. Донник^c, Т. А. Липилкина^a, И. С. Березинская^d,
Е. В. Ткачева^a, Е. А. Лукбанова^a, А. В. Алешукина^d, Ю. А. Тихменева^a, Т. Н. Дерезина^a,
А. П. Евсюков^a, Т. И. Твердохлебова^d, А. М. Ермаков^a

^aДонской государственный технический университет, Ростов-на-Дону, 344003, Россия

^bНаучно-технологический университет “Сириус”, Сочи, 354340, Россия

^cНаучно-исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, 123182, Россия

^dРостовский научно-исследовательский институт микробиологии и паразитологии,

Ростов-на-Дону, 344000, Россия

*e-mail: doc.igor.popov@gmail.com

Поступила в редакцию 16.05.2024 г.

После доработки 05.07.2024 г.

Принята к публикации 05.07.2024 г.

Рукокрылые (*Chiroptera*) являются вторым по видовому разнообразию отрядом млекопитающих после грызунов, что обеспечивает их ключевую роль в функционировании экосистем. Микробиота рукокрылых, особенно бактериальная, является мало изученной, что не позволяет точно оценить роль летучих мышей в микробной экологии. В ходе этого исследования мы определили состав и разнообразие кишечной микробиоты рыжих вечерниц (*Nyctalus noctula*) г. Ростова-на-Дону методами бактериологического анализа и высокопроизводительного секвенирования V3–V4 фрагментов гена 16S рРНК. В результате обнаружено, что микробное разнообразие, определяемое при помощи высокопроизводительного секвенирования 16S рРНК, статистически значимо выше ($p < 0.001$) в сравнении с бактериологическим методом. Однако масс-спектрометрическая идентификация бактериальных изолятов позволила определить их видовую принадлежность, в то время как чувствительность использованного протокола секвенирования 16S рРНК ограничена достоверной идентификацией бактерий до ранга родов. Также бактерии родов *Enterococcus*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Lactococcus* и *Latilactobacillus* явились наиболее преобладающими в составе кишечной микробиоты рыжей вечерницы. Наше исследование предоставляет первые данные о составе культивируемой и некультивируемой микробиоты рыжей вечерницы, что является фундаментальным этапом в изучении особенностей микробиоты синантропных летучих мышей.

Ключевые слова: бактериология, биоинформатика, кишечная микробиота, летучие мыши, секвенирование

DOI: 10.31857/S0026365624060159

Рукокрылые (*Chiroptera*) являются вторым после грызунов (*Rodentia*) по видовому разнообразию отрядом млекопитающих и при этом одними из самых неизученных животных (Kruskop, 2021). Ряд исследований свидетельствует о том, что летучие мыши играют ключевую роль в возникновении эмерджентных инфекций в качестве природных резервуаров множества микроорганизмов (Nap et al., 2015; Donnik et al., 2021). Большинство эмерджентных инфекций, природным резервуаром

которых являются летучие мыши, имеют вирусную природу, например SARS, MERS, геморрагическая лихорадка Эбола, болезни, вызываемые вирусами Нипах и Хендра, и COVID-19 (Caron et al., 2018; Gazal et al., 2022; Li et al., 2023). В связи с этим большинство исследований микробиома рукокрылых направлены на описание особенностей виroma и отдельных вирусов, в то время как исследования бактерий и грибов в микробных сообществах этих животных ограничены. Однако бактерии и грибы

рукокрылых также могут представлять опасность для общественного здравоохранения и благополучия домашних животных за счет возникновения эмерджентных видов и штаммов и распространения генов резистентности к антимикробным препаратам (Ludwig et al., 2021; Devnath et al., 2022; Foti et al., 2023).

На территории Европы и России в основном обитают насекомоядные рукокрылые (Russo et al., 2016; Froidevaux, 2023), и одним из наиболее распространенных видов является рыжая вечерница (*Nyctalus noctula*) (Lindecke et al., 2020). Кишечная микробиота рыжей вечерницы не изучена в полной мере, на данный момент исследования состава и свойств кишечной микробиоты этого вида рукокрылых ограничены, что не позволяет сделать окончательных выводов о роли этих животных в микробной экологии. При этом рыжие вечерницы являются синантропным видом, который находится в постоянном контакте с человеком и домашними животными (Lindecke et al., 2020), что обосновывает значимость изучения этих животных для ветеринарии и медицины.

Целью данной работы является определение состава и разнообразия кишечной микробиоты рыжих вечерниц (*N. noctula*) на основе методов бактериологического анализа и высокопроизводительного секвенирования гипервариабельных участков V3–V4 гена 16S рНК.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для определения состава кишечной микробиоты в марте 2022 года в стерильные пробирки объемом 1.5 мл было отобрано 26 образцов фекалий (весом не менее 0.5 г) у рыжих вечерниц, содержащихся в Центре реабилитации рукокрылых ДГТУ, половина из которых ($n = 13$) была использована для бактериологического анализа, а другая половина ($n = 13$) для высокопроизводительного секвенирования.

Для бактериологического анализа образцы асептически извлекали из пробирок для последующей экстракции путем измельчения в стерильно фосфатно-солевом буфере (рН 7.4) в соотношении 1 : 10. Затем экстракты были изучены качественно-количественным методом с высевом суспензий биоматериала по 0.1 мл на дифференциально-диагностические плотные питательные среды: кровяного агара, желточно-солевого агара, агара Сабуро, агара Эндо, агара де Ман, Рогосса и Шарпе (MRS), висмутсульфитного агара, агара Плоскирева, агара Шедлера, агара Uriselect 4, среды Гивенталья–Ведьминой (AGV), среды Вильсона Блэра и полужидкой среды Бифидум. Затем культуры инкубировали в микроаэрофильной камере при 37°C в течение 24–48 ч.

Выбор колоний для дальнейших исследований осуществляли на основании морфологии колоний и микроскопии с окраской по Граму, а также с учетом их роста на селективных дифференциально-диагностических средах, что являлось приоритетным критерием для отбора схожих по морфологии и окраске колоний. Подсчет количества выросших колоний бактерий проводился количественным методом с учетом результатов на 1 г кала по формуле: $Z = Y \times 10 \times N \times M$, где Z – количественная оценка одного вида бактерий на 1 г исследуемого материала (КОЕ/г), Y – количество выросших бактерий, 10 – коэффициент пересчета из расчета посевной дозы 100 мкл, N – степень разведения кала в жидкой буферной среде, M – степень разведения в пробирке, из которой взята проба для подсчета бактерий.

С помощью настольного масс-спектрометра Microflex с базой данных MALDI Biotyper Realtime Classification и программного обеспечения FlexControl (“Bruker Daltonics”, Лейпциг, Германия) была произведена идентификация видов бактерий. Пробоподготовку для исследования чистых культур штаммов проводили согласно протоколу производителя. Суточные чистые культуры бактерий в виде одиночных колоний наносились тонким слоем непосредственно на целевую точку, начиная с середины. Целевые точки покрывали 1 мкл НССА (α -циано-4-гидроксикоричная кислота) матричным раствором до полного высыхания при комнатной температуре. После высыхания мишень с культурой помещали в масс-спектрометр. Уровень идентификации бактерий интерпретировался по критериям, указанным в инструкции Score: 2.300–3.000 – высокая вероятность идентификации вида; 2.000–2.299 – надежная идентификация рода, вероятная идентификация вида; 1.700–1.999 – вероятная идентификация рода; 0.00–1.699 – ненадежная идентификация. Для дальнейшего анализа были отобраны культуры, идентифицированные со Score: 2.300–3.000.

Для молекулярно-биологического изучения состава микробиоты посредством профилирования генов прокариот были секвенированы ампликоны V3–V4 гена 16S рНК метагеномной ДНК, выделенные из образцов фекалий летучих мышей. Для этого из всех образцов фекалий была выделена метагеномная ДНК с помощью набора QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (“Qiagen”, Венло, Нидерланды), далее проводили амплификацию участков V3–V4 гена 16S рНК с использованием праймеров 341F (5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3') и 785R (5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3') (Klindworth et al., 2013) и последующим баркодированием полученных ампликонов, и впоследствии секвенировали полученные библиотеки ДНК на платформе Illumina MiSeq в соответствии с инструкциями производителя (“Illumina”, Сан-Диего, США).

Полученные результаты в формате FASTQ файлов были проанализированы с использованием программного обеспечения Quantitative Insights Into Microbial Ecology 2 (QIIME-2, версия 2023.5) (Bolyen et al., 2019). Денотинг прочтений с определением вариантов прочтений ампликонов был проведен в программном обеспечении DADA2 (Callahan et al., 2016). Таксономическая идентификация вариантов прочтений ампликонов была проведена с использованием референсной базы данных Silva (версия 138) (Quast et al., 2012; Yilmaz, 2014).

Дальнейший биоинформатический и статистический анализ данных был произведен с использованием языка статистического программирования R v4.2.3 (R Foundation for Statistical Computing, Вена, Австрия). Количественные данные состава бактериальной микробиоты (КОЕ/г и количество вариантов прочтений ампликонов) были использованы для расчета относительно го изобилия бактерий на рангах порядка, рода и вида. Определение альфа-разнообразия было проведено с использованием пакета vegan. Сравнение показателей альфа-разнообразия с использованием U-теста Манна–Уитни. Поправку на множественную проверку гипотез проводили с использованием метода Беньямини–Хохберга. Различия были приняты статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

По результатам выполнения исследования был определен состав кишечной микробиоты рыжих вечерниц города Ростов-на-Дону бактериологическим (культуральным) и молекулярно-биологическим (высокопроизводительное секвенирование 16S рРНК) методами. Таксономическая идентификация до ранга бактериальных видов была произведена только на основании данных протеомного масс-спектрометрического анализа кишечных изолятов, поскольку высокопроизводительное секвенирование ампликонов гена 16S рРНК было ограничено гипервариабельными участками V3 и V4, что не позволяет проводить идентификацию исследуемой микробиоты до ранга видов с достаточным уровнем достоверности (Katiraei et al., 2022). Для определения состава кишечной микробиоты рыжих вечерниц на ранге бактериальных видов методами метапрофилирования необходим анализ данных секвенирования ампликона всего гена 16S рРНК, что возможно при использовании технологий высокопроизводительного секвенирования третьего поколения (Wagner et al., 2016; Zhang et al., 2023), или анализ данных секвенирования тотальной метагеномной ДНК (Durazzi et al., 2021). Также стоит отметить, что определение состава микробиоты посредством культивирования бактерий

на множестве твердых сред не является оптимальным ввиду возможности роста нескольких видов бактерий на разных средах, что само по себе является смешивающим фактором для количественной оценки бактериальных сообществ. В связи с этим при определении состава микробиоты в первую очередь необходимо ориентироваться на данные более статистически обоснованных методов, таких как метапрофилирование по гену 16S рРНК (Athanasopoulou et al., 2023).

На ранге бактериальных порядков в кишечной микробиоте рыжих вечерниц были среди наиболее представленных бактерий идентифицированы *Lactobacillales* (33.5%), *Enterobacterales* (29.3%), *Clostridiales* (13.4%), *Bacteroidales* (9.7%), *Oscillospirales* (3.7%), *Lachnospirales* (3.5%) и другие. При анализе состава микробиоты на ранге бактериальных родов с разной представленностью были обнаружены роды *Latilactobacillus* (12%), *Citrobacter* (11%), *Lactococcus* (9%), *Hafnia*–*Obesumbacterium* (8%), *Bacteroides* (7%), *Enterococcus* (6%), *Pediococcus* (6%) и другие. На ранге видов при помощи масс-спектрометрической идентификации бактериальных изолятов были обнаружены *Enterococcus faecalis*, *Proteus mirabilis*, *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus sciuri*, *Staphylococcus xylosus*, *Enterococcus faecium*, *Klebsiella oxytoca*, *Lactococcus lactis*, *Enterobacter cloacae*, *Lactobacillus sakei*, *Providencia retgeri*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Citrobacter braakii*, *Enterobacter aerogenes* и другие. Мы должны отметить разницу в детекции бактерий, принадлежащих разным таксонам, с использованием методов культивирования и метапрофилирования. Наиболее ярким различием является отсутствие бактерий, принадлежащих порядку *Bacillales* в составе микробиоты по результатам биоинформатического анализа данных высокопроизводительного секвенирования 16S рРНК, в то время как, согласно масс-спектрометрическому анализу бактериальных изолятов, данные бактерии были выделены из фекалий рукокрылых. Данное различие возможно объяснить естественными ограничениями применения высокопроизводительного секвенирования гипервариабельных участков гена 16S рРНК: секвенирование этих участков, а не одного гена вносит некоторую неопределенность в ходе таксономической идентификации ампликонов с использованием референсных генетических баз данных прокариот, что нивелируется только при высокопроизводительном секвенировании всего гена 16S рРНК (Yang et al., 2016; Hung et al., 2022; Athanasopoulou et al., 2023). Определенный в ходе нашего исследования состав кишечной микробиоты рыжих вечерниц отображен на рисунке.

При анализе альфа-разнообразия статистической значимости в показателях индекса выравниваемости Пиелу не обнаружено ($p = 0.91$) при наличии ожидаемой разницы с использованием

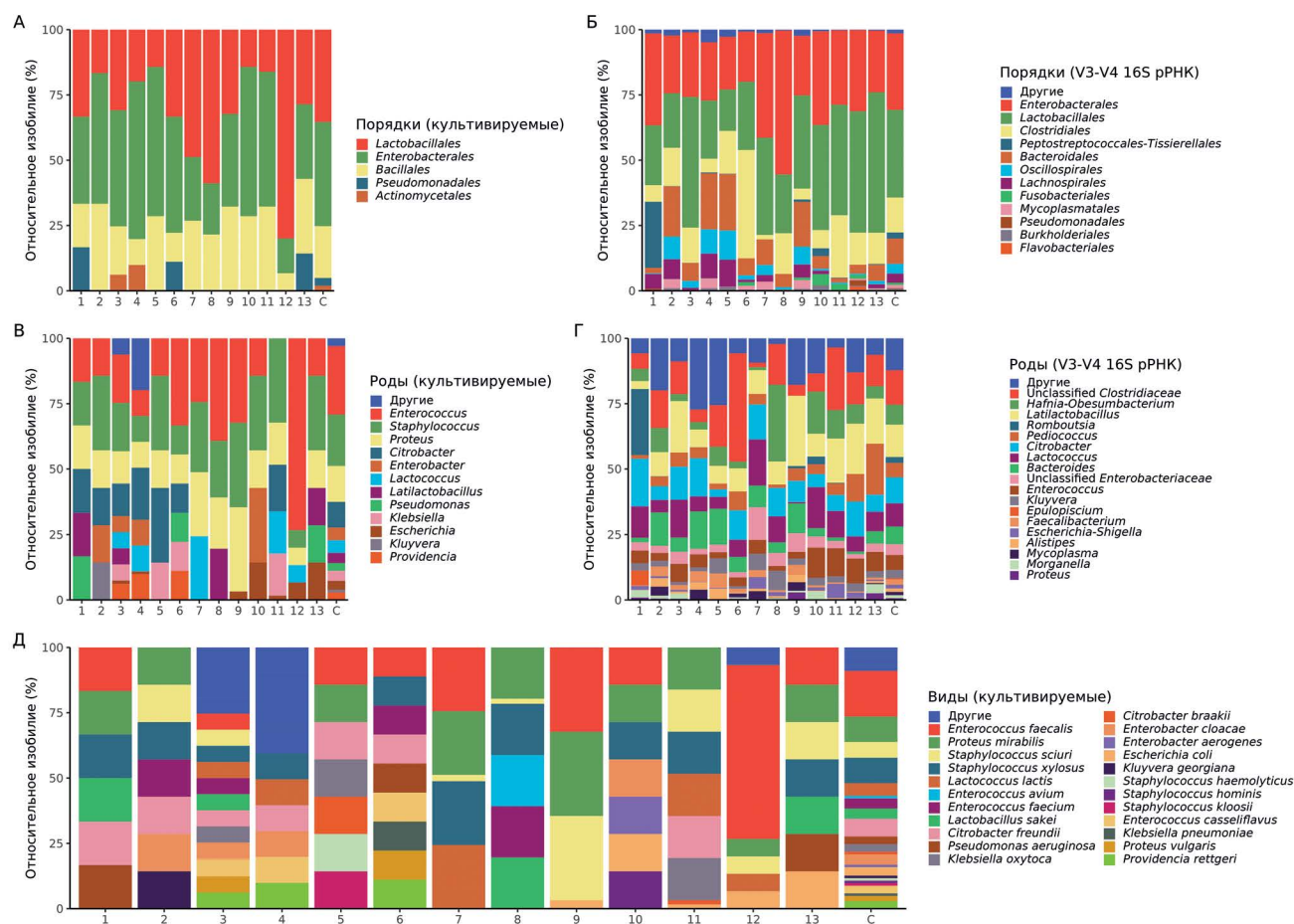


Рисунок. Состав идентифицированных бактерий в каждом изученном образце кишечной микробиоты рыжих вечерниц бактериологическим ($n = 13$, культивирование) и молекулярно-биологическим ($n = 13$, высокопроизводительное секвенирование V3–V4 16S рНК) методами на ранге порядка (А и Б), рода (В и Г) и вида (Д).

других индексов разнообразия, что свидетельствует о равномерной представленности бактериальных таксонов, идентифицируемых двумя разными методами. Таким образом, можно утверждать, что хоть рутинный бактериологический метод на основе культивирования и позволяет определить меньшее разнообразие кишечной микробиоты рыжих вечерниц в сравнении с высокопроизводительным секвенированием 16S рНК в связи с невозможностью выделять некультивируемые бактерии, выравнивание бактериальных сообществ, детектируемых этими двумя методами, равнозначна.

Стоит отметить, что в составе кишечной микробиоты рыжих вечерниц нами были обнаружены потенциально патогенные бактерии *Enterococcus faecalis*, *Proteus mirabilis*, *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus sciuri* и другие (рисунок). В рамках реализации данного исследования не был проведен анализ патогенности и вирулентности полученных изолятов, что не позволяет судить об их опасности

для человека и домашних животных. Вполне возможно, что данные микроорганизмы являются представителями комменсальной микробиоты рыжих вечерниц, однако это необходимо проверить в ходе будущих исследований.

Таким образом, в ходе реализации этого исследования были получены первые сравнительные данные о составе культивируемой и некультивируемой кишечной микробиоты рыжих вечерниц, а также получены биоинформатическая база данных, которая может быть использована в качестве референса в будущих исследованиях, и коллекция культивируемых кишечных микроорганизмов рыжих вечерниц.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-14-00316; <https://rscf.ru/project/23-14-00316/>.

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

- Athanasopoulou K., Adamopoulos P.G., Scorilas A.* Unveiling the human gastrointestinal tract microbiome: the past, present, and future of metagenomics // *Biomedicines*. 2023. V. 11. Art. 827.
- Bolyen E., Rideout J.R., Dillon M.R., Bokulich N.A., Abnet C.C., Al-Ghalith G.A., Alexander H., Alm E.J., Arumugam M., Asnicar F., Bai Y., Bisanz J.E., Bittinger K., Brejnrod A., Brislawn C.J., Brown C.T., Callahan B.J., Caraballo-Rodriguez A.M., Chase J., Cope E.K., Da Silva R., Diener C., Dorrestein P.C., Douglas G.M., Durrall D.M., Duvallet C., Edwardson C.F., Ernst M., Estaki M., Fouquier J., Gauglitz J.M., Gibbons S.M., Gibson D.L., Gonzalez A., Gorlick K., Guo J., Hillmann B., Holmes S., Holste H., Huttenhower C., Huttley G.A., Janssen S., Jarmusch A.K., Jiang L., Kaehler B.D., Kang K.B., Keefe C.R., Keim P., Kelley S.T., Knights D., Koester I., Kosciorek T., Kreps J., Langille M.G. I., Lee J., Ley R., Liu Y.X., Lofthfield E., Lozupone C., Maher M., Marotz C., Martin B.D., McDonald D., McIver L.J., Melnik A.V., Metcalf J.L., Morgan S.C., Morton J.T., Naimy A.T., Navas-Molina J.A., Nothias L.F., Orchanian S.B., Pearson T., Peoples S.L., Petras D., Preuss M.L., Priesse E., Rasmussen L.B., Rivers A., Robeson M.S., Rosenthal P., Segata N., Shaffer M., Shiffer A., Sinha R., Song S.J., Spear J.R., Swofford A.D., Thompson L.R., Torres P.J., Trinh P., Tripathi A., Turnbaugh P.J., Ul-Hasan S., van der Hooft J.J.J., Vargas F., Vazquez-Baeza Y., Vogtmann E., von Hippel M., Walters W., Wan Y., Wang M., Warren J., Weber K.C., Williamson C.H.D., Willis A.D., Xu Z.Z., Zaneveld J.R., Zhang Y., Zhu Q., Knight R., Caporaso J.G.* Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME2 // *Nature Biotechnol.* 2019. V. 37. P. 852–857.
- Callahan B.J., McMurdie P.J., Rosen M.J., Han A.W., Johnson A.J., Holmes S.P.* DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data // *Nature Methods*. 2016. V. 13. P. 581–583.
- Caron A., Bourgarel M., Cappelle J., Liégeois F., De Nys H.M., Roger F.* Ebola virus maintenance: if not (only) bats, what else? // *Viruses*. 2018. V. 10. Art. 549.
- Devnath P., Karah N., Graham J.P., Rose E.S., Asaduzzaman M.* Evidence of antimicrobial resistance in bats and its planetary health impact for surveillance of zoonotic spillover events: a scoping review // *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2022. V. 20. Art. 243.
- Donnik I., Popov I.V., Sereda S., Popov I.V., Chikindas M., Ermakov A.* Coronavirus infections of animals: future risks to humans // *Biol. Bull.* 2021. V. 48. P. 26–37.
- Durazzi F., Sala C., Castellani G., Manfreda G., Remondini D., De Cesare A.* Comparison between 16S rRNA and shotgun sequencing data for the taxonomic characterization of the gut microbiota // *Sci. Rep.* 2021. V. 11. Art. 3030.
- Foti M., Grasso R., Fisichella V., Mascetti A., Colnaghi M., Grasso M., Spina M.T.* Antimicrobial resistance in physiological and potentially pathogenic bacteria isolated in southern Italian bats // *Animals*. 2023. V. 13. Art. 966.
- Froidevaux J.S., Toshkova N., Barbaro L., Benítez-López A., Kerbirou C., Le Viol I., Pacifici M., Santini L., Stawski C., Russo D.* A species-level trait dataset of bats in Europe and beyond // *Sci. Data*. 2023. V. 10. Art. 253.
- Gazal S., Sharma N., Gazal S., Tikoo M., Shikha D., Badroo G.A., Rashid M., Lee S.-J.* Nipah and Hendra viruses: deadly zoonotic paramyxoviruses with the potential to cause the next pandemic // *Pathogens*. 2022. V. 11. Art. 1419.
- Han H.-J., Wen H.-I., Zhou C.-M., Chen F.-F., Luo L.-M., Liu J.-W., Yu X.-J.* Bats as reservoirs of severe emerging infectious diseases // *Virus Res.* 2015. V. 205. P. 1–6.
- Hung Y.M., Lyu W.N., Tsai M.L., Liu C.L., Lai L.C., Tsai M.H., Chuang E.Y.* To compare the performance of prokaryotic taxonomy classifiers using curated 16S full-length rRNA sequences // *Comput. Biol. Med.* 2022. V. 145. Art. 105416.
- Katiraei S., Anvar Y., Hoving L., Berbée J.F., van Harmelen V., Willems van Dijk K.* Evaluation of full-length versus V4-region 16S rRNA sequencing for phylogenetic analysis of mouse intestinal microbiota after a dietary intervention // *Curr. Microbiol.* 2022. V. 79. Art. 276.
- Klindworth A., Priesse E., Schweer T., Peplies J., Quast C., Horn M., Glöckner F.O.* Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies // *Nucleic Acids Res.* 2013. V. 41. P. e1–e1.
- Kruskop S.V.* Diversity aspects in bats: genetics, morphology, community structure // *Diversity* 2021. V. 13. Art. 424. <https://doi.org/10.3390/d13090424>
- Li K.S., Lau S.K., Woo P.C.* Bats – the magnificent virus player: SARS, MERS, COVID-19 and beyond // *Viruses*. 2023. V. 15. Art. 2342.
- Lindecke O., Currie S.E., Fasel N.J., Fritze M., Kravchenko K., de Assis C.K., Lehnert L.S., Röleke M., Voigt-Heucke S.L., Voigt C.C.* Common noctule *Nyctalus noctula* (Schreber, 1774) // *Handbook of the Mammals of Europe* / Eds. K. Hackländer, F.E. Zichos. Springer, 2020. P. 1–25.
- Ludwig L., Muraoka J., Bonacorsi C., Donofrio F.* Diversity of fungi obtained from bats captured in urban forest fragments in Sinop, Mato Grosso, Brazil // *Braz. J. Biol.* 2021. V. 83. Art. e247993.

- Quast C., Pruesse E., Yilmaz P., Gerken J., Schweer T., Yarza P., Peplies J., Glöckner F.O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools // *Nucleic Acids Res.* 2012. V. 41. P. D590–D596.
- Russo D., Billington G., Bontadina F., Dekker J., Dietz M., Gazaryan S., Jones G., Meschede A., Rebelo H., Reiter G. Identifying key research objectives to make European forests greener for bats // *Front. Ecol. Evolut.* 2016. V. 4. Art. 87.
- Wagner J., Coupland P., Browne H.P., Lawley T.D., Francis S.C., Parkhill J. Evaluation of PacBio sequencing for full-length bacterial 16S rRNA gene classification // *BMC Microbiol.* 2016. V. 16. P. 1–17.
- Yang B., Wang Y., Qian P.Y. Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis // *BMC Bioinform.* 2016. V. 17. P. 135.
- Yilmaz P., Parfrey L.W., Yarza P., Gerken J., Pruesse E., Quast C., Schweer T., Peplies J., Ludwig W., Glöckner F.O. The SILVA and “all-species living tree project (LTP)” taxonomic frameworks // *Nucleic Acids Res.* 2014. V. 42. P. D643–D648.
- Zhang T., Li H., Ma S., Cao J., Liao H., Huang Q., Chen W. The newest Oxford Nanopore R10. 4.1 full-length 16S rRNA sequencing enables the accurate resolution of species-level microbial community profiling // *Appl. Environ. Microbiol.* 2023. V. 89. Art. e00605–00623.

EXPERIMENTAL ARTICLES

Determination of the Gut Microbiota Composition of Common Noctule by Bacteriological Analysis and High-throughput Sequencing of 16s rRNA

I. V. Popov^{1, 2, *}, I. M. Donnik³, T. A. Lipilkina¹, I. S. Berezinskaia⁴,
E. V. Tkacheva¹, E. A. Lukbanova¹, A. V. Aleshukina⁴, I. A. Tikhmeneva¹,
T. N. Derezhina¹, A. P. Evsyukov¹, T. I. Tverdokhlebova⁴, A. M. Ermakov¹

¹Don State Technical University, Rostov-on-Don, 344003 Russia

²Sirius University of Science and Technology, Sochi, 354340 Russia

³National research center “Kurchatov institute”, Moscow, 123182 Russia

⁴Rostov Research Institute of Microbiology and Parasitology, Rostov-on-Don, 344000 Russia

*e-mail: doc.igor.popov@gmail.com

Bats (*Chiroptera*) are the second most diverse order of mammals after rodents, which ensures their key role in the functioning of ecosystems. The microbiota of bats, especially the bacterial one, is poorly studied, which does not allow an accurate assessment of the role of bats in global microbial ecology. In this study, we determined the composition and diversity of the intestinal microbiota of the common noctule (*Nyctalus noctula*) in Rostov-on-Don using bacteriological analysis and metagenomic sequencing of the V3-V4 16S rRNA gene. As a result, we found that microbial diversity determined using metagenomic sequencing was statistically significantly higher ($p < 0.001$) compared to the bacteriological method. However, mass spectrometric identification of bacterial isolates made it possible to determine their species, while the sensitivity of the metagenomic sequencing protocol used is limited to reliable identification of bacteria to genus rank. Also, bacteria of the genera *Enterococcus*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Lactococcus*, and *Latilactobacillus* were the most prevalent in the intestinal microbiota of the common noctule. Our study provides the first data on the composition of the cultivated and uncultivated microbiota of the rufous noctule, which is a fundamental step in the study of the microbiota of synanthropic bats.

Keywords: bacteriology, bioinformatics, gut microbiota, bats, sequencing

УДК 57.083.18

НОВЫЕ ШТАММЫ *BACILLUS THURINGIENSIS* SUBSP. *ISRAELENIS*, ВЫСОКОТОКСИЧНЫЕ ДЛЯ *AEDES AEGYPTI* И *CULEX PIPIENS PIPIENS*

© 2024 г. В. П. Ходырев^а, О. В. Поленогова^{а, *}, А. С. Артемченко^а,
А. В. Кривопапов^а, В. В. Глухов^а

^аИнститут систематики и экологии животных СО РАН, Новосибирск, 630091, Россия

*e-mail: ovp0408@yandex.ru

Поступила в редакцию 26.03.2024 г.

После доработки 08.04.2024 г.

Принята к публикации 12.04.2024 г.

Bacillus thuringiensis subsp. *israelensis* (*Bti*) — наиболее известный подвид кристаллообразующих энтомопатогенных бактерий, используемых для контроля численности кровососущих комаров. В данной работе нами были изолированы три штамма *Bti* 4369, 4929 и 4999 из кишечника природной популяции личинок кровососущих комаров *Aedes flavescens*. Идентификация бактериальных изолятов по гену 16S rRNA и определение серотипа выявили принадлежность штаммов к *Bt* subsp. *israelensis* H14. Штаммы имели различия в морфологии бактериальных колоний, ряда биохимических характеристик и профилей белковых эндотоксинов. Выделенные штаммы *Bti* 4369 и 4999 показали высокую инсектицидную активность в отношении личинок *Culex pipiens pipiens* и *Aedes aegypti*, значения LC₅₀ которых через 24 ч после воздействия составили $1.47\text{--}2.26 \times 10^8$ спор/мл. Для штамма *Bti* 4929 LC₅₀ составило $32.7\text{--}35.9 \times 10^8$ спор/мл. Выделенные штаммы *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* имеют высокий потенциал для создания биопрепаратов для контроля численности кровососущих комаров.

Ключевые слова: биопрепараты, кровососущие комары, инсектицидная активность, энтомопатогенные бактерии, биологический контроль

DOI: 10.31857/S0026365624060161

Bacillus thuringiensis (*Bt*) известны инсектицидной активностью по отношению к насекомым разных отрядов (Schnepf et al., 1998; Van Frankenhuyzen, 2013) и безопасны для позвоночных животных (McClintock et al., 1995). *Bt* широко распространены, входят в микробные сообщества различных экологических ниш, таких как почва и вода, а также микробиота насекомых и растений (Raymond et al., 2010). *Bt* составляют основу большинства биопрепаратов для контроля численности насекомых-вредителей сельского и лесного хозяйства (Kumar et al., 2021).

Токсичность *Bt* обусловлена присутствием параспоровых белковых включений, содержащих токсины (Cry и Cyt). Дельта-эндотоксины формируются на стадии споруляции бактерий. Cry и Cyt токсины представляют собой два класса кристаллических эндотоксинов (Höfte, Whiteley, 1989), формирование которых происходит в соответствии с генетическим профилем бактерий *Bt* (Reyes-Ramirez, Ibarra, 2005).

В результате ограниченного протеолиза в кишечнике насекомых происходит активация протоксина (дельта-эндотоксина) с образованием активного токсина, который непосредственно взаимодействует с рецепторами эпителиального слоя кишечника, что в дальнейшем приводит к образованию пор. Данные процессы приводят к цитолизу, нарушению целостности среднего отдела кишечника и, как следствие, проникновению бактерий в гемоцель насекомых. При этом следует отметить, что в гемоцель проникают не только *Bt*, но и бактерии микробиоты, что заканчивается септициемией (Bravo et al., 2007).

Bt subsp. *israelensis* (*Bti*) — наиболее известный подвид, обладающий Cry и Cyt эндотоксинами (Ben-Dov, 2014; Valtierra-de-Luis et al., 2020). *Bti* продуцирует четыре основных Cry токсина, высокоспецифичных для комаров (Cry4Aa, Cry4Ba, Cry11Aa и Cyt1Aa) (De Maagd et al., 2001; Fernández-Chapa et al., 2018). В то время как Cyt токсины *Bti* обладают токсичностью для *Diptera* (De Maagd et al., 2003;

Federichi et al., 2006) и могут быть нетоксичными для них, они способны усиливать токсичность Cгу (Wu, Chang, 1985; Crickmore et al., 1995; Pérez et al., 2005; Canton et al., 2011; Soares-da-Silva et al., 2017).

Кровососущие комары р. *Culex* и *Aedes* являются переносчиками возбудителей заболеваний человека, а также могут играть существенную роль в трофических цепях различных гидробионтов (Onen et al., 2023). Данные виды распространены повсеместно, в том числе на территории России (Мирзаева и соавт., 2007; Гаджиева, 2021; Халин и соавт., 2021). Для комаров *Culex* и *Aedes* характерна высокая резистентность к действию химических инсектицидов (Liu et al., 2015), в связи с чем актуально использование биопрепаратов на основе *Bti*. *Bti* широко применяется во всем мире в различных препаративных формах (Becker et al., 2003; Bravo et al., 2011). Генетическое разнообразие *Bti* может в значительной мере различаться в зависимости от региона происхождения бактерий. При производстве бактериальных препаратов постоянно стоит проблема сохранности не только генетического однообразия бактерий, но и сохранения их инсектицидной активности, которая может быть утрачена при длительной селекции *Bti* по тем или иным причинам. В этой связи поиск высокоактивных штаммов *Bti* до сих пор остается актуальной задачей для исследователей во всем мире.

В данной работе были идентифицированы и охарактеризованы новые штаммы *Bt* subsp. *israelensis*, определена их инсектицидная активность в отношении личинок кровососущих комаров *A. aegypti* и *C. pipiens pipiens*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Личинки комаров *Aedes flavescens* были отобраны во временных водоемах, образованных в результате таяния снега с акваторией ~1500 м² (30 м × 50 м) и уровнем воды от 10 до 40 см, в Западной части города Новосибирска, Россия (N 55.001537°, E 82.778913°).

В стерильных лабораторных условиях на льду у личинок комаров *A. flavescens* с признаками развития бактериоза извлекали средний отдел кишечника с содержимым и помещали в стерильный 150 мМ NaCl. После механической гомогенизации суспензии пастеризовали (12 мин при 80°C) и инокулировали на поверхность рыбно-пептонного агара (РПА) состава (г/л дистиллированной воды): 4 — рыбного гидролизата, 7 — пептона, 5 — хлорида натрия, 15 — агар-агара; pH 7.3 ± 0.2. Через 4 сут инкубации при температуре 28°C проводили произвольный отбор отдельных бактериальных колоний и рассевали методом истощающегося штриха на РПА.

Трем типам колоний, выделенных в чистую культуру, были присвоены номера 4369, 4929 и 4999. Морфологические характеристики бактериальных колоний и клеток изучали через 6 сут культивирования при 28°C. Морфологию клеток бактерий, а также соотношение спор и кристаллов изучали в микробиологических препаратах окрашенных 5%-м водным раствором эозина с помощью световой микроскопии (иммерсионный объектив ×100, Axsioscop 40 с видеокамерой AmScope.com FMAO50 в программе Topview (“Carl Zeiss”, Германия).

Биохимические свойства исследуемых штаммов бактерий 4369, 4929 и 4999 характеризовали по методу Барджака и соавт. (De Bardjac, Bonnefoi, 1962, 1973). Серологическую принадлежность бактерий определяли с помощью иммунных сывороток, полученных в лаборатории патологии насекомых ИСиЭЖ СО РАН. Электрофоретическое разделение их белковых Cгу и Cyt токсинов для определения их молекулярного веса определяли в споро-кристаллической смеси 6-сут культур бактерий. Электрофоретическое разделение проводили в присутствии 0.1% додецилсульфата натрия в 10% полиакриламидном геле (Laemmli, 1970) с последующим окрашиванием раствором Кумасси R-250. Спектр молекулярного веса белков определяли колориметрическим методом в биоанализаторе (“Agilent”, США). В качестве стандартов молекулярного веса был использован белковый маркер (8–200 кДа) (“Servicebio”, Китай).

Идентификацию бактериальных изолятов гена 16S рРНК проводили по методике, описанной ранее (Chertkova et al., 2023). Секвенирование фрагмента гена 16S рРНК проводили с использованием праймеров 27F (5'-AGA GTT TGA TCA TGG CTC AG-3') (Weisburg et al., 1991) и 1492R (5'-CCC TAC GGT TAC CTT GTT AGG ACT-3'). Последовательности генов 16S рРНК штаммов 4369, 4929 и 4999 были внесены в базу данных GenBank под номерами доступа PP396075, PP396076 и PP396077. Полученные эталонные последовательности из GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) были выровнены в BioEdit.

Инсектицидную активность штаммов 4369, 4929 и 4999 сравнивали в серии биотестирований в отношении двух видов личинок комаров *A. aegypti* и *C. pipiens pipiens* из естественных мест обитания. Для инфицирования использовали суспензии штаммов 4369, 4929, 4999. Суспензии готовили в 150 мМ NaCl из лиофилизата 6-сут культур бактерий. Суспензии (от 4.1×10^7 до 8.2×10^9) вносили в 100-мл садки с личинками комаров в III личиночной стадии развития (15 личинок на 1 повторность). В контроле в садки вносили 150 мМ NaCl. Каждый биоанализ включал 5 концентраций в трех биологических повторностях в трех повторениях. Период наблюдения составил 24 ч.

Размер колоний представлен как среднее $\pm$ стандартная ошибка. Полулетальные концентрации (LC_{50}) определяли методом Спирмена–Карбера (TSK).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Предварительная пастеризация позволила выделить из содержимого среднего кишечника личинок *A. flavescens* крупные колонии с характерной для *Bt* морфологией колоний и наличием вегетативных клеток со спорами и кристаллами. Трём типам изолированных колоний были присвоены номера 4369, 4929 и 4999. Данные колонии имели общие признаки в виде серо-белой окраски и мелкозернистой поверхности, округлой формы и плоского профиля, сухой консистенции, отсутствия запаха и прозрачности (рис. 1а–1в).

Отличными признаками для исследуемых колоний выступали их размер и тип края. Так, штамм 4369 формировал бактериальные колонии диаметром 25.5 ± 0.2 мм с волнистым типом края, 4999 – диаметром 24.2 ± 0.5 мм и зубчатым краем.

Штамм 4929 имел значительно меньший размер колоний по сравнению со штаммами 4369 и 4999 и ровный край колоний (рис. 1а–1в).

Микроскопический анализ шестисуточных бактериальных культур показал однородность исследуемых штаммов, присутствие округлых спор и наличие кристаллических включений (рис. 2а–2в).

Вегетативные клетки в микробиологических препаратах отсутствовали. Морфология кристаллических включений была схожа с кристаллическими включениями *Bti*. Важно отметить, что в микробиологических препаратах штамма *Bti* 4929 преимущественно присутствовали кристаллические включения, значительно более мелкие по сравнению со спорами (рис. 2б).

Исследуемые штаммы *Bti* 4369, 4929 и 4999 были охарактеризованы по основным биохимическим признакам (табл. 1).

Все штаммы – грамположительные факультативные анаэробы. Общими признаками для штаммов 4369, 4929 и 4999 выступали способность к образованию ацетилметилкарбинола, лецитиназы и каталазы, способность к гидролизу крахмала и казеина, а также к восстановлению нитратов в нитриты,



Рис. 1. Сравнительная морфологическая оценка 6-сут бактериальных колоний *Bt* subsp. *israelensis*, выделенных из среднего отдела кишечника личинок *Aedes flavescens*: а – 4369; б – 4929; в – 4999.

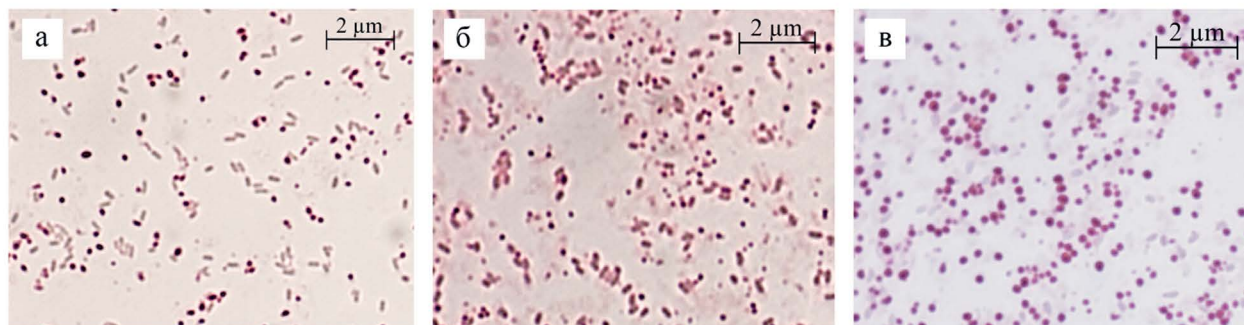


Рис. 2. Микроскопический анализ ($\times 100$, Axsioscop 40) 6-сут бактериальных колоний *Bt* subsp. *israelensis*, выделенных из среднего отдела кишечника личинок *Aedes flavescens*: а – 4369; б – 4929; в – 4999.

Таблица 1. Биохимические характеристики исследуемых штаммов *Bt* subsp. *israelensis*, выделенных из кишечника личинок *Aedes flavescens*

Тест	Изолят		
	4369	4929	4999
Рост на среде:			
питательный агар	+	+	+
триптико-соевый агар	+	+	+
Образование кислоты из:			
D-маннитол	+	+	—
сахароза	—	—	+
Гидролиз:			
желатиназа	+	+	+
салицин	+	—	—
Продукция:			
ацетилметилкарбинол	+	+	+
каталазы	+	+	+
амилазы	+	+	+
лецитиназы	+	+	+
Протеолитическая активность	+	+	+
Редукция нитратов в нитриты	+	+	+
Уреаза	—	—	—

отсутствие способности к утилизации салицина, к образованию щелочи на цитратно-солевом агаре, уреазы и пигмента. Отдельными отличительными признаками для штамма *Bti* 4999 выступали отсутствие способности сбраживать сахарозу и образовывать кислоту при утилизации маннитола.

Серологическая диагностика показала принадлежность штаммов *Bti* 4369, 4929 и 4999 к H14 серологическому варианту *Bti*.

Результаты электрофореграммы споро-кристаллических смесей исследуемых штаммов *Bt* 4369, 4929 и 4999 показали присутствие эндотоксинов с молекулярными весами от 17 до 135 кДа (рис. 3).

Полипептид с молекулярным весом 23 кДа присутствовал на электрофореграмме для всех исследуемых штаммов. Штамм *Bt* 4369 имел два мажорных белка весом 30 и 55 кДа и ряд минорных белков весом 20, 30, 45, 135 кДа. Для штамма *Bt* 4929 результаты электрофореграммы показали кроме белка весом 23 кДа, присутствие второго мажорного белка весом 30 кДа и нескольких минорных белков с молекулярным весом 45, 54, 66 кДа. В свою очередь, для штамма *Bt* 4999 были выявлены дополнительные белки с молекулярным весом 30, 43, 48, 55 кДа. Полипептиды с молекулярным весом 23 кДа относятся к классу Cyt эндотоксинов, известны ларвицидной активностью по отношению к личинкам двукрылых и могут присутствовать у разных видов р. *Bacillus* (например, *B. thuringiensis* subsp. *kyushuensis*, *B. thuringiensis* subsp. *medellin*,

B. licheniformis) (Ishii et al., 1994; Orduz et al., 1996; Yan et al., 2007). Геном штаммов *Bt* может содержать до двенадцати генов *cry* и *cyt*, однако не все из них экспрессируются (Ma et al., 2023). Экспрессия эндотоксина приводит к вариативности белкового профиля с уникальными комбинациями эндотоксинов для отдельно взятых изолятов (Ben-Dov et al., 1997; Sur et al., 2003; Bravo et al., 2011), что может быть обусловлено экологическими условиями происхождения штамма (Baig et al., 2010; Shishir et al., 2014; Mishra et al., 2017). Зачастую кристалл эндотоксина *Bti* содержит четыре основных полипептида, обладающих молекулярной массой 27, 72, 128 и 135 кДа, которые кодируются генами *CytIAa*, *CryIIAa*, *Cry4B* и *Cry4A* (Federici et al., 1990).

Для исследуемых штаммов *Bt* 4369, 4929 и 4999 была проведена идентификация с использованием секвенирования гена 16S рРНК. Результаты BLAST-анализа полученных последовательностей гена 16S рРНК и сравнение нуклеотидных последовательностей с базами данных GenBank NCBI (покрытие 99–100%, идентичность 99.79–100%; NR_114581.1 / NR_043403.1) подтвердили принадлежность всех исследуемых штаммов бактерий к виду *B. thuringiensis* (табл. 2).

Сравнительный анализ инсектицидной активности LC₅₀ для штаммов *Bti* 4369, 4929 и 4999 был проведен на комарах двух видов *A. aegypti* и *C. pipiens pipiens* (табл. 3).

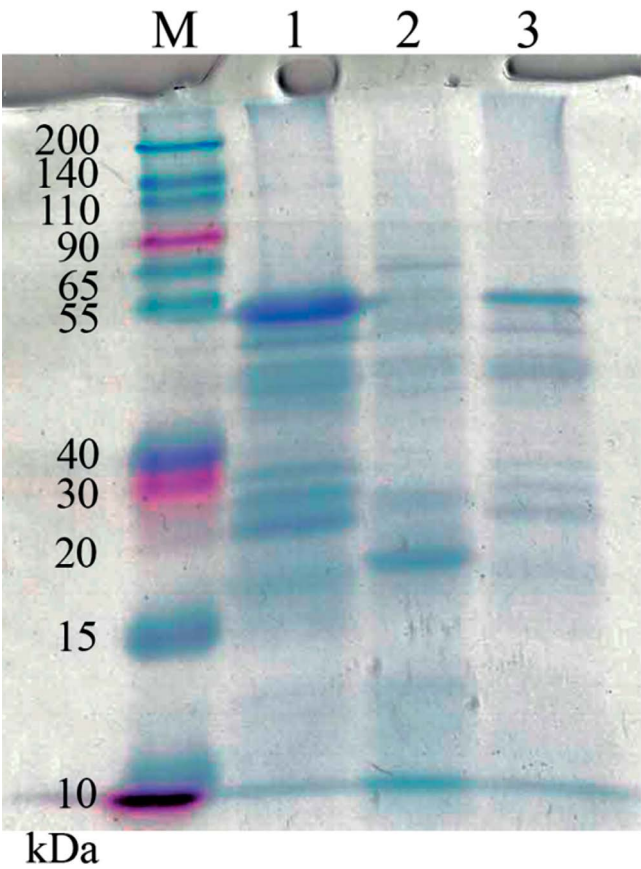


Рис. 3. Сравнительный электрофорез споро-кристаллических смесей исследуемых штаммов: 1 – 4369; 2 – 4929; 3 – 4999. М – стандарты молекулярной массы, предварительно окрашенные (8–200 кДа), (“Servicebio, Китай”).

Результаты биотестирований показали, что личинки L3 *C. pipiens pipiens* более чувствительны к действию выделенных штаммов, по сравнению с L3 *A. aegypti*. Полулетальные концентрации (LC₅₀) штамма 4999 для *C. pipiens pipiens* и *A. aegypti* составили 1.58×10^{-4} и 1.75×10^{-4} мкг/мл соответственно.

Штамм 4369 был в 1.47–1.62 раза менее эффективен по сравнению со штаммом 4999. Значения LC₅₀ для штамма 4369 в отношении личинок *C. pipiens pipiens* и *A. aegypti* составили 1.39×10^{-4} и 2.26×10^{-4} мкг/мл соответственно. Штамм 4929 обладал наименьшей инсектицидной активностью из всех исследуемых штаммов *Bti*. Однако результаты биотестирования показали несколько большую ($\times 1.1$) активность штамма 4929 по отношению к личинкам *C. pipiens pipiens*, по сравнению с *A. aegypti*. Значения LC₅₀ для штамма 4929 составили 32.7×10^{-4} и 35.9×10^{-4} мкг/мл для личинок *A. aegypti* и *C. pipiens pipiens* соответственно, что оказалось в 15.9–22.2 раза ниже, по сравнению со штаммом 4999. Сравнительный анализ полученных результатов показал, что выделенные из кишечников личинок комаров штаммы *Bti* 4369, 4929 и 4999 имеют гораздо большую инсектицидную активность по отношению к личинкам комаров р. *Culex* и *Aedes*, по сравнению с опубликованными ранее данными других исследовательских групп. Так, полученные нами значения LC₅₀ в отношении личинок комаров р. *Aedes* и *Culex* для штаммов *Bti* 4369, 4929 и 4999 находились в диапазоне $1.62\text{--}35.9 \times 10^{-4}$ мкг/мл, что в 2.3–38 раз превышало инсектицидную активность *Bacillus thuringiensis* LBIT315 и LBIT348 в работе Ibarra et al. (2003), где LC₅₀ для штамма LBIT315 в отношении *A. aegypti* составила 4.12 мкг/мл, а для LBIT348 в отношении *C. quinquefasciatus* – 6.61 мкг/мл (Ibarra et al., 2003). Кроме того, инсектицидная активность штаммов *Bti* 4369, 4929 и 4999 на три–четыре порядка превышала значения LC₅₀ для восьми штаммов *Bti*, выделенных из почв в Китае, в отношении личинок комаров р. *Culex*, где диапазон значений LC₅₀ составил $1.4\text{--}28.5$ мкг/мл (Ma et al., 2023) и на один–два порядка для эндофитного штамма *Bti* в отношении личинок *Aedes*, где значения LC₅₀ составили 17.4 нг/мл (García-Suárez et al., 2021).

Наши результаты показали, что каждый из изолятов *Bti*, выделенных из кишечника личинок *A. flavescens*, имел схожую инсектицидную активность по отношению как к личинкам *A. aegypti*,

Таблица 2. Предполагаемая идентификация последовательностей гена 16S rRNA штаммов *Bt* subsp. *israelensis* 4369, 4929 и 4999, выделенных из кишечников личинок комаров *Aedes flavescens*, с использованием алгоритма BLAST в сравнении с аналогичными последовательностями из Gen Bank (Номера доступа GenBank)

Номер изолята	Номера доступа GenBank	Ближайшая запись	Номера доступа GenBank	Покрытие, %	Идентичность, %
4369	PP396075	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain IAM 12077/ <i>Bacillus thuringiensis</i> strain ATCC 10792	NR_043403.1/ NR_114581.1	99	99.79
4929	PP396076	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain ATCC 10792/ <i>Bacillus thuringiensis</i> strain IAM 12077	NR_114581.1/ NR_043403.1	100	100
4999	PP396077	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain IAM 12077/ <i>Bacillus thuringiensis</i> strain ATCC 10792	NR_043403.1/ NR_114581.1	99	100

Таблица 3. Инсектицидная активность LC_{50} штаммов *Bacillus thuringiensis* для личинок кровососущих комаров *A. aegypti* и *C. pipiens pipiens* из естественных мест обитания через 24 ч после воздействия

Штамм	Микроскопия 6-сут культуры	<i>Aedes aegypti</i> L3		<i>Culex pipiens pipiens</i> L3	
		KOE $\times 10^8$ спор/мл	$LC_{50} \times 10^{-4}$ мкг/ мл*	KOE $\times 10^8$ спор/мл	$LC_{50} \times 10^{-4}$ мкг/ мл*
<i>Bti</i> 4369	Споры и кристаллы	2.26 (1.95–2.62)	1.74	1.81 (1.50–2.18)	1.39
<i>Bti</i> 4929	Споры и кристаллы	35.9 (3.25–3.97)	17.6	32.7 (2.97–3.60)	16.0
<i>Bti</i> 4999	Споры и кристаллы	1.62 (1.35–1.96)	1.75	1.47 (1.22–1.78)	1.58

Примечание. Каждый биоанализ включал 5 концентраций, в трех биологических повторностях в трех повторениях.

*Лиофилизат споро-кристаллической смеси бактерий *Bt*.

так и *C. pipiens pipiens*. Высокая инсектицидная активность штаммов *Bti*, вероятно, связана с их уникальными комбинациями эндотоксинов. Считается, что Сут токсины обладают либо слабой инсектицидной активностью, либо выступают синергистами Сгу токсинов. Подобные синергические взаимодействия довольно широко описаны для *A. aegypti* (Sur et al., 2003; Manasherob et al., 2006; González-Villarreal et al., 2020; Valtierra-de-Luis et al., 2020; Lai et al., 2023). Не исключено, что между солюбилизованными эндотоксинами разных штаммов *Bti* может происходить взаимодействие, приводящее к синергическому эффекту.

Таким образом, в данном исследовании были идентифицированы три штамма *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* H14 – 4369, 4929 и 4999 из кишечника нативных личинок кровососущих комаров *Aedes flavescens*. Данные штаммы различались размером колоний и типом края, а также имели различия биохимических характеристик и профиля белковых эндотоксинов. *Bti* 4369, 4929 и 4999 проявляли высокую инсектицидную активность по отношению к двум видам личинок комаров *A. aegypti* и *C. pipiens pipiens* из естественных мест обитания. Полученные штаммы можно рассматривать как перспективные для создания биопрепаратов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы признательны за оказанную техническую поддержку при подготовке рукописи Т.Н. Клементьевой (ИСИЭЖ СО РАН).

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование было поддержано Программой фундаментальных научных исследований (ФНИ) государственной академии наук на 2021–2025 гг., проект № 1021051703454-5-1.6.12 (FWGS-2021-0001).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

В настоящей статье отсутствует конфликт интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Гаджиева С.С. Филогенетическая структура и состав фауны кровососущих комаров (*Diptera, Culicidae*) Северного Кавказа и факторы, определяющие их динамику // Известия ДГПУ. Естественные и точные науки. 2021. Т. 15. № 1. С. 27–32. <https://doi.org/10.31161/1995-0675-2021-15-1-27-32>
- Мирзаева А.Г., Смирнова Ю.А., Юрченко Ю.А., Кононова Ю.А. К познанию фауны и экологии кровососущих комаров (*Diptera, Culicidae*) лесостепных и степных районов Западной Сибири // Паразитология. 2007. Т. 41. № 4. С. 253–267.
- Халин А.В., Айбулатов С.В., Филоненко И.В. Распространение кровососущих комаров (*Diptera, Culicidae*) на северо-западе России: виды рода *Aedes meigen* // Энтومол. обозр. 2021. Т. 100. С. 755–796. <https://doi.org/10.31857/S0367144521040055>
- Baig D.N., Mehnaz S. Determination, and distribution of cry-type genes in halophilic *Bacillus thuringiensis* isolates of Arabian Sea sedimentary rocks // Microbiol. Res. 2010. V. 165. P. 376–383. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2009.08.003>
- Becker N. Ice granules containing endotoxins of microbial agents for the control of mosquito larvae – a new application technique // J. Am. Mosq. Control Assoc. 2003. V. 19. P. 63–66.

- Ben-Dov E., Zaritsky A., Dahan E., Barak Z., Sinai R., Manasherob R., Khamraev A., Troitskaya E., Dubitsky A., Berezina N., Margalith Y. Extended screening by PCR for seven cry-group genes from field-collected strains of *Bacillus thuringiensis* // Appl. Environ. Microbiol. 1997. V. 63. P. 4883–4890.
https://doi.org/10.1128/aem.63.12.4883-4890.1997
- Ben-Dov E. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and its dipteran-specific toxins // Toxins. 2014. V. 6. P. 222–243.
https://doi.org/10.3390/toxins6041222
- Bravo A., Gill S.S., Soberón M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* toxins and their potential for insect control // Toxicon. 2007. V. 49. P. 423–435.
https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.11.022
- Bravo A., Likitvivanavong S., Gill S.S., Soberón M. *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide // Insect Biochem. Mol. Biol. 2011. V. 41. P. 423–431.
https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2011.02.006
- Canton P.E., Reyes E.Z., de Escudero I.R., Bravo A., Soberón M. Binding of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cry4Ba to Cyt1Aa has an important role in synergism // Peptides. 2011. V. 32. P. 595–600.
- Chertkova E., Kabilov M.R., Yaroslavl'tseva O., Polenogova O., Kosman E., Sidorenko D., Alikina T., Noskov Y., Krivopalov A., Glupov V.V., Kryukov V.Yu. Links between soil microbiomes and fungistasis toward fungi infecting the colorado potato beetle // Microorganisms. 2023. V. 11. Art. 943.
https://doi.org/10.3390/microorganisms11040943
- Crickmore N., Bone E.J., Williams J.A., Ellar D.J. Contribution of the individual components of the δ -endotoxin crystal to the mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* // FEMS Microbiol. Lett. 1995. V. 131. P. 249–254.
- De Barjac H., Bonnefoi A. Essai de classification biochimique et sérologique de 24 souches de *Bacillus* de type *B. thuringiensis* // Entomophaga. 1962. V. 1. P. 5–31.
- De Barjac H., Bonnefoi A. Mise au point sur la classification des *Bacillus thuringiensis* // Entomophaga. 1973. V. 18. P. 5–17.
- De Maagd R.A., Bravo A., Crickmore N. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world // Trends Genet. 2001. V. 17. P. 193–199.
https://doi.org/10.1016/S0168-9525(01)02237-5
- De Maagd R.A., Bravo A., Berry C., Crickmore N., Schnepf H.E. Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria // Annu. Rev. Genet. 2003. V. 37. P. 409–433.
https://doi.org/10.1146/annurev.genet.37.110801.143042
- Federici B.A., Lüthy P., Ibarra J.E. Parasporal body of *Bacillus thuringiensis israelensis*: structure, protein composition, and toxicity // Bacterial control of mosquitoes & black flies. Biochemistry, genetics & applications of *Bacillus thuringiensis israelensis* and *Bacillus sphaericus* / Eds. H. de Barjac, D.J. Sutherland. London, UK: Unwin Hyman, 1990. P. 16–44.
- Federici B.A., Park H.-W., Sakano Y. Insecticidal Protein Crystals of *Bacillus thuringiensis* // Inclusions in Prokaryotes / Ed. Shively J.M. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 2006. P. 195–235.
https://doi.org/10.1007/3-540-33774-1_8
- Fernández-Chapa D., Ramírez-Villalobos J., Galán-Wong L. Toxic potential of *Bacillus thuringiensis*: an overview. Protecting rice grains in the post-genomic era. IntechOpen, 2019.
https://doi.org/10.5772/intechopen.85756
- González-Villarreal S.E., García-Montelongo M., Ibarra J.E. Insecticidal activity of a Cry1Ca toxin of *Bacillus thuringiensis* Berliner (Firmicutes: Bacillaceae) and its synergism with the Cyt1Aa toxin against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) // J. Med. Entomol. 2020. V. 57. P. 1852–1856.
- Höfte H., Whiteley H.R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* // Microbiol. Rev. 1989. V. 53. P. 242–255.
https://doi.org/10.1128/mr.53.2.242-255.1989
- Ibarra J.E., del Rincón M.C., Ordúz S., Noriega D., Benintende G., Monnerat R., Regis L., de Oliveira C.M., Lanz H., Rodríguez M.H., Sánchez J., Peña G., Bravo A. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Latin America with insecticidal activity against different mosquito species // Appl. Environ. Microbiol. 2003. V. 69. P. 5269–5274.
https://doi.org/10.1128/AEM.69.9.5269-5274
- Ishii T., Ohba M. The 23-kilodalton CytB protein is solely responsible for mosquito larvicidal activity of *Bacillus thuringiensis* serovar *kyushuensis* // Curr. Microbiol. 1994. V. 29. P. 91–94.
https://doi.org/10.1007/BF01575754
- García-Suárez R., Verduzco-Rosas L. A., Ibarra J.E. Isolation and characterization of two highly insecticidal, endophytic strains of *Bacillus thuringiensis* // FEMS Microbiol. Ecol. 2021. V. 97. Art. fiab080.
https://doi.org/10.1093/femsec/fiab080
- Kumar P., Kamle M., Borah R., Kumar D.K., Sharma B. *Bacillus thuringiensis* as microbial biopesticide: uses and application for sustainable agriculture // Egypt. J. Biol. Pest Control. 2021. V. 31. Art. 95.
https://doi.org/10.1186/s41938-021-00440-3
- Lai L., Villanueva M., Muruzabal-Galarza A., Fernández A.B., Unzué A., Toledo-Arana A., Caballero P., Caballero C.J. *Bacillus thuringiensis* Cyt proteins as enablers of activity of Cry and Tpp toxins against *Aedes albopictus* // Toxins. 2023. V. 15. Art. 211.
https://doi.org/10.3390/toxins15030211
- Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage // Nature. 1970. V. 227. P. 680–685.
- Liu H.M., Yang P.P., Cheng P., Wang H.F., Liu L.J., Huang X., Zhao Y.Q., Wang H.W., Zhang C.X., Gong M.Q. Resistance level of mosquito species (Diptera: Culicidae) from Shandong Province, China // Int. J. Insect Sci. 2015. V. 7. P. 47–52.
https://doi.org/10.4137/IJIS.S24232

- Ma X., Hu J., Ding C., Portieles R., Xu H., Gao J., Du L., Gao X., Yue Q., Zhao L., Borrás-Hidalgo O. New native *Bacillus thuringiensis* strains induce high insecticidal action against *Culex pipiens pallens* larvae and adults // BMC Microbiol. 2023. V. 23. P. 100. <https://doi.org/10.1186/s12866-023-02842-9>
- Manasherob R., Itsko M., Sela-Baranes N., Ben-Dov E., Berry C., Cohen S., Zaritsky A. Cyt1 Ca from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*: production in *Escherichia coli* and comparison of its biological activities with those of other Cyt-like proteins // Microbiology (Reading). 2006. V. 152. P. 2651–2659.
- McClintock J.T., Schaffer C.R., Sjoblad R.D. A comparative review of the mammalian toxicity of *Bacillus thuringiensis*-based pesticides // Pestic. Sci. 1995. V. 45. P. 95–105.
- Mishra P.K., Bisht S.C., Ruwari P., Subbanna A.R.N.S., Bisht K., Bhatt J., Gupta H.S. Genetic diversity and functional characterization of endophytic *Bacillus thuringiensis* isolates from the North Western Indian Himalayas // Ann. Microbiol. 2017. V. 67. P. 143–155. <https://doi.org/10.1007/s13213-016-1244-0>
- Onen H., Luzala M.M., Kigozi S., Sikumbili R.M., Muanaga C.-J.K., Zola E.N., Wendji S.N., Buya A.B., Balciunaitiene A., Viškelis J., Kaddumukasa M.A., Memvanga P.B. Mosquito-borne diseases and their control strategies: an overview focused on green synthesized plant-based metallic nanoparticles // Insects. 2023. V. 14. Art. 221. <https://doi.org/10.3390/insects14030221>
- Orduz S., Diaz T., Restrepo N., Patiño M.M., Tamayo M.C. Biochemical, immunological and toxicological characteristics of the crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin* // Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1996. V. 91. P. 231–237. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761996000200020>
- Pérez C., Fernandez L.E., Sun J., Folch J.L., Gill S.S., Soberón M., Bravo A. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cyt1Aa synergizes Cry11Aa toxin by functioning as a membrane-bound receptor // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 2005. V. 102. P. 18303–18308.
- Raymond B., Johnston P.R., Nielsen-LeRoux C., Lereclus D., Crickmore N. *Bacillus thuringiensis*: An important pathogen? // Trends Microbiol. 2010. V. 18. P. 189–194. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2010.02.006>
- Reyes-Ramírez A., Ibarra J.E. Fingerprinting of *Bacillus thuringiensis* type strains and isolates by using *Bacillus cereus* group specific repetitive extragenic palindromic sequence-based PCR analysis // Appl. Environ. Microbiol. 2005. V. 71. P. 1346–1355. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.3.1346-1355.2005>
- Schnepf E., Crickmore N., Van Rie J., Lereclus D., Baum J., Feitelson J., Zeigler D.R., Dean D.H. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 1998. V. 62. P. 775–806. <https://doi.org/10.1128/MMBR.62.3.775-806.1998>
- Shishir A., Roy A., Islam N., Rahman A., Khan S.N., Hoq M.M. Abundance, and diversity of *Bacillus thuringiensis* in Bangladesh and their cry genes profile // Front. Environ. Sci. 2014. V. 2. Art. 20. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2014.00020>
- Soares-da-Silva J., Queirós S.G., de Aguiar J.S., Viana J.L., Neta M.D.R.A.V., da Silva M.C., Pinheiro V.C.S., Polanczyk R.A., Carvalho-Zilse G.A., Tadei W.P. Molecular characterization of the gene profile of *Bacillus thuringiensis* Berliner isolated from Brazilian ecosystems and showing pathogenic activity against mosquito larvae of medical importance // Acta Trop. 2017. V. 176. P. 197–205. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.08.006>
- Sur B., Nigam N., Joshi A.K., Bihari V. Characterization of mosquito larvicidal *Bacillus thuringiensis* isolated from soils of India // Indian J. Biotechnol. 2003. V. 2. P. 268–270.
- Valtierra-de-Luis D., Villanueva M., Lai L., Williams T., Caballero P. Potential of Cry10Aa and Cyt2Ba, two minority δ -endotoxins produced by *Bacillus thuringiensis* ser. *israelensis*, for the control of *Aedes aegypti* larvae // Toxins. 2020. V. 12. Art. 355.
- Van Frankenhuyzen K. Cross-order and cross-phylum activity of *Bacillus thuringiensis* pesticidal proteins // J. Invert. Pathol. 2013. V. 114. P. 76–85. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2013.05.010>
- Yan M., Roehrl M.H., Wang J.Y. Discovery of crystalline inclusions in *Bacillus licheniformis* that resemble parasporal crystals of *Bacillus thuringiensis* // Can. J. Microbiol. 2007. V. 53. P. 1111–1115. <https://doi.org/10.1139/W07-076>
- Weisburg W.G., Barns S.M., Pelletier D.A., Lane D.J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study // J. Bacteriol. 1991. V. 173. P. 697–703.
- Wu D., Cheng F.N. Synergism in mosquitocidal activity of 26 and 65 kDa proteins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* crystal // FEBS Lett. 1985. V. 190. P. 232–236. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(85\)81290-4](https://doi.org/10.1016/0014-5793(85)81290-4)

EXPERIMENTAL ARTICLES

New Strains of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Highly Toxic for *Aedes aegypti* and *Culex pipiens pipiens*

V. P. Khodyrev¹, O. V. Polenogova^{1, *}, A. S. Artemchenko¹, A. V. Krivopalov¹ and V. V. Glupov¹

¹*Institute of Systematics and Ecology of Animals SB RAS, Novosibirsk, 630091, Russia*

**e-mail: ovp0408@yandex.ru*

Bacillus thuringiensis subsp. *israelensis* (*Bti*) is a known subspecies of crystal-forming entomopathogenic bacteria used to control blood-sucking mosquitoes. In this work, we isolated three different strains of *Bti* 4369, 4929 and 4999 from the wild larvae midgut of blood-sucking mosquitoes *Aedes flavescens*. The bacterial isolates were identified by the 16S rRNA gene and serotype determination revealed that the strains belonged to *Bt* subsp. *israelensis* H14. The strains had differences in bacterial colony morphology, a number of biochemical characteristics and protein endotoxin profiles. The isolated strains *Bti* 4369 and 4999 showed high insecticidal activity against *Culex pipiens pipiens* and *Aedes aegypti* larvae, with LC_{50} values of 1.47×10^8 – 2.26×10^8 spores/ml 24 hours after treatment. The value for strain *Bti* 4929 LC_{50} was 32.7 – 35.9×10^8 spores/ml. The new isolated strains of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* have high potential for the development of ecological friendly bioinsecticides for the control of blood-sucking mosquitoes.

Keywords: bioinsecticides, blood-sucking mosquitoes, insecticide activity, entomopathogenic bacteria, biological control

УДК 579.258+579.222

ЭКСПРЕССИЯ ГЕТЕРОЛОГИЧНОЙ ФЕП-КАРБОКСИЛАЗЫ В *METHYLOCOCCUS CAPSULATUS* MIR: ВЛИЯНИЕ НА РОСТОВЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ И АМИНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ БИОМАССЫ МЕТАНОТРОФА

© 2024 г. С. Ю. Бут^{a, b, *}, О. Н. Розова^{a, b}, С. В. Чистякова^b, Д. С. Потапова^c,
В. Н. Хмеленина^b, И. И. Мустахимов^{a, b}

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

^bФИЦ “Пушчинский научный центр биологических исследований РАН”, ИБФМ РАН,

Московская обл., Пушкино, 142290, Россия

^cТульский государственный университет, Тула, 300012, Россия

*e-mail: sergeybut20063@gmail.com

Поступила в редакцию 20.06.2024 г.

После доработки 24.06.2024 г.

Принята к публикации 24.06.2024 г.

Methylococcus capsulatus MIR — штамм метанотрофных бактерий, потенциально пригодный для использования в биотехнологии получения кормового белка и других продуктов с добавленной стоимостью из метана. Геномный анализ не выявил у *Mc. capsulatus* MIR известных путей С3-карбоксилирования, необходимых для восполнения интермедиатов цикла трикарбоновых кислот и полноценного функционирования метаболизма. Ген *perc*, кодирующий ФЕП-карбоксилазу у *Methylomonas rapida* 12, вносили в клетки *Mc. capsulatus* MIR на плазмиде под контролем промотора средней силы. Экспрессия гетерологичной ФЕП-карбоксилазы в клетках рекомбинантного штамма привела к повышению содержания глутамата, глицина и лизина, однако не привела к увеличению скорости роста культуры. Таким образом, внесение гетерологичной ФЕП-карбоксилазы, осуществляющей реакцию С3-карбоксилирования, способствует повышению пищевой ценности биомассы метанотрофа.

Ключевые слова: метанотрофы, белок одноклеточных, *Methylococcus capsulatus*, ФЕП-карбоксилаза

DOI: 10.31857/S0026365624060173

Метан является вторым по распространенности после диоксида углерода парниковым газом. При этом концентрация метана в атмосфере в последнее время выросла до угрожающих значений, что вносит значительный вклад в глобальное потепление (Schaefer et al., 2016; Tollefson, 2022). Одним из основных источников метана является попутный газ, выделяемый при добыче нефти, который в настоящее время большей частью не используется, а просто сжигается. Аэробные метанотрофы — специализированная группа бактерий, использующих метан и метанол в качестве источников углерода и энергии (Hanson, Hanson, 1996). Благодаря способности синтезировать из метана все клеточные компоненты, метанотрофы рассматриваются в качестве биокатализаторов при получении широкого спектра органических соединений (Henard et al., 2016; Strong et al., 2016).

Термотолерантный метанотроф *Methylococcus capsulatus* MIR, выделенный из ила городских очистных сооружений Иркутска, обладает высокой скоростью роста при 42°C и перспективен в качестве продуцента кормового белка (Oshkin et al., 2022).

Анализ доступных геномов метанотрофов рода *Methylococcus* не выявил гены, кодирующие известные ферменты С3-карбоксилирования (Oshkin et al., 2021). Вместе с тем данные анаплеоротические реакции важны в метаболизме бактерий, поскольку восполняют пул соединений, образующихся в цикле трикарбоновых кислот (ЦТК) и расходуемых на синтез аминокислот и вторичных метаболитов. Метанотрофы I типа используют рибулозомонофосфатный цикл в качестве основного пути ассимиляции С1-соединений. Кроме того, у этих бактерий присутствуют гены

серинового пути, который, однако, считается неполным из-за отсутствия генов фосфоенолпируват (ФЕП) карбоксилазы — одного из ключевых ферментов серинового пути (But et al., 2019). Единственным исключением из этой закономерности являются метанотрофы рода *Methylomonas*, поскольку в их геномах имеется полный набор генов серинового цикла. У других метанотрофов I типа, в частности, у *Methylothermobacter alcaliphilum* 20Z, имеются пируваткарбоксилаза и ФЕП-карбоксикиназа, по-видимому, выполняющие функцию восполнения оксалоацетата — предшественника аминокислот аспартатной группы. Ранее было обнаружено, что сверхэкспрессия СЗ карбоксилаз может улучшать ростовые характеристики гетеротрофных бактерий за счет увеличения потока углерода в ЦТК (Koffas et al., 2003; Buch et al., 2010). Аналогичный эффект можно ожидать для метанотрофов.

Целью данной работы являлось изучение влияния экспрессии гетерологичной ФЕП-карбоксилазы из *Methylomonas rapida* 12 на ростовые характеристики и накопление аминокислот у термотолерантного метанотрофа *Mc. capsulatus* MIR.

Mc. capsulatus MIR выращивали на среде П (Хмеленина и соавт., 1994) в атмосфере метана и воздуха при 42°C. Для сверхэкспрессии ФЕП-карбоксилазы была создана плазмида, в которой ген *perc* из *Methylomonas rapida* 12 находился под контролем промотора *PphaC* из *Cupriavidus necator* H16. Ранее *PphaC* зарекомендовал себя как промотор средней силы при использовании

в клетках *Mc. capsulatus* (Rumah et al., 2023). Полученную плазмиду pAWP-*perc* вводили в клетки *Mc. capsulatus* MIR с помощью конъюгации со штаммом *E. coli* S-17-1. Трансконъюганты отбирали на среде П, содержащей 25 мкг/мл канамицина. Для получения рекомбинантной ФЕП-карбоксилазы ген *perc* клонировали в экспрессионном векторе pET28b(+), полученной плазмидой трансформировали штамм *E. coli* Rosetta (DE3). Клетки, несущие плазмиду, выращивали на среде LB до ОП₆₀₀ ~ 0.6, индукцию экспрессии осуществляли с помощью добавления изопропил-β-D-1-тиогактопиранозида (ИПТГ) до концентрации 0.5 мМ и инкубацией в течение ночи при 18°C. Рекомбинантный фермент очищали на колонке с Ni-NTA-агарозой (“Quiagen”, Германия), элюируя градиентом имидазола. Активность ФЕП-карбоксилазы измеряли спектрофотометрически при 340 нм в реакционной смеси, содержащей 50 мМ MOPS-KOH (pH 9.0), 5 мМ MgCl₂, 5 мМ KHCO₃, 3 мМ НАДН, 5 Е малат-дегидрогеназы из *Methylosinus trichosporium* OB3b (Розова и соавт., 2019). Для измерения содержания аминокислот *Mc. capsulatus* MIR/pAWP-*perc* выращивали в качалочных колбах с 200 мл среды П, содержащей 25 мкг/мл канамицина. Колбы заполняли смесью метан-воздух (1 : 1), культивировали при 42°C в течение 2 сут. В качестве контроля использовали клетки, несущие плазмиду pAWP-*PphaC* без гена *perc*. Биомассу собирали, лиофилизировали, метаболиты экстрагировали

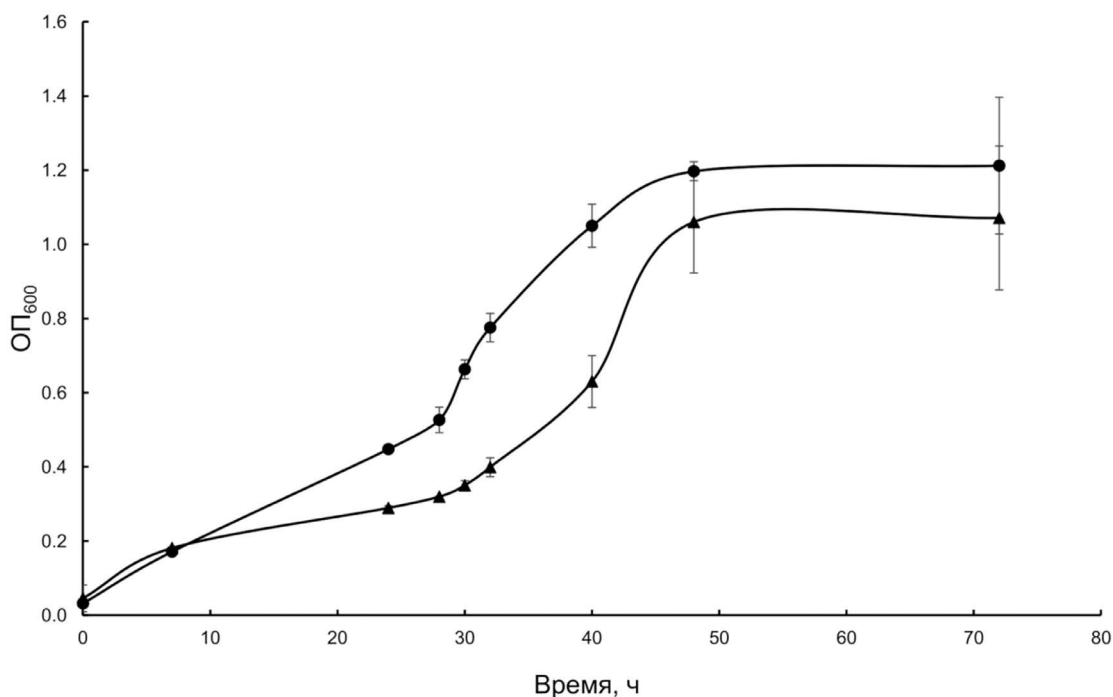


Рис. 1. Кривые роста штаммов MIR/pAWP-*PphaC* (1) и MIR/pAWP-*perc* (2).

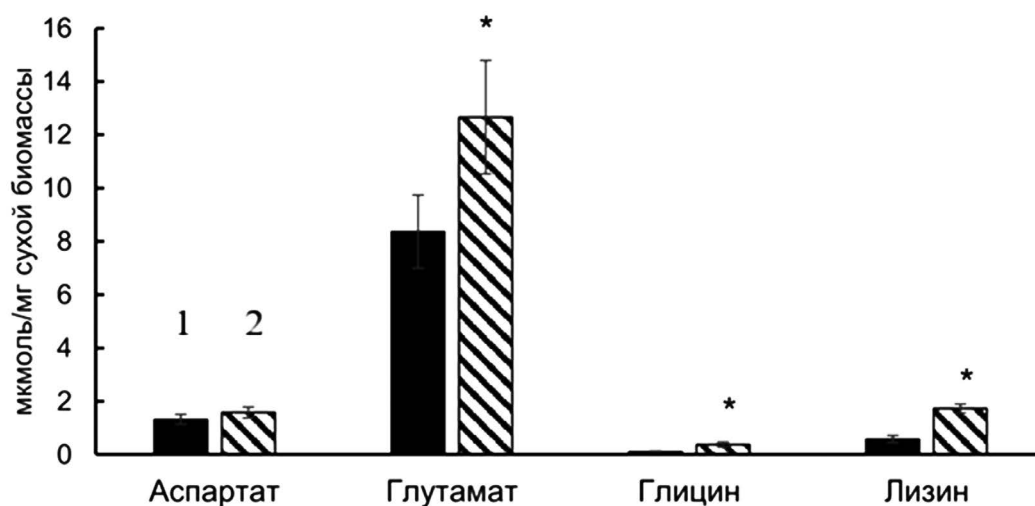


Рис. 2. Накопление аминокислот клетками штаммов MIR/pAWP-Pphac (1) и MIR/pAWP-perc (2). Бары представляют стандартное отклонение для трех независимых экспериментов. Для определения статистической значимости различий использовали тест Стьюдента; * $p < 0.05$.

80%-м хлороформом. Экстракты упаривали досуха, растворяли в воде, несколько раз экстрагировали метанолом, водную фракцию использовали для анализа аминокислот. Анализ проводили на колонке Reprosil OPA (“Dr. Maisch”, Германия), как описано ранее (But et al., 2020).

Функциональность ФЕП-карбоксилазы из *Methylomonas methanica* 12 была доказана с помощью гетерологичной экспрессии в *E. coli*. Фермент катализировал карбоксилирование ФЕП до оксалоацетата в присутствии бикарбоната-ионов. Максимальную активность рекомбинантная ФЕП-карбоксилаза проявляла при 45°C и pH 9.0. Активность фермента в 2.5 раза стимулировалась внесением в реакционную смесь пирувата. Фермент подчинялся кинетике Хилла. В присутствии 1 мМ пирувата активность фермента (V_{max}) составила 22.2 ± 0.6 Е/мг белка, а значение $S_{0.5}$ для ФЕП – 0.26 ± 0.02 мМ. Пируват является одним из центральных метаболитов у метанотрофов I типа. Повышение активности и аффинности к субстрату ФЕП-карбоксилазы из *Mm. methanica* 12 в присутствии пирувата делают данный фермент удачным выбором для создания синтетического анаплеротического пути у *Mc. capsulatus* MIR.

Гетерологичная экспрессия ФЕП-карбоксилазы в *Mc. capsulatus* MIR не привела к увеличению скорости роста по сравнению с контрольным штаммом, несущим пустой вектор (рис. 1), при этом штамм, несущий ген *perc*, накапливал меньше биомассы. Анализ свободных аминокислот выявил повышение уровня глутамата, глицина и лизина (рис. 2).

Данный результат является логичным, поскольку лизин и глутамат синтезируются из интермедиатов

ЦТК – оксалоацетата (через аспартат) и 2-оксоглутарата соответственно. Примечательно, что при этом содержание аспартата в клетках модифицированного штамма не изменилось, что, возможно, связано с оттоком аминокислоты на биосинтез. Особый интерес представляет увеличение содержания лизина. Поскольку данная аминокислота является незаменимой, биомасса, обогащенная лизином, имеет повышенную ценность с биотехнологической точки зрения. Экспрессия ФЕП-карбоксилазы не повлияла на скорость роста, что можно объяснить тем фактом, что, в отличие от гетеротрофных бактерий (Koffas et al., 2003; Buch et al., 2010), ЦТК у метанотрофов не является основным источником энергии, а значительная часть восстановительных эквивалентов образуется при последовательном окислении метана до CO_2 .

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках проекта “Развитие технологий геномного редактирования для решения инновационных задач промышленных и пищевых биотехнологий” № 075-15-2021-1071, финансируемого Министерством науки и высшего образования РФ.

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

- Розова О. Н., Хмеленина В. Н., Мустахимов И. И., Бут С. Ю., Троценко Ю. А. Свойства рекомбинантного малик-фермента у аэробного метанотрофа *Methylosinus trichosporium* // Биохимия. 2019. Т. 84. С. 532–539.
- Rozova O. N., Khmelenina V. N., Mustakhimov I. I., But S. Yu., Trotsenko Yu. A. Properties of malic enzyme from the aerobic methanotroph *Methylosinus trichosporium* // Biochemistry (Moscow). 2019. V. 84. P. 390–397.
- Хмеленина В. Н., Бесчастный А. П., Гаязов А. П., Троценко Ю. А. Влияние пирофосфата на рост и метаболизм *Methylomonas methanica* // Микробиология. 1994. Т. 63. С. 188–193.
- Buch A., Archana G., Naresh Kumar G. Heterologous expression of phosphoenolpyruvate carboxylase enhances the phosphate solubilizing ability of fluorescent pseudomonads by altering the glucose catabolism to improve biomass yield // Bioresour Technol. 2010. V. 101. P. 679–687.
- But S. Y., Egorova S. V., Khmelenina V. N., Mustakhimov I. I. Malyl-CoA lyase provides glycine/glyoxylate synthesis in type I methanotroph // FEMS Microbiol. Lett. 2020. V. 367. Art. fnaa207.
- But S. Y., Egorova S. V., Khmelenina V. N., Trotsenko Y. A. Serine-glyoxylate aminotransferases from methanotrophs using different C1-assimilation pathways // Antonie van Leeuwenhoek. 2019. V. 112. P. 741–751.
- Hanson R., Hanson T. Methanotrophic bacteria // Microbiol. Rev. 1996. V. 60. P. 439–471.
- Henard C. A., Smith H., Dowe N., Kalyuzhnaya M. G., Pienkos P. T., Guarnieri M. T. Bioconversion of methane to lactate by an obligate methanotrophic bacterium // Sci. Rep. 2016. V. 6. Art. 21585.
- Koffas M. A. G., Jung G. Y., Stephanopoulos G. Engineering metabolism and product formation in *Corynebacterium glutamicum* by coordinated gene overexpression // Metab. Eng. 2003. V. 5. P. 32–41.
- Oshkin I. Y., Danilova O. V., But S. Y., Miroshnikov K. K., Suleimanov R. Z., Belova S. E., Tikhonova E. N., Kuznetsov N. N., Khmelenina V. N., Pimenov N. V., Dedysh S. N. Expanding characterized diversity and the pool of complete genome sequences of *Methylococcus* species, the bacteria of high environmental and biotechnological relevance // Front. Microbiol. 2021. V. 12. Art. 756830.
- Oshkin I. Y., Suleimanov R. Z., Khmelenina V. N., Mardanov A. V., Pimenov N. V., Dedysh S. N. Complete genome sequence of *Methylococcus capsulatus* MIR, a methanotroph capable of growth on methanol // Microbiol. Resour. Announc. 2022. V. 11. Art. e0054222.
- Rumah B. L., Claxton Stevens B. H., Yeboah J. E., Stead C. E., Harding E. L., Minton N. P., Zhang Y. In vivo genome editing in type I and II methanotrophs using a CRISPR/Cas9 system // ACS Synth. Biol. 2023. V. 12. P. 544–554.
- Schaefer H., Mikaloff Fletcher S. E., Veidt C., Lassey K. R., Brailsford G. W., Bromley T. M., Dlugokencky E. J., Michel S. E., Miller J. B., Levin I., Lowe D. C., Martin R. J., Vaughn B. H., White J. W. C. A 21st-century shift from fossil-fuel to biogenic methane emissions indicated by ¹³CH₄ // Science. 2016. V. 352. P. 80–84.
- Strong P. J., Kalyuzhnaya M., Silverman J., Clarke W. P. A methanotroph-based biorefinery: potential scenarios for generating multiple products from a single fermentation // Bioresour. Technol. 2016. V. 215. P. 314–323.
- Tollefson J. Scientists raise alarm over “dangerously fast” growth in atmospheric methane // Nature. 2022. <https://doi.org/10.1038/d41586-022-00312-2>

SHORT COMMUNICATIONS

**Expression of Heterologous PEP-Carboxylase in *Methylococcus capsulatus* MIR:
the Influence on Growth Characteristics
and Amino Acid Composition of Methanotrophic Biomass**

**S. Y. But^{1, 2, *}, O. N. Rozova^{1, 2}, S. V. Chistyakova², D. S. Potapova³,
V. N. Khmelenina², I. I. Mustakhimov^{1, 2}**

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

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

³Tula State University, Tula, 300012, Russia

*e-mail: sergeybut20063@gmail.com

Methylococcus capsulatus MIR is a strain of methanotrophic bacteria that is potentially suitable for producing feed protein and other value-added products from methane. Genomic analysis did not reveal in *Mc. capsulatus* MIR known pathways of C3-carboxylation, necessary for the replenishment of intermediates of the tricarboxylic acid cycle and the full functioning of metabolism. The *pepc* gene encoding PEP carboxylase in *Methylomonas rapida* 12 was introduced into *Mc. capsulatus* MIR cells on a plasmid under the control of a medium-strength promoter. Expression of heterologous PEP carboxylase led to an increase in the content of glutamate, glycine and lysine in the cells of the recombinant strain, but did not increase to the growth rate of the culture. Consequently, the introduction of heterologous PEP carboxylase, which carries out the C3-carboxylation reaction, helps to increase the nutritional value of the methanotroph biomass.

Keywords: methanotrophs, single cell protein, *Methylococcus capsulatus*, PEP-carboxylase

УДК 579.258+579.222

ИНДУКЦИЯ АЛКОГОЛЬДЕГИДРОГЕНАЗЫ У ДРОЖЖЕЙ *YARROWIA LIPOLYTICA* В СТРЕССОВЫХ УСЛОВИЯХ

© 2024 г. Е. Н. Бирюкова^{а, *}, А. Ю. Аринбасарова^а, А. Г. Меденцев^а

^аФИЦ “Пушкинский научный центр биологических исследований РАН”,
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,
Московская обл., Пушкино, Московская обл., 142290, Россия

*e-mail: biryukovae05@rambler.ru

Поступила в редакцию 14.06.2024 г.

После доработки 15.07.2024 г.

Принята к публикации 16.07.2024 г.

Впервые показано, что при стрессовых воздействиях у дрожжей *Yarrowia lipolytica* наряду с антиоксидантными ферментами проявляется активность алкогольдегидрогеназы. При росте на глюкозе в процессе перехода дрожжей из экспоненциальной в стационарную фазу роста, обусловленного истощением глюкозы, обнаружена способность клеток к окислению этанола. В условиях окислительного и теплового стрессов индукция алкогольдегидрогеназы сопряжена с увеличением активности антиоксидантных ферментов, в частности каталазы, супероксиддисмутазы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и глутатион редуктазы. Показано снижение внутриклеточного уровня АТФ и цАМФ у *Y. lipolytica* при различных стрессовых воздействиях, что коррелирует с увеличением активности антиоксидантных систем и НАД⁺-зависимой алкогольдегидрогеназы.

Ключевые слова: алкогольдегидрогеназа, дрожжи, стресс, биосинтез

DOI: 10.31857/S0026365624060182

В природных экосистемах микроорганизмы постоянно подвергаются влиянию различных неблагоприятных факторов внешней среды. К ним относят широкий спектр воздействий, приводящих к снижению и прекращению роста, включая переход дрожжей из фазы экспоненциального роста в стационарную, обусловленный истощением глюкозы (Temple et al., 2005, 2022; Janapala et al., 2019), окислительный, тепловой и другие стрессы (Belazzi, 1991; Hollenstein et al., 2021; Guzikowski et al., 2022). Кроме того, также к стрессовым воздействиям относят локальное воздействие этанола. Этанол, являясь короткоцепочечным спиртом, может легко проникать в липидный бислой биологических мембран и вызывать их “дезорганизацию”. Повышенная чувствительность клеток дрожжей по отношению к спиртам и альдегидам является не только результатом нарушения окислительно-восстановительного гомеостаза, вызванного индукцией окислительного стресса, но и следствием дисбаланса между пиридиннуклеотидными кофакторами (Kwolek-Mirek et al., 2022). Поэтому можно считать, что индукция и наличие фермента НАД⁺-зависимой алкогольдегидрогеназы у *Yarrowia*

lipolytica позволит клеткам быстро снижать содержание этанола и избегать его нежелательных воздействий.

В процессе эволюции путем развития адаптивных реакций грибы и дрожжи проявили удивительную способность к выживанию и развитию в неблагоприятных условиях. К адаптивным реакциям относят индукцию ферментов, участвующих в детоксикации вредных метаболитов: активных форм кислорода (каталазы, супероксид-дисмутазы, глутатионредуктазы, глутатионпероксидазы, тиоредуктазы), а также энзимов, поставляющих восстановленные пиридиннуклеотиды, глутатион и др.

У грибов и дрожжей сигнал на стресс состоит из модуля активируемой митогеном протеинкиназы К (МАРК). После запуска каскада фосфорилирования сигнал индуцирует экспрессию генов, связанных с синтезом белков и специфических молекул, которые используются грибами для лучшей конкуренции в окружающей среде. Эти молекулы обычно определяются как вторичные метаболиты, такие как меланины, микотоксины и антибактериальные соединения.

Цель данной работы — исследовать динамику внутриклеточного содержания адениновых нуклеотидов и цАМФ как основных факторов, контролирующих действие защитных механизмов у дрожжей *Y. lipolytica*, а также определить участие основных антиоксидантных ферментов (каталазы, супероксиддисмутазы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, глутатионредуктазы) и НАД⁺-зависимой алкогольдегидрогеназы в защите клеток от стрессовых воздействий.

В работе изучали дрожжи *Y. lipolytica* ВКМ Y-2378 (syn. *Yarrowia lipolytica* Y-155), полученные из ВКМ ИБФМ им. Г.К. Скрыбина РАН.

Культивирование осуществляли при 29°C в колбах объемом 750 мл, содержащих 100 мл среды Ридер с глюкозой (1%) или с этанолом (1%) на качалке (200 об./мин). Рост дрожжей оценивали по оптической плотности при длине волны 540 нм.

Стрессовые условия были смоделированы путем инкубации клеток экспоненциальной фазы роста в 50 мМ фосфатном буфере (pH 7.2) при температуре 37°C, либо путем обработки в присутствии 0.5 мМ H₂O₂.

Для получения бесклеточного экстракта клетки дрожжей, выращенных на глюкозе или этаноле, дважды промывали дистиллированной водой и суспендировали в 50 мМ *трис*-фосфатном буфере (pH 7.0), содержащем 0.5 мМ фенилметилсульфонилфторид (ингибитор протеаз), после чего разрушали на прессе Френча. Гомогенат центрифугировали при 105000 g в течение 60 мин. Активность ферментов определяли в осадке и супернатанте.

Активность алкогольдегидрогеназы определяли по скорости потребления кислорода клетками в присутствии этанола на полярографе с помощью закрытого тefлоновой пленкой платинового электрода типа Кларка и спектрофотометрически по восстановлению НАД⁺, при 340 нм. Среда измерения содержала *трис*-фосфатный буфер (50 мМ; pH 8.8), НАД⁺ (200 мкМ) и этанол (50 мМ). Активность фермента выражали в мкмоль/мин на 1 мг белка.

Экстракцию адениновых нуклеотидов и цАМФ из клеток дрожжей осуществляли 5%-ой хлорной кислотой. Для этой цели 4.5 мл клеточной суспензии, отобранной непосредственно из колбы, вносили в пробирку, содержащую 0.5 мл 50%-ой хлорной кислоты, тщательно перемешивали и инкубировали на ледяной бане. Экстракт нейтрализовали 5 н КОН при интенсивном перемешивании. Осадок удаляли центрифугированием при 15000 g, 60 мин. Экстракт хранили при –15°C. Концентрации АТФ, АДФ, АМФ определяли на флуориметре MPF-4 (“Hitachi”, Япония) по флуоресценции НАД(Ф)Н с гексокиназой, пируваткиназой и миокиназой. Определение цАМФ проводили по стандартной методике, используя набор фирмы “Amersham”.

Активность СОД (супероксиддисмутазы) определяли по ингибированию восстановления 10 мкМ цитохрома *c* (при 550 нм) в присутствии 0.5 мМ ксантина и 0.5 Е ксантиноксидазы. За единицу активности принимали количество фермента, вызывающее 50% ингибирование скорости восстановления цитохрома *c*.

Активность каталазы оценивали по изменению поглощения H₂O₂, E₂₄₀ = 0.32 мМ⁻¹ см⁻¹. Среда измерения содержала *трис*-фосфатный буфер (50 мМ; pH 7.0) и H₂O₂ (25 мМ).

Активность глутатионредуктазы измеряли по убыли НАДФН в присутствии окисленного глутатиона, E₃₄₀ = 6.22 мМ⁻¹ см⁻¹. Среда измерения содержала *трис*-фосфатный буфер (50 мМ; pH 7.0), НАДФН (0.15 мМ), MgCl₂ (3 мМ), окисленный глутатион (10 мМ). Концентрацию белка определяли с помощью биуретового реактива.

При исследовании дыхательной активности *Y. lipolytica* в процессе перехода из экспоненциальной фазы роста в стационарную, обусловленном истощением глюкозы, нами обнаружена способность клеток к окислению этанола.

Как видно на рисунке, у клеток из экспоненциальной фазы роста не было алкогольоксидазной активности (кривая 1), тогда как клетки из стационарной фазы в ответ на добавление этанола увеличивали скорость потребления кислорода почти в 4 раза (кривая 2).

Наши дальнейшие исследования показали, что различные стрессовые воздействия на клетки из экспоненциальной фазы роста также не приводят к развитию у *Y. lipolytica* способности к окислению этанола. Так предобработка клеток, собранных в экспоненциальной фазе роста, малой дозой H₂O₂ (0.5 мМ, 60 мин) или инкубация при 37°C в течение 60 мин также приводили к появлению у *Y. lipolytica* способности к окислению этанола (рисунок, кривые 2 и 3). Следовало ожидать, что активность алкогольдегидрогеназы в клетках может быть более высокой при выращивании на этаноле. Действительно, клетки *Y. lipolytica*, выращенные на этаноле, показали заметно более высокую скорость окисления этанола (рисунок, кривая 5).

Одновременное появление способности клеток *Y. lipolytica* к окислению этанола при их переходе в стационарную фазу роста, а также после стрессовых воздействий, приводят к активации антиоксидантных ферментов, в частности каталазы, супероксиддисмутазы, глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы и глутатионредуктазы (табл. 1).

Известно, что в условиях окислительного стресса для сохранения жизнеспособности клеток резко возрастает их потребность в восстановительных эквивалентах (NAD(P)H, восстановленного глутатиона) (Minard, McAlister-Henn, 2005; Minard et al., 2007). Нами установлено (табл. 1),

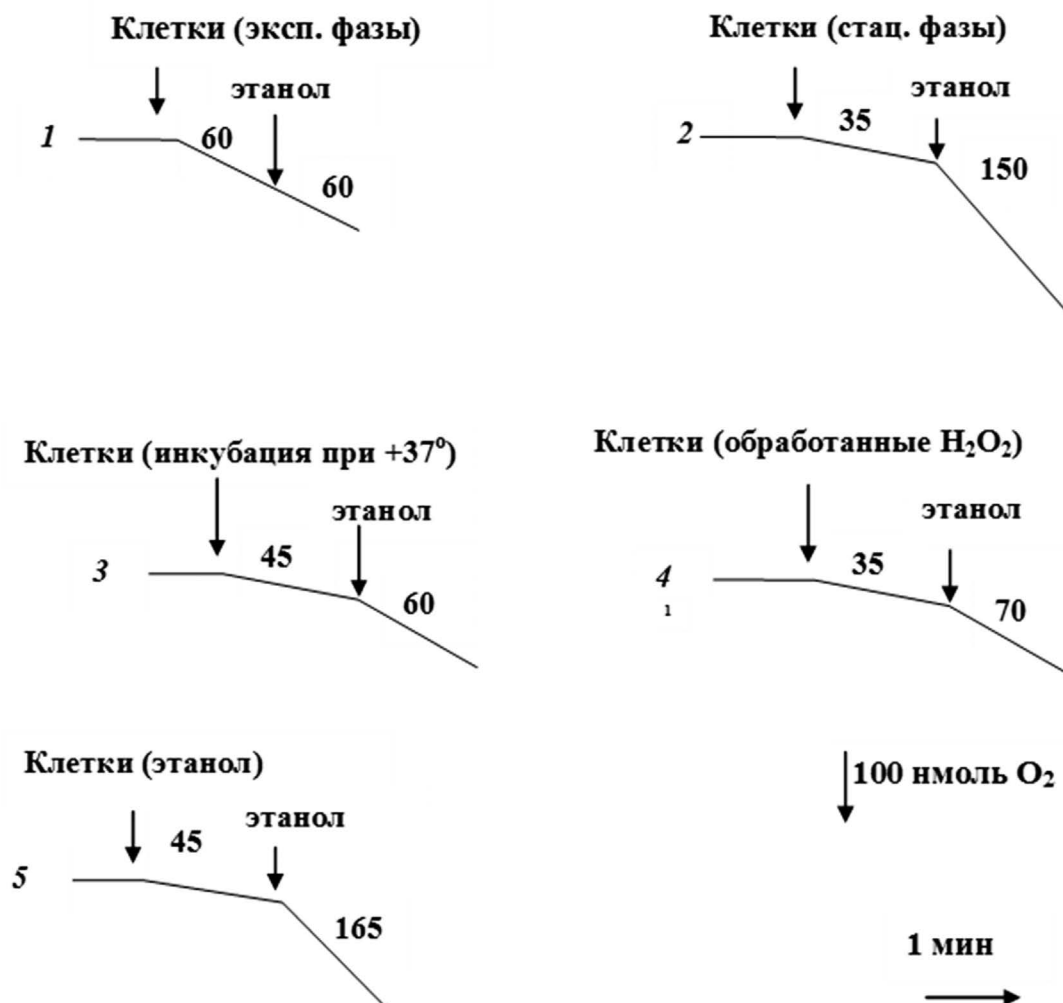


Рисунок. Окисление этанола клетками *Y. lipolytica* при росте на глюкозе и этаноле: 1 — из экспоненциальной фазы роста (эксп.); 2 — из стационарной фазы роста (стац.); 3 — обработанные 0.5 мМ H₂O₂; 4 — инкубированные при 37°C, 60 мин; 5 — выращенные на этаноле. Цифрами на кривых указана активность потребления кислорода, нмоль O₂/мин/мг сухих клеток.

что уровень активности глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы и глутатионредуктазы в клетках увеличивался более чем в 2 раза, как при переходе из экспоненциальной фазы роста в стационарную (убыль глюкозы), так и в условиях теплового (37°C, 60 мин) и окислительного стрессов (обработка 0.5 мМ H₂O₂, 60 мин).

Для выявления возможного механизма появления алкогольдегидрогеназной активности у *Y. lipolytica* была изучена динамика содержания в клетках адениновых нуклеотидов и цАМФ в условиях теплового стресса (инкубация при 37°C, 60 мин) (табл. 2). Оказалось, что в процессе инкубации наблюдается заметное снижение содержания АТФ, АДФ и цАМФ.

Известно, что уровень цАМФ в клетке определяется соотношением активностей аденилатциклазы

(синтез цАМФ) и фосфодиэстеразы (распад цАМФ). В стрессовых условиях, когда в клетках наблюдается снижение содержания АТФ, отмечается падение активности аденилатциклазы и стимуляция фосфодиэстеразы (Belazzi, 1991; Janapala et al., 2019; Yaakoub et al., 2022), что приводит в конечном итоге к падению уровня цАМФ.

Действие цАМФ (с участием цАМФ-зависимой протеинкиназы А) на стрессовые гены связано с наличием регуляторной последовательности CREs (cAMP-responsive elements) (Belazzi, 1991). У эукариотных микроорганизмов эта последовательность действует как “выключатель” определенных защитных генов при высокой концентрации глюкозы и повышенном уровне АТФ и цАМФ.

Таблица 1. Активность антиоксидантных ферментов и НАД⁺-зависимой алкогольдегидрогеназы *Y. lipolytica* в стрессовых условиях (представлены средние данные трех независимых определений)

Условия, фаза роста культуры	Активность, мкмоль/мин на 1 мг белка				
	Каталаза	СОД	НАД ⁺ -зависимая алкогольдегидрогеназа	Глутатионредуктаза	Глюкозо-6-фосфат дегидрогеназа
Клетки экспоненциальной фазы роста	28.0 ± 1.3	4.2 ± 0.45	1.2 ± 1.2	24.1 ± 2.1	70 ± 4.1
Клетки стационарной фазы роста	75.0 ± 4.3	8.4 ± 1.1	120 ± 10.0	69.2 ± 1.3	110 ± 5.3
Клетки экспоненциальной фазы роста, обработка H ₂ O ₂ (0.5 мМ, 60 мин)	93.0 ± 0.5	6.5 ± 0.7	116.0 ± 10.9	58.1 ± 6.4	120 ± 5.8
Клетки экспоненциальной фазы роста, инкубация (37°C, 60 мин)	120.0 ± 1.6	21.6 ± 2.3	99 ± 2.1	66.3 ± 7.6	105 ± 4.8

Таблица 2. Содержание адениновых нуклеотидов и цАМФ в клетках *Y. lipolytica* в условиях теплового стресса (инкубация при 37°C, 60 мин); представлены средние данные трех независимых определений

Условия инкубации клеток, 37°C	Содержание адениновых нуклеотидов и цАМФ, нмоль/мг сухих клеток			
	цАМФ	АТФ	АДФ	АМФ
0 мин	4.2 ± 0.2	7.0 ± 0.7	2.10 ± 0.2	0.75 ± 0.08
30 мин	3.4 ± 0.2	5.0 ± 0.5	1.55 ± 0.2	0.65 ± 0.07
60 мин	2.8 ± 0.12	4.0 ± 0.4	1.30 ± 0.12	0.50 ± 0.06
90 мин	2.6 ± 0.1	3.5 ± 0.3	0.85 ± 0.1	0.40 ± 0.045
120 мин	2.5 ± 0.2	3.3 ± 0.3	0.80 ± 0.1	0.40 ± 0.05

После исчерпания глюкозы и снижения уровня АТФ и цАМФ происходит дефосфорилирование белка CREB. Этот белок диссоциирует от элемента CRE, в результате чего происходит активация транскрипции генов и синтезом защитных белков. В настоящее время у грибов известно более 5 белков, транскрипция генов которых регулируется цАМФ по отрицательному (негативному) механизму. Учитывая особенности действия цАМФ у дрожжей как негативного фактора транскрипции ряда генов (Belazzi, 1991; Janapala et al., 2019; Yaakoub et al., 2022), можно полагать, что именно снижение уровня этого метаболита приводит к включению единого центра, ответственного за синтез и функционирование защитных белков, включая активности ферментов антиоксидантной системы и НАД⁺-зависимой алкогольдегидрогеназы. Однотипность стрессового ответа при воздействии различных негативных факторов является доказательством наличия у дрожжей общего центра активации защитных механизмов для повышения устойчивости клеток (Thevelein, 1994; Emri et al., 2022). Оценивая наличие активности алкогольдегидрогеназы

в комплексном ответе клеток на окислительный и другие стрессы, необходимо отметить, что этанол и другие короткоцепочечные спирты могут легко проникать в липидный бислой биологических мембран и вызывать дезорганизацию внешней и внутренней мембраны (Minard et al., 2007). Поэтому можно предположить, что наличие фермента позволяет клеткам дрожжей быстро снижать содержание этанола и избегать нежелательных последствий его воздействия.

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

- Belazzi T.* Negative regulation of transcription of the *Saccharomyces cerevisiae* catalase T (CTT1) gene by cAMP is mediated by a positive control element // EMBO J. 1991. V. 10. P. 585–592.
- Emri T., Forgács K., Pócsi I.* Combinatorial stress responses in fungi // Biologia Futura. 2022. V. 73. P. 207–217.
- Guzikowski A.R., Harvey A.T., Zhang J., Zhu S., Begovich K., Cohn M.H., Wilhelm J.E.* Differential translation elongation directs protein synthesis in response to acute glucose deprivation in yeast // Zid. BM. RNA Biol. 2022. V. 19. P. 636–649.
- Hollenstein D.M., Gérecová G., Romanov N., Ferrari J., Veis J., Janschitz M., Beyer R., Schüller C., Ogris E., Hartl M., Ammerer G., Reiter W.* A phosphatase-centric mechanism drives stress signaling response // EMBO Rep. 2021. V. 22. Art. 52476.
- Janapala Y., Preiss T., Shirokikh N.E.* Control of translation at the initiation phase during glucose starvation in yeast // Int. J. Mol. Sci. 2019. V. 20. Art. 4043.
- Kwolek-Mirek M., Bednarska S., Dubicka-Lisowska A., Maslanka R., Zadrag-Tecza R., Kaszycki P.* Unbalance between pyridine nucleotide cofactors in the SOD1 deficient yeast *Saccharomyces cerevisiae* causes hypersensitivity to alcohols and aldehydes // Int. J. Mol. Sci. 2022. V. 24. Art. 659.
- Minard K.I., Carroll C.A., Weintraub S.T., McAlister-Henn L.* Changes in disulfide bond content of proteins in a yeast strain lacking major sources of NADPH // Free Radic. Biol. Med. 2007. V. 42. P. 106–117.
- Minard K.I., McAlister-Henn L.* Sources of NADPH in yeast vary with carbon source // J. Biol. Chem. 2005. V. 280. P. 39890–39896.
- Temple M.D., Perrone G.G., Dawes I.W.* Complex cellular responses to reactive oxygen species // Trends Cell Bio. 2005. V. 15. P. 319–326.
- Thevelein J.M.* Signal transduction in yeast // Yeast. 1994. V. 10. P. 1753–1790.
- Yaakoub H., Mina S., Calenda A., Bouchara J.P., Papon N.* Oxidative stress response pathways in fungi // Cell Mol. Life Sci. 2022. V. 79. Art. 333.

SHORT COMMUNICATIONS

Induction of Alcohol Dehydrogenase in *Yarrowia lipolytica* Yeast under Stress Conditions

E. N. Biryukova¹, *, A. Yu. Arinbasarova¹, A. G. Medentsev¹

¹Federal Research Center “Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences”, G.K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms of the Russian Academy of Sciences, Moscow Region, Pushchino, Moscow Region, 142290, Russia

*e-mail: biryukovae@rambler.ru

It has been shown for the first time that under stress conditions, the yeast *Yarrowia lipolytica* exhibits activity of alcohol dehydrogenase along with antioxidant enzymes. During growth on glucose, during the transition of yeast from the exponential to the stationary growth phase, caused by glucose depletion, the ability of cells to oxidize ethanol was detected. Under conditions of oxidative and thermal stress, the induction of alcohol dehydrogenase is associated with an increase in the activity of antioxidant enzymes, in particular, catalase, superoxide dismutase, glucose-6-phosphate dehydrogenase and glutathione reductase. A decrease in the intracellular level of ATP and cAMP in *Y. lipolytica* under various stress conditions was shown, which correlates with an increase in the activity of antioxidant systems and NAD⁺-dependent alcohol dehydrogenase.

Keywords: alcohol dehydrogenase, yeast, stress, biosynthesis