

ISSN 0026-3656

Том 92, Номер 2

Март - Апрель 2023



МИКРОБИОЛОГИЯ

www.sciencejournals.ru



СОДЕРЖАНИЕ

Том 92, номер 2, 2023

ОБЗОРЫ

Трансформация метоксилированных ароматических соединений
анаэробными микроорганизмами

М. А. Хомякова, А. И. Слободкин

111

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Новая метанобразующая водородиспользующая архея из многолетнемерзлых
отложений о. Западный Шпицберген

В. Э. Трубицын, Н. Е. Сузина, Е. М. Ривкина, В. А. Щербакова

135

Микробные процессы окисления метана в районах газоразведывательного
бурения в Карском море

*Е. Н. Тихонова, И. И. Русанов, В. В. Кадников, Е. В. Демкина, С. В. Тоцаков,
А. О. Изотова, Н. В. Пименов*

146

Микробиологическая характеристика трех стратифицированных
озер Нижегородской области

В. М. Горленко, М. Б. Вайнштейн

160

Структура и сезонная вариабельность микробных сообществ
грунтовых вод города Москва

*Е. В. Груздев, Ш. А. Бегматов, А. В. Белецкий, А. В. Марданов,
Н. В. Равин, В. В. Кадников*

171

Rhodococcus rhodochrous ИЭГМ 1360 – эффективный биокатализатор С3
окислительной трансформации олеанановых тритерпеноидов

Н. А. Лучникова, Е. В. Тарасова, В. В. Гришко, И. Б. Ившина

184

Ингибирующее действие низкомолекулярного хитозана на рост бактерий
с различными тинкториальными свойствами

В. П. Коробов, Б. Ц. Шагдарова, В. П. Варламов, А. Л. Есаев, Т. В. Полюдова

197

Молекулярно-генетический и функциональный анализ генов бактерий
рода *Rhodococcus*, кодирующих синтез алкан-1-монооксигеназ

А. А. Букляревич, А. С. Гуринович, А. Е. Филонов, М. А. Титок

204

Пектинолитические дрожжи *Saccharomyces paradoxus* – новый генофонд для виноделия

А. Н. Боровкова, М. Ю. Шаламитский, Е. С. Наумова

219

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

Суточная динамика метана в цианобактериальном сообществе содового
озера Горчина 1 (Кулундинская степь, Алтайский край)

О. С. Самылина, А. Ю. Меркель, Н. В. Пименов

233

Поправка

240

Contents

Vol. 92, No. 2, 2023

Reviews

- Transformation of Methoxylated Aromatic Compounds by Anaerobic Microorganisms
M. A. Khomyakova and A. I. Slobodkin 111
-

Experimental Articles

- A New Methanogenic, Hydrogenotrophic Archaeon from Spitsbergen Permafrost
V. E. Trubitsyn, N. E. Suzina, E. M. Rivkina, and V. A. Shcherbakova 135
- Microbial Processes of Methane Oxidation at the Kara Sea Sites of Gas Prospecting
*E. N. Tikhonova, I. I. Rusanov, V. V. Kadnikov, E. V. Demkina, S. V. Toshchakov,
A. O. Izotova, and N. V. Pimenov* 146
- Microbiological Characteristics of Three Stratified Lakes in the Nizhny Novgorod Region
V. M. Gorlenko and M. B. Vainshtein 160
- Structure and Seasonal Variability of Groundwater Microbial Communities
in the City of Moscow
*E. V. Gruzdev, Sh. A. Begmatov, A. V. Beletsky, A. V. Mardanov,
N. V. Ravin, and V. V. Kadnikov* 171
- Rhodococcus rhodochrous* IEGM 1360, an Efficient Biocatalyst of C3 Oxidative
Transformation of Oleanane Triterpenoids
N. A. Luchnikova, E. V. Tarasova, V. V. Grishko, and I. B. Ivshina 184
- Inhibitory Action of Low-Molecular Chitosan on Growth of Bacteria
with Different Tinctorial Properties
V. P. Korobov, B. Ts. Shagdarova, V. P. Varlamov, A. L. Esaev, and T. V. Polyudova 197
- Molecular Genetic and Functional Analysis of the Genes Encoding Alkane
1-Monooxygenase Synthesis in Members of the Genus *Rhodococcus*
A. A. Bulyarevich, A. S. Gurinovich, A. E. Filonov, and M. A. Titok 204
- Pectinolytic Yeast *Saccharomyces paradoxus* as a New Gene Pool for Winemaking
A. N. Borovkova, M. Yu. Shalamitskiy, E. S. Naumova 219
-

Short Communications

- Diurnal Methane Dynamics in the Cyanobacterial Community of Soda Lake Bitter 1
(Kulunda Steppe, Altai Krai)
O. S. Samylina, A. Yu. Merkel, and N. V. Pimenov 233
-

- Errata 240
-
-

ТРАНСФОРМАЦИЯ МЕТОКСИЛИРОВАННЫХ АРОМАТИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ АНАЭРОБНЫМИ МИКРООРГАНИЗМАМИ

© 2023 г. М. А. Хомякова^а, *, А. И. Слободкин^а

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

*e-mail: mary_klimova@mail.ru

Поступила в редакцию 26.09.2022 г.

После доработки 11.10.2022 г.

Принята к публикации 12.10.2022 г.

Метоксилированные ароматические соединения (МАС) широко распространены в разнообразных местообитаниях и являются компонентами лигнина – второго по распространению биополимера на Земле. В обзоре мы обобщаем исследования в области микробиологии, экологии и биохимии анаэробного катаболизма МАС у представителей *Bacteria* и *Archaea*. Нами проанализированы геномы 46 прокариот, анаэробно разлагающих МАС, на наличие генов *O*-деметилаз, СО-дегидрогеназы/ацетил-КоА синтазы, а также бензоил-КоА редуктаз, обуславливающих возможность метоксидотрофного роста. Обнаружено, что факультативные анаэробы, принадлежащие к филуму *Pseudomonadota*, не имеют известных генетических детерминант анаэробной *O*-деметилазной реакции и восстановления ароматического кольца. Таким образом, трансформация МАС анаэробными микроорганизмами осуществляется различными биохимическими механизмами и, вероятно, играет более значимую роль в глобальном цикле углерода, чем предполагалось ранее.

Ключевые слова: анаэробные микроорганизмы, ароматические соединения, лигнин, *O*-деметилаза, ацетогены, метоксидотрофный метаногенез

DOI: 10.31857/S0026365622600651, EDN: ATHNPM

ПРИРОДНЫЕ ИСТОЧНИКИ МЕТОКСИЛИРОВАННЫХ АРОМАТИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

Метоксилированные ароматические соединения (МАС), представляющие собой ароматические эфиры, содержащие одну или несколько метоксильных групп ($-\text{OCH}_3$), широко распространены в природе и являются компонентами лигнина, угля и нефти (рис. 1) (Hatcher, Clifford, 1997; Libes, 2009; Brunow, Lundquist, 2010).

Лигнин – один из основных компонентов фотосинтетической биомассы, составляет примерно 25% сухой массы сосудистых растений и считается вторым после целлюлозы биополимером по степени распространенности в природе (Zeikus, 1981). Характерной особенностью данного гетерополимера является наличие в нем метоксильных групп, содержание которых колеблется от 1.24 до 24.1% в зависимости от того, из какого растения или какой его части выделен лигнин (Vanholme et al., 2010). Так, в хвойной древесине и лиственных породах этот показатель самый высокий и составляет 14–24% (Venkatesagowda, Dekker, 2021). Ежегодно образуется большое количество лигнина – в пределах $5\text{--}36 \times 10^8$ тонн (Ab-

delaziz et al., 2016). Уголь представляет собой сложную смесь, состоящую из монолигнолов лигнина, которые часто замещены гидроксильными, метоксильными и карбоксильными группами. Особенно много метоксильных групп содержится в незрелом угле. Ароматические соединения являются также и компонентами неочищенной нефти, составляя 20–43% (Libes, 2009).

АНАЭРОБНЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ, РАСТУЩИЕ ЗА СЧЕТ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МАС

Первые анаэробные микроорганизмы, растущие на МАС (метоксидотрофы) были описаны в 1981 г. в лаборатории под руководством Пфеннига. Эти изоляты, отнесенные к *Acetobacterium woodii*, были выделены из пресноводных илов и осадков сточных вод на ванилате, сиригате и триметоксидиннамате в качестве субстратов (Bache, Pfennig, 1981). К настоящему времени известно более 40 видов культивируемых микроорганизмов, способных расти на МАС анаэробно. Большинство видов относится к домену *Bacteria* (филумы *Acidobacteriota*, *Bacillota*, *Chloroflexota*, а также *Pseudomonadota*), и лишь в последние несколько лет была

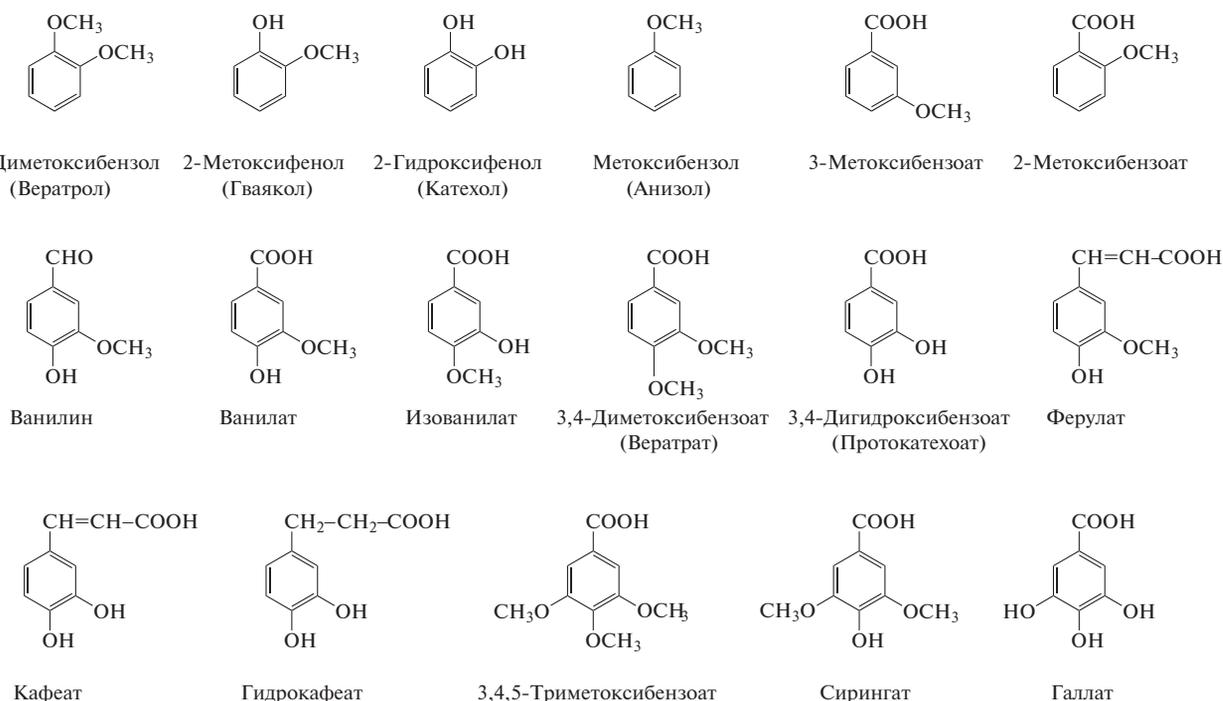


Рис. 1. Распространенные МАС и их гидроксильные производные.

показана способность двух термофильных видов из домена *Archaea* к метоксидотрофному росту (Mayumi et al., 2016; Kurth et al., 2021) (табл. 1). Подавляющее же количество видов, метаболизирующих МАС в анаэробных условиях, относится к филуму *Bacillota*, они являются облигатными анаэробами и осуществляют ацетогенез.

Как правило, ацетогены не способны разрушать ароматическое кольцо и лишь отщепляют от МАС метильную группу, что приводит к образованию ацетата и соответствующих гидроксильных продуктов, выделяемых в среду культивирования. Примерами являются *Sporomusa termitida*, *Moorella thermoacetica*, *Acetobacterium woodii* и многие другие представители, для которых показано образование гидроксильных продуктов наряду с ацетатом (Bache, Pfennig, 1981; Breznak et al., 1988).

Однако несколько ацетогенов из класса *Clostridia*, таких как *Sporobacter termitidis*, *Sporobacterium olearium*, *Parasporobacterium paucivorans*, а также единственный метоксидотрофный представитель филума *Acidobacteriota* — *Holophaga foetida*, способны в присутствии сульфида в качестве акцептора метильной группы разрывать ароматическое кольцо и превращать МАС в ацетат, метантиол или диметилсульфид во флороглюциновом пути (Liesack et al., 1994; Grech-Mora et al., 1996; Mechichi et al., 1999a; Lomans et al., 2001).

Показана способность к росту на МАС у нескольких представителей филума *Pseudomonadota*

в классах *Alpha-*, *Beta-*, *Gamma-* и *Deltaproteobacteria*. Все эти виды, за исключением *Desulfomonile tiedjei*, принадлежащего к классу *Deltaproteobacteria*, являются факультативными анаэробами, и могут использовать помимо кислорода другие акцепторы электронов (нитрат, соединения серы) или же расти без акцептора электронов, сбраживая метоксилированные соединения. Более того, в данной группе представлены весьма разнообразные в физиологическом отношении микроорганизмы, метаболизирующие преимущественно ванилат или ферулат, и способные к аноксигенному фотосинтезу (*Rhodospseudomonas* и *Rhodomicrobium*), дегалогенированию (*Desulfomonile tiedjei*), а также относящиеся к условно патогенной микрофлоре (*Enterobacter*, *Acinetobacter*, *Klebsiella*, *Achromobacter*). Таким образом, хотя способность к анаэробному росту на МАС выявлена преимущественно у ацетогенов, изоляты, проявляющие аналогичные свойства, были найдены и среди других физиологических групп анаэробов, включая денитрифицирующие, фотосинтезирующие, синтрофные, сульфатредуцирующие.

МАС могут играть различную роль в энергетическом метаболизме анаэробных бактерий. Так, *Desulfitobacterium hafniense* способен к анаэробному росту на ванилате или сирингате, используя их в качестве доноров электронов в комбинации с фумаратом, играющим роль акцептора (Christiansen, Ahring, 1996). *Syntrophococcus sucromutans* при росте на углеводах использует метоксилирован-

Таблица 1. Микроорганизмы, способные к анаэробному росту на МАС

Микроорганизм, штамм	Источник выделения	Физиологические характеристики	Используемые МАС	Акцепторы электронов	Физиологическая группа	Ссылка
<i>Acidobacteriota: Holophagae</i>						
<i>Vacillota: Clostridia</i>						
<i>Holophaga foetida</i> TMBS4	Анаэробный пресноводный ил	ОА, М, Н	ТМБ, СР, 5-гидроксиВА, ФР	*	Ацетоген	Liesack et al., 1994
<i>Acetitomaculum ruminis</i> 139В	Рубец жвачных животных	ОА, М, Н	СР, ФР, ВА	СО ₂	Ацетоген	Greening, Leedle 1989
<i>Acetobacterium carbinolicum</i> SygA5	Анаэробный осадок соленого фьорда	ОА, ПТ, Н	СР, ТМБ, ВА, 2-МФ, 3,4-ДМБ	СО ₂	Ацетоген	Raagur et al., 2006
“ <i>Acetobacterium dehalogenans</i> ” МС	Осадок сточных вод	ОА, М, Н	3,4-ДМБ, 3-МФ, СР, 1,2-диметоксibenзол (вератрол)	Фумарат (при росте на формиате), без акцептора	Ацетоген	Kaufmann et al., 1998a, Traunstecker et al., 1991
<i>Acetobacterium malicum</i> MuME1	Пресноводный осадок канала	ОА, М, Н	2-Метоксизтанол, ТМБ, ТМЦ	СО ₂	Ацетоген	Tanaka, Pfenning, 1988
<i>Acetobacterium woodii</i> DSM 1030	Пресноводный осадок и осадок сточных вод	ОА, М, Н	Более 10 МАС	СО ₂	Ацетоген	Bache, Pfenning 1981
<i>Alkalibacter mobilis</i> M17 DMB	Ил со дна озера	ОА, М, умеренный алкалофил	ВА, 3,4-ДМБ	СО ₂	Ацетоген	Khomyakova et al., 2021
<i>Alkalibaculum bacchi</i> СР11	Почва с животноводческой фермы	ОА, М, умеренный алкалофил	4-МБ, 3-МФ, 3-МЦ, 4-МС, 5-МС, СР	СО ₂	Ацетоген	Allen et al., 2010
<i>Alkalibaculum sporogenes</i> M08 DMB	Наземный грязевой вулкан	ОА, М, умеренный алкалофил	3,4-ДМБ, 2-МФ	СО ₂	Ацетоген	Khomyakova et al., 2020b
<i>Blautia producta</i> U-1 (<i>Peptostreptococcus productus</i>)	Осадок сточных вод	ОА, М, Н	ВА, СР, ФР	СО ₂	Ацетоген	Lorowitz et al., 1984; Parekh et al., 1992
“ <i>Butyrivacterium methylotrophicum</i> ” DSM 3468	Сточные воды	ОА, М, Н	ТМБ, СР, ВА	СО ₂	Ацетоген	Zeikus et al., 1980

Таблица 1. Продолжение

Микроорганизм, штамм	Источник выделения	Физиологические характеристики	Используемые МАС	Акцепторы электронов	Физиологическая группа	Ссылка
<i>Calorimonas adulescens</i> A05MB	Горячий источник	ОА, Т, Н	2-МБ, 3,4-ДМБ	СО ₂	Ацетоген, броодильщик	Khomyakova et al., 2020a
<i>Catenibacillus scindens</i> CG 19-1	Пищеварительный тракт человека	ОА, М, Н	ФР (ингибирует рост)	Без акцептора	Бродильщик	Braune, Blaut, 2018
<i>Clostridium acetivum</i> DSM 1496	Грязь	ОА, М, Н	10 МАС	СО ₂	Ацетоген	Lux, Drake, 1992
<i>Cl. formicacetivum</i> DSM 92	Очистные сооружения	ОА, М, Н	Более 10 МАС	СО ₂	Ацетоген	Lux, Drake, 1992
<i>Cl. methoxybenzovorans</i> SR3	Метаногенный биореактор	ОА, М, Н	Более 30 МАС	СО ₂	Ацетоген	Mechichi et al., 1999b
<i>Cl. scatologenes</i> SL1	Осадок из кислотного пруда угольной шахты	ОА, М, ацидофил	ВА, ФР	СО ₂	Ацетоген	Küsel et al., 2000
<i>Desulfotobacterium hafniense</i> * DCB-2	Осадок сточных вод	ОА, М, Н	ВА, СР, изоВА	Тиосульфат, сульфит, нитрат, Fe(III), фумарат	Восстановительное дехлорирование	Christiansen, Ahring, 1996; Studenik et al., 2012
<i>D. chlororespirans</i> DSM 11544	Компостная почва	ОА, М, Н	ВА, СР, изоВА	Тиосульфат, сульфит, S ⁰ , нитрат, Fe(III), фумарат	Восстановительное дехлорирование	Sanford et al., 1996; Mingo et al., 2014
<i>D. dehalogenans</i> DSM 9161	Пресноводный озерный осадок	ОА, М, Н	ВА, СР, изоВА	Тиосульфат, нитрат, Fe(III), фумарат	Восстановительное дехлорирование	Utkin et al., 1994; Mingo et al., 2014
<i>Desulfotomaculum thermobenzoicum</i> TSB (<i>Desulfotomaculum thermobenzoicum</i>)	Осадок термофильного метантенка	ОА, Т, умеренный галофил	3-МБ, 4-МБ, ВА, СР, ТМБ	Сульфат, сульфит, тиосульфат, нитрат	Сульфатредуктор	Tasaki et al., 1992

Таблица 1. Продолжение

Микроорганизм, штамм	Источник выделения	Физиологические характеристики	Используемые МАС	Акцепторы электронов	Физиологическая группа	Ссылка
<i>Desulfosporio (Desulfotomaculum) gibsoniae</i> Groll	Черный ил из пресноводной канавы	ОА, М, Н	Ванилиновый спирт, ВА, ВН, ФР, анизол	Сульфат, сульфит, тиосульфат, без акцептора	Сульфатредуктор	Kuever et al., 1999
<i>Desulfosporosinus (Desulfotomaculum) orientis</i> DSM 765	Почва	ОА, М, Н	ТМБ	Сульфат, тиосульфат, без акцептора	Сульфатредуктор, ацетоген	Stackebrandt et al., 1997
<i>Eubacterium limosum</i> ATCC 8486	Пищеварительный тракт человека	ОА, М, Н	3-МБ, ФР, ВА	СО ₂	Ацетоген	DeWeerd et al., 1988; Chen et al., 2016
<i>Eubacterium callanderi</i> FD	Анаэробный ферментер	ОА, М, Н	ФР, синапат, СР, ВА, ВН, ТМЦ	СО ₂	Ацетоген	Mounfort et al., 1988
<i>Koebacter methoxytrophicus</i> NRmbB1	Подземное нефтяное месторождение	ОА, Т, Н	ТМБ	**	Бродильщик, синтроф	Sakamoto et al., 2021
<i>Moorella thermoacetica</i> DSM 2955 (<i>Cl. thermoacetica</i> = <i>Cl. thermoautotrophicum</i>)	Конский навоз	ОА, Т, Н	Более 20 МАС	Нитрат, нитрит, тиосульфат, ДМСО, без акцептора	Ацетоген	Daniel et al., 1991; Pierce et al., 2008
<i>Oxobacter (Clostridium) pennigii</i> V5-2	Жидкость из рубца быка	ОА, М, Н	ВН, ФР, СР, ТМБ	СО ₂	Ацетоген	Klumholz, Bryant, 1985
<i>Papillibacter cinnamivorans</i> CIN1	Анаэробный ферментер	ОА, М, Н	3-МЦ, 4-МЦ	Без акцептора	Бродильщик	Defnoui et al., 2000
<i>Parasporobacterium raucivorans</i> SYR1	Эвтрофный пресноводный пруд	ОА, М, Н	СР, ТМБ	*	Ацетоген/бродильщик	Lomans et al., 2001
<i>Sporobacter termittidis</i> DSM 10068	Пищеварительный тракт термитов	ОА, М, Н	ТМЦ, синапат, 3,4-диМЦ, ТМБ, ФР, СР, ВА	*	Ацетоген	Grech-Mora et al., 1996
<i>Sporobacterium olearium</i> SR1	Анаэробный метаногенный ферментер	ОА, М, Н	10 МАС	СО ₂	Ацетоген/бродильщик	Mechichi et al., 1999a

Таблица 1. Продолжение

Микроорганизм, штамм	Источник выделения	Физиологические характеристики	Используемые МАС	Акцепторы электронов	Физиологическая группа	Ссылка
<i>Syntrophococcus sucrotutans</i> DSM 3224	Содержимое рубца быка	ОА, М, Н	ТМБ, СР, ВА, ВН, ФР	**	Синтроф	Krumholz, Bryant, 1986
<i>Thermacetogenium phaeum</i> DSM 12270	Термофильный анаэробный метаногенный реактор	ОА, Т, Н	ТМБ, СР, ВА	**	Ацетоген, синтроф	Hattori et al., 2000
<i>Vacillota: Negativicutes</i>						
<i>Acetoneema longum</i> DSM 6540	Содержимое кишечника термита	ОА, М, Н	ТМБ	СО ₂	Ацетоген	Kane, Breznak, 1991
<i>Sporomusa malonica</i> DSM 5090	Пресноводный анаэробный седимент	ОА, М, Н	ТМЦ	СО ₂	Ацетоген	Dehning et al., 1989
<i>Sporomusa ovata</i> DSM 2662	Силос из листьев сахарной свеклы	ОА, М, Н	10 МАС	СО ₂	Ацетоген	Stupperich et al., 1993; Möller et al., 1984
<i>Sporomusa silvacetica</i> DSM 10669	Лесная почва	ОА, М, Н	ФР, ВА	СО ₂	Ацетоген	Kuhner et al., 1997
<i>Sporomusa terminida</i> DSM 4440	Содержимое кишечника термита	ОА, М, Н	ТМБ	СО ₂	Ацетоген	Brezhak et al., 1988
<i>Chloroflexota: Dehalococcoidia</i>						
<i>Dehalococcoides mccartyi</i> 195	Анаэробный ферментер	ОА, М, Н	4-Бromo-3,5-ДМБ	Галогенированные органические соединения	Органогалогениднос дыхание	Löffler et al., 2013
<i>Pseudomonadota: Alphaproteobacteria</i>						
<i>Rhodomicrobium vannielii</i> ATCC 17100	Грязь	ФА, Т, Н	ВА, СР	Кислород, без акцептора	Фототроф	Wright, Madigan, 1991
<i>Rhodopseudomonas palustris</i> CGA001	Грязь	ФА, М, Н	ФР	Тиосульфат, кислород, без акцептора	Фототроф	Harwood, Gibson, 1988

Таблица 1. Окончание

Микроорганизм, штамм	Источник выделения	Физиологические характеристики	Используемые МАС	Акцепторы электронов	Физиологическая группа	Ссылка
<i>Pseudomonadota: Betaproteobacteria</i>						
<i>Achromobacter denitrificans</i> (<i>Alcaligenes xylosoxidans</i> subsp. <i>Denitrificans</i>) LMG1231	Почва	ФА, М, Н	ВА, 3,4-ДМБ, 2-МФ, 3-МБ, ФР, ТМЦ, ТМБ	Нитрат, кислород	Нитрат-редуктор/ Аэроб	Taylor, 1983
<i>Pseudomonadota: Gammaproteobacteria</i>						
<i>Acinetobacter johnsonii</i> FZ-5	Морской осадок	ФА, М, Н	ВА	Кислород, без акцептора	Аэроб	Lu et al., 2022
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 35929	Метаногенная культура, разлагающая ферулат	ФА, М, Н	ФР	Кислород, селенит, без акцептора	Аэроб	Grbić-Galić, 1985
<i>Klebsiella oxytoca</i> FZ-8	Морской осадок	ФА, М, Н умеренный галотолерантный	ВА	Кислород, без акцептора	Аэроб	Lu et al., 2022
<i>Pseudomonadota: Deltaproteobacteria</i>						
<i>Desulfomonile tiedjei</i> DCB-1	Осадок сточных вод	ОА, М, Н	Метил 3-МБ, метил 4-МБ, ВА, изоВА, 3-МС	Сульфат, сульфит, тиосульфат, без акцептора	Дегалогенирующий сульфат-редуктор	DeWeerd et al., 1990
<i>"Euryarchaeota": Archaeoglobi</i>						
<i>Archaeoglobus fulgidus</i> VC-16	Мелководная морская гидротерма	ОА, Т, Н	2,6-диМФ, метоксигидрохинон, 2-МБ	Сульфат	Сульфат-редуктор	Welte et al., 2021
<i>"Euryarchaeota": Methanomicrobia</i>						
<i>Methanococcus shengliensis</i> ZC-1	Нефтяное месторождение	ОА, Т, Н	35 МАС	–	Метаноген	Mayumi et al., 2016; Kurth et al., 2021

Сокращения: ТМБ – 3,4,5-триметоксибензоат, МБ – метоксибензоат, ДМБ – диметоксибензоат, ТМЦ – 3,4,5-триметоксициннамат, МЦ – метоксисалицилат, ФР – ферулат, ВА – ванилат, ВН – ванилин, СР – сирингат, МФ – метоксибензол, ДМСО – диметилсульфоксид, ОА – облигатный анаэроб, ФА – факультативный анаэроб, М – мезофил, Н – нейтрофил, Т – термофил, ПТ – психротолерантный. * Сульфид выступает в качестве акцептора метильной группы, в данном случае в качестве продуктов помимо ацетата образуются диметилсульфид и метантиол. ** Трансформация МАС возможна в условиях синтрофного роста с метаногеном.

ные бензоаты в качестве акцепторов электронов, превращая их в соответствующие гидроксibenзоаты (Krumholz, Bryant, 1986). Недавно описанный *Koleobacter methoxysyntrophicus* способен расти на 3,4,5-триметоксибензоате только синтрофно в присутствии метаногена *Methanothermobacter thermautotrophicus* (Sakamoto et al., 2020). Механизм разложения 3,4,5-триметоксибензоата у данного микроорганизма неизвестен. Для *Dehalococcoides mccartyi* – представителя еще одного бактериального филума *Chloroflexota*, – показан рост на 4-бromo-3,5-диметоксибензоате, однако продуктом органо-галогенидного дыхания являлся 3,5-диметоксибензоат, что свидетельствует о неспособности микроба метаболизировать МАС, а имеет место лишь отщепление брома (Löffler et al., 2013).

Единственные культивируемые представители домена *Archaea*, для которых экспериментально доказана способность расти на МАС, относятся к классам *Archaeoglobi* (*Archaeoglobus fulgidus*) и “*Methanomicrobia*” (*Methermicoccus shengliensis*). Сульфатредуктор *Archaeoglobus fulgidus* растет на ограниченном количестве МАС, превращая их в гидроксильные производные и параллельно восстанавливая сульфат до сульфида. Метаноген *Methermicoccus shengliensis* способен к росту на 35 различных МАС, разлагая их до CH_4 и CO_2 в процессе “метоксидотрофного” метаногенеза, который будет подробно рассмотрен ниже.

Безусловно, список видов, метаболизирующих МАС, нельзя назвать полным, поскольку большинство анаэробных бактерий не проверяли на способность использовать метоксилированные ароматические соединения. Многие виды рода *Clostridium*, *Acetobacterium*, а также *Sporomusa ovata*, *Sporobacterium olearium*, *Methermicoccus shengliensis* имеют удивительно широкий спектр используемых МАС, тогда как другие, даже в пределах одного рода (например, *Cl. scatologenes*, *Sporomusa silvacetica*), проявляют ограниченность в использовании МАС. В связи с этим при описании новых видов желательны включать несколько разных субстратов для проверки способности новых изолятов к их использованию. Концентрация субстратов также является важным параметром для выделения и проверки роста. Некоторые изоляты растут на 5–10 мМ МАС. Однако ароматические соединения, главным образом фенольные и углеводороды, проявляют цитотоксический эффект, поскольку они способны растворяться в биологических мембранах, что увеличивает текучесть последних, а это, в свою очередь, приводит к потере ионов, АТФ и других клеточных метаболитов. Более того, диссипация протонной движущей силы и денатурация мембранных белков (дыхательных комплексов и транспортеров питательных веществ) приводит к серьезным энергетическим проблемам. В связи с их токсичностью правильнее было бы использовать в начальных экспериментах более

низкие концентрации ароматических субстратов – от 2 мМ для ароматических кислот и 0.1–0.5 мМ для производных катехола (Frazer, 1994).

Наиболее распространенными субстратами для культивирования метоксидотрофов являются ванилат, ферулат, сириглат, а также 3,4-диметоксибензоат и 3,4,5-триметоксибензоат. Ферулат (феруловая кислота) представляет собой широко распространенное в природе фенольное соединение и рассматривается как возобновляемое химическое сырье для биокаталитического превращения в другие полезные ароматические соединения в промышленном масштабе (Rosazza et al., 1995). 3,4-Диметоксибензоат и 3,4,5-триметоксибензоат являются метоксилированными предшественниками протокатехоата и галлата – центральных интермедиатов превращения ароматических соединений; разложение ванилата и сириглата также приводит к образованию данных фенольных соединений (Schink et al., 2000; Boll, 2005).

Среди известных анаэробных метоксидотрофов преобладают мезофилы, предпочитающие для роста условия с нейтральными значениями рН. Однако выявлено несколько термофильных представителей (*Calorimonas adulescens*, *Desulfofundulus thermobenzoicus*, *Koleobacter methoxysyntrophicus*, *Moorella thermoacetica*, *Thermacetogenium phaeum*, *Rhodomicrobium vanniellii* и *Methermicoccus shengliensis*), гипертермофильный *Archaeoglobus fulgidus*, психротолерантный *Acetobacterium carbinolicum*, а также алкалофилы родов *Alkalibacter* и *Alkalibaculum*, ацидофильный ацетоген *Clostridium scatologenes* и несколько галотолерантных видов (*Klebsiella oxytoca*, *Desulfofundulus thermobenzoicus*).

Микроорганизмы, способные к анаэробному росту на МАС, выделены из разнообразных мест обитаний естественного и антропогенного происхождения, включая осадки сточных вод (виды *Acetobacterium*, *D. hafniense*, *Blautia producta* и “*Butyribacterium methylophilicum*”, *Desulfomonile tiedjei*), пищеварительные тракты различных организмов (из крупного рогатого скота – *Acetitomaculum ruminis*, *Oxobacter pfennigii*, *Syntrophococcus sucromutans*, из человека – *Catenibacillus scindens*, *Eubacterium limosum*, из термитов – *Sporobacter termitidis*, *Acetonema longum*, *Sporomusa termitida*), анаэробные ферментеры, морские и пресноводные осадки, почвы, гидротермальные источники (*Calorimonas adulescens*) и нефтяные месторождения (*Koleobacter methoxysyntrophicus*, *Methermicoccus shengliensis*) (табл. 1).

ЭНЗИМАТИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ ДЕМЕТИЛИРОВАНИЯ АНАЭРОБНЫХ ПРОКАРИОТ

Деметилирование, т.е. отщепление метильной группы ($-\text{CH}_3$), является ключевой стадией раз-

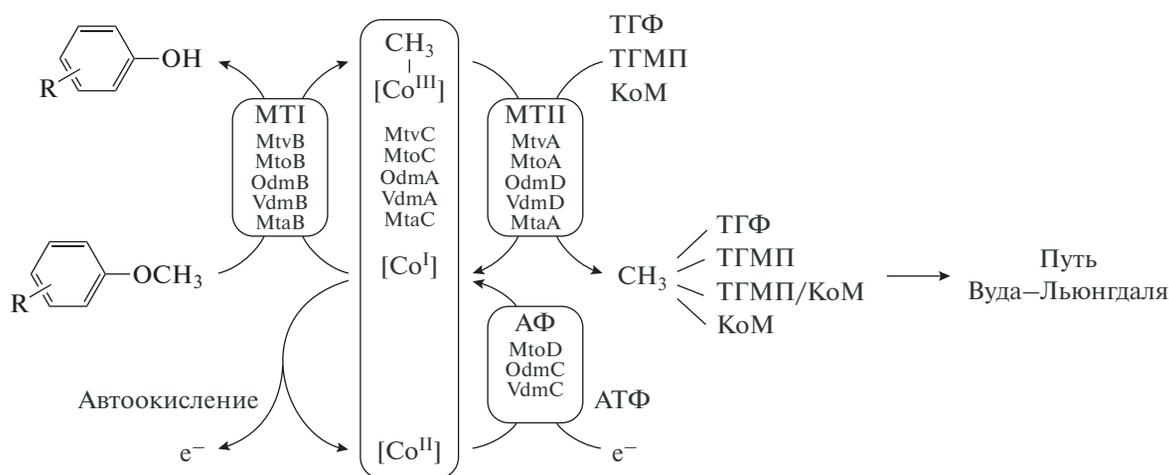


Рис. 2. Схема *O*-деметилирования у использующих МАС микроорганизмов (модифицирована по Mingo et al., 2014): МТИ – ванилат: корриноидный белок метилтрансфераза; МТII – метил-корриноидный белок: тетрагидрофолат метилтрансфераза; [Co_{I-III}] корриноидный белок в соответствующей степени окисления кобаламина В₁₂; АФ – активирующий фермент; ТГФ – тетрагидрофолат; ТГМП – тетрагидрометанооптерин; КоМ – кофермент М. Рассмотрены компоненты *O*-деметилазных ферментных систем: MtvABC – из *Moorella thermoacetica*; MtoABCD – из термофильных архей; OdmABCD и VdmABCD – ванилат-зависимая *O*-деметилазы соответственно из *Acetobacterium dehalogenans*; MtaABC – метанол-КоМ метилтрансфераза из *Methanosarcina barkerii*, имеющая сходное с *O*-деметилазой строение и катализирующая перенос метильной группы с метанола на КоМ.

нообразных биологических процессов, включая эпигенетическую регуляцию, репарацию ДНК, деградацию токсинов и метаболизм биоактивных метаболитов. Данный процесс катализируют ферменты деметилазы, которые могут принадлежать к нескольким различным семействам белков, включая цитохромы Р450, ФАД-зависимые оксидазы, белки домена Риске и другие белки с негемовыми центрами (Hagel, Facchini, 2010). *O*-деметилазы разрывают эфирную связь O–С, в отличие от *N*-деметилаз, разрывающих N–С связь.

Общая характеристика *O*-деметилаз

По отношению к кислороду выделяют два основных типа *O*-деметилаз. Аэробная ванилат-зависимая *O*-деметилаза (VanAB) относится к классу IА оксигеназ и состоит из двух железосерных белков – оксигеназы и редуктазы, содержащих [2Fe–2S] редокс кластера (Masai et al., 2007). Эта система поглощает кислород и восстановительные эквиваленты в форме НАДН, и, в результате деметилирования, помимо основного продукта – преимущественно протокатеховой кислоты, образуется также формальдегид, Н₂О и НАД⁺. Другая ферментная система относится к тетрагидрофолат-зависимым ароматическим *O*-деметилазам анаэробных микроорганизмов, включает, как правило, четыре компонента и впервые была выявлена у ацетогенов (Bache, Pfennig, 1981; Kaufmann et al., 1997). В этом случае происходит расщепление С–О связи МАС, скорее всего, в результате гете-

ролитического разрыва, который характерен для переноса метильных групп (Ragsdayle, 2008). Далее метильная группа с помощью многокомпонентной метилтрансферазной системы у ацетогенов переносится на тетрагидрофолат (ТГФ), а у архей – на тетрагидрометанооптерин (ТГМП) (Stupperich, Konle, 1993; Mayumi et al., 2016; Kurth et al., 2020) (табл. 2).

Классическая метилтрансферазная система состоит из нескольких компонентов (рис. 2). Субстрат-специфичная метилтрансфераза I (МТИ = компонент В) расщепляет С–О связь метилированного субстрата; кобаламин-связывающий корриноидный белок (СоР, или компонент С) обеспечивает супернуклеофильное состояние Со(I) витамина В₁₂, который действует как промежуточный акцептор метильной группы. Далее СоР взаимодействует с метилтрансферазой II (МТII = компонент А) для переноса метильной группы к конечному акцептору.

Поскольку корриноиды очень реакционно-способны в своем активном состоянии Со(I), они спонтанно самоокисляются до неактивного состояния Со(II). Как только происходит окислительная инактивация, В₁₂-зависимым метилтрансферазам требуется восстановительная активация для повторного входа в каталитический цикл. Восстановление Со(II) Р до активного состояния Со(I) катализируется у *O*-деметилазы большинства ацетогенов четвертым компонентом системы – активирующим ферментом (АФ = компонент D) (Kaufmann et al., 1998b).

O-деметилазы анаэробных бактерий

Получение препаратов нативных *O*-деметилаз оказалось сложной задачей, в первую очередь, из-за их чувствительности к кислороду, а также склонности связываться с клеточными мембранами (Ander, Eriksson, 1978). Попытки измерить активность *O*-деметилаз или провести их фракционирование также вызывало проблемы в связи с влиянием ТГФ и АТФ (Berman, Frazer, 1992). Кауфманну и соавторам удалось выделить и охарактеризовать первую ванилат-зависимую *O*-деметилазу у *Acetobacterium dehalogenans* лишь в конце 90-х гг., почти 30 лет спустя после того, как были описаны первые аэробные *O*-деметилазы (Bernhardt et al., 1971; Kaufmann et al., 1997, 1998a, 1998b). К настоящему времени выделено несколько *O*-деметилаз из ацетогенных бактерий *Moorella thermoacetica*, *Acetobacterium dehalogenans* и *Eubacterium limosum*, а также из осуществляющего оргоногалогенидное дыхание *Desulfitobacterium hafniense*, и их сравнение показывает, что в структурном плане *O*-деметилазы отличаются лишь незначительно (Kaufmann et al., 1997; Naidu, Ragsdale, 2001; Studenik et al., 2012; Chen et al., 2016) (табл. 2).

Метилтрансфераза I, ответственная за субстратную специфичность, является, как правило, мономером с молекулярной массой 36–56 кДа и может содержать ион Zn^{2+} . У проанализированных бактерий МТИ значительно отличаются в отношении спектров субстратов и, как следствие, по аминокислотным последовательностям, что установлено даже для ванилат- и вератрол-зависимой *O*-деметилазы из одного микроорганизма (Schilhabel et al., 2009). Скорее всего, субстрат-связывающий центр находится на N-конце метилтрансферазы, тогда как каталитический центр располагается на C-конце аминокислотной цепи в составе β -бочонка (TIM barrel), что подтверждается косвенно наличием цинка в этой же части фермента (Studenik et al., 2011). Однако, в отличие от *O*-деметилаз, выделенных из *A. dehalogenans*, МТИ из *M. thermoacetica* и *D. hafniense* не содержат цинк, и добавление Zn^{2+} к реакционной смеси не стимулирует активность фермента (табл. 2) (Naidu, Ragsdale, 2001; Studenik et al., 2012). У *E. limosum* МТИ является Zn-зависимой, и, помимо данного лиганда, в составе каталитического центра выявлены аминокислотные остатки Glu166, Cys222 и Cys268 (Chen et al., 2016).

Метилтрансфераза II представляет собой гомодимер с молекулярной массой одной субъединицы около 28–30 кДа (Kaufmann et al., 1997). N-терминальная аминокислотная последовательность МТИ из *M. thermoacetica* обладает высокой степенью сходства с хорошо изученной у данного микроба метил-ТГФ- и V_{12} -зависимой метилтрансферазой (AcsE), которая укладывается в

β -бочонка, содержащий связывающий центр птерина (Naidu, Ragsdale, 2001). У *E. limosum* выявлено три аминокислоты (Asp-76, Asn-200 и Arg-208), которые предположительно связывают ТГФ посредством водородных связей в составе МТИ (Chen et al., 2016). В то же время положение ключевых остатков активного центра у МТИ из *D. hafniense* слегка изменено (Sjuts et al., 2015).

Корриноидный белок CoP у *A. dehalogenans* представляет собой мономер с молекулярной массой 26 кДа (Kauffman et al., 1997), у других изученных бактерий размеры фермента колеблются в аналогичных пределах 22–28 кДа. Данные по третичной структуре получены в результате клонирования гена CoP из *D. hafniense* в *E. coli* (Sjuts et al., 2013). Корриноидный белок содержит N-концевой α -спиральный домен и C-концевой домен с кобаламином, в котором к центральному атому кобальта координируется гистидин (Sjuts et al., 2013).

Последний компонент *O*-деметилазной системы – активирующий фермент АФ, является крупным тримерным белком с идентичными субъединицами массой около 67 кДа каждая (Kauffman et al., 1997). Восстановление неактивного [CoII]-CoP в активный [CoI]-CoP в реакционной среде происходит в присутствии АТФ и искусственного донора цитрата титана(III) (Siebert et al., 2005). В составе АФ нескольких ацетогенов выявлен [2Fe–2S] кластер, а также четыре аминокислотных остатка цистеина в близких положениях, которые могут быть связаны с данным кластером в составе активного центра (Schilhabel et al., 2009; Chen et al., 2016). Гидролиз АТФ активирующим ферментом увеличивает окислительно-восстановительный потенциал связанного с белком кобаламина, что позволяет осуществить перенос электронов от ферредоксин/флаводоксин-зависимых гидрохинонов через [2Fe–2S] кластер активирующего фермента на неактивный Co(II) (Dürichen et al., 2019). В то же время у *M. thermoacetica* АФ отсутствует, т.е. *O*-деметилаза является трехкомпонентной системой; в данном случае система восстановительной активации не требуется (Naidu, Ragsdale, 2001).

Гены, кодирующие МТИ, CoP и МТИ, у всех этих микроорганизмов организованы в оперон, тогда как АФ всегда расположен отдельно (Schilhabel et al., 2009; Studenik et al., 2012; Chen et al., 2016). В большинстве случаев в геноме находится несколько оперонов *O*-деметилаз; например, в геноме *D. hafniense* выявлено не меньше 17 оперонов, способных кодировать корриноид-зависимые метилтрансферазные системы, причем все они содержат не менее двух генов, кодирующих МТИ, МТИ и/или CoP, а в большинстве случаев представлены и три гена (Studenik et al., 2012). При этом только продукт единственного кодиру-

ющего АФ гена отвечает за восстановление различных *O*-деметилазных корриноидных белков (Schilhabel et al., 2009; Studenik et al., 2012). Установлено, что АФ группируется с металл-связывающими белками группы COG3894, гены которых представлены в многочисленных геномах анаэробных микроорганизмов. Проверка доменной структуры и генетический анализ этих ортологов показали, что они являются восстановительными активаторами для корриноидных белков (RACE белки, *reductive activases for corrinoid enzymes*), таких как СО-дегидрогеназа/ацетил-КоА синтаза и анаэробные метилтрансферазы (Schilhabel et al., 2009).

Белковые последовательности СоР и МТII являются консервативными. МТИ, напротив, имеет низкую степень сходства белковых последовательностей, демонстрируя структурные различия между ферментами, которые необходимы для распознавания различных субстратов. Поскольку отщепляющая метильную группу часть метилтрансферазной системы МТИ содержит субстрат-связывающий сайт, и так как для связывания требуется специфичность, микроорганизм может иметь несколько индуцибельных МТИ-кодирующих генов. Например, в геноме *A. woodii* содержится 23 различных МТИ-гомолога, и только субстраты для нескольких из них известны в настоящее время (Lechtenfeld et al., 2018).

O-деметилазы анаэробных архей

Способность к трансформации МАС археями долгое время была неизвестна. Лишь в 2016 г. было установлено, что термофильный метаноген *Methermicoccus shengliensis* способен использовать значительное количество (около 35) МАС, образуя из метоксильной группы метан. В ходе этого “метоксидотрофного метаногенеза”, метильная группа, входящая в состав $-\text{OCH}_3$, отщепляется в процессе *O*-деметилирования и используется для образования ацетил-КоА, который впоследствии диспропорционируется до CH_4 и CO_2 (Maumí et al., 2016).

В состав *O*-деметилазы *M. shengliensis* входит две метилтрансферазы МТИ (MtoV₁ и MtoV₂) аналогичного молекулярного веса (48 и 47 кДа) с невысоким сходством по аминокислотным последовательностям, что свидетельствует о различной субстратной специфичности этих белков и позволяет метаногену использовать больше разнообразных субстратов.

Содержащий кобальт корриноидный белок СоР имеет молекулярную массу 22 кДа, и связывание метильной группы происходит в каталитическом N-терминальном В₁₂-связывающем центре. *O*-деметилаза из *M. shengliensis* является четырехкомпонентной и содержит АФ (MtoD) с рассчитан-

ной молекулярной массой около 68 кДа. Наличие в составе активирующего фермента N-концевого [2Fe–2S] связывающего центра – особенность, более характерная для ацетогенов, чем метаногенов, у которых в составе АФ находятся два C-терминальных [4Fe–4S] кластера (Schilhabel et al., 2009; Kurth et al., 2021).

Главное отличие от классических *O*-деметилаз ацетогенов заключается в происхождении МТII, катализирующей дальнейший перенос метильной группы $-\text{CH}_3$ с корриноидного белка. У *M. shengliensis* МТII, переносящая метильную группу с СоР в метаногенный путь, является MtrH-метилтрансферазой, ген которой не имеет гомологов среди известных МТII и связан скорее с метилтетрагидрометанооптерин:КоМ метилтрансферазной субъединицей Н из неметаногенных архей (например, *Archaeoglobus fulgidus*), а также метилотрофных бактерий *Desulfitobacterium hafniense* и *Acetobacterium woodii*, т.е. организмов, которые не образуют и не используют КоМ (Wang et al., 2015). В противоположность росту на метаноле, $-\text{CH}_3$ группа данной метилтрансферазой вероятнее всего переносится сначала на ТГМП, а затем уже на КоМ (табл. 2) (Kurth et al., 2021). Это, наиболее вероятно, приводит к нестандартному ходу метаногенеза, который извлекает энергию скорее за счет переноса метильной группы (Mtr, метил-ТГМП:КоМ метилтрансфераза), чем за счет переноса электронов (ре-окисления F_{420}H_2), характерного для метилотрофного метаногенеза (Kurth et al., 2021).

Гены, вовлеченные в метоксидотрофный рост *M. shengliensis*, также найдены у других культивируемых архей, таких как *A. fulgidus*, *Methanolacinia petrolearia* и *Methanothermobacter tenebrarum*, что свидетельствует о более широком распространении метоксидотрофного метаболизма, чем предполагалось ранее. Более того, в 2021 году показана способность гипертермофильной археи *A. fulgidus* к метоксидотрофному метаболизму (Welte et al., 2021). Отсутствие роста на метаноле подтверждает, что *A. fulgidus* не содержит гомологичные метилтрансферазные системы MtaABC для его превращения. В отличие от *M. shengliensis*, *A. fulgidus* превращает метильную группу в CO_2 , а не в CH_4 , в пути Вуда–Льонгдаля. *A. fulgidus* может расти на МАС, таких как 2-метоксифенол, 2,6-диметоксифенол, метоксигидрохинон и 2-метоксibenзоат, осуществляя их неполное окисление до гидроксированных производных. *O*-деметилазная ферментная система у данного организма представлена MtoABCD белками, которые обеспечивают перенос CH_3 -группы через корриноидный белок предположительно на ТГМП (Welte et al., 2021). С₁-переносчиком в пути Вуда–Льонгдаля у *A. fulgidus* скорее является ТГМП, а не ТГФ, что отличает метоксидотрофные археи от ацетогенных бак-

терий, но, в то же время, подтверждает гипотезу о том, что MtoA переносит метильную группу на ТГМП. Образовавшийся метил-ТГМП может затем окисляться до CO₂ через путь Вуда–Льонгдала, генерируя восстановительные эквиваленты, которые предоставляют электроны для восстановления сульфата непосредственно через ферредоксин или косвенно через восстановленный менахинон.

O-деметиلاзная система в геномах метоксидотрофных архей кодируется генными кластерами, структурно отличающимися от оперонов ацетогенных бактерий. Так, O-деметилазу *M. shengliensis* кодирует кластер из пяти генов *mtoAB₁B₂CD* (Kurth et al., 2021), к тому же АФ расположен в одном опероне с остальными генами O-деметилазы, что нехарактерно для ацетогенных бактерий (Schilhabel et al., 2009). У *A. fulgidus* кластер генов, отвечающих за метоксидотрофный метаболизм, состоит из восьми генов и включает гены, кодирующие две МТИ, два СоР, АФ, располагающийся рядом с МТИ, а также несколько транспортных белков Mfs, отвечающих за импорт МАС в клетку и последующее выделение гидроксильированных продуктов во внешнюю среду (Welte et al., 2021). Несмотря на различия в структуре оперонов, их компоненты, тем не менее, проявляют высокую степень гомологии с компонентами бактериальной O-деметилазной системы MtvABC из *M. thermoacetica*, и их механизм действия, вероятно всего, идентичен (Pierce et al., 2008). Более того, МТИ и СоР, по-видимому, были приобретены археями в результате горизонтального переноса генов от бактерий (Kurth et al., 2021).

С помощью биоинформатического анализа было установлено, что и другие археи, такие как представители некультивируемых филумов *Batharchaeota*, *Lokiarchaeota*, *Korarchaeota*, *Helarchaeota*, *Verstraetearchaeota* и *Nezhaarchaeota*, содержат в своих геномах *mtoABC* аналоги (Kurth et al., 2021).

Филум *Bathyarchaeota* распространен повсеместно и имеет большую численность в морских осадках. Помимо предполагаемой способности батиархей к ацетогенезу и сбраживанию различных органических субстратов недавно был продемонстрирован рост *Bathyarchaeota* на лигнине (Yu et al., 2018). Представители подгруппы 8 батиархей способны осуществлять превращение метоксильированных групп лигнина в ацетил-КоА, используя метильную ветвь пути Вуда–Льонгдала (Yu et al., 2018). Нашим коллективом также установлено значительное увеличение относительной численности представителей филума *Bathyarchaeota* при росте в накопительных культурах, субстратом для которых являются метоксильированные ароматические соединения, что подтверждает способность представителей *Bathyarchaeota* к метоксидотрофному росту (неопубликованные

данные). *Lokiarchaeota*, возможно, также имеют потенциал к разложению лигнина (Yin et al., 2020). Таким образом, наличие *mto*-гомологов у всех вышеперечисленных групп архей позволяет выдвинуть гипотезу об их способности разлагать МАС.

БИОХИМИЧЕСКИЕ ПУТИ РАСЩЕПЛЕНИЯ БЕНЗОЛЬНОГО КОЛЬЦА В АНАЭРОБНЫХ УСЛОВИЯХ

В анаэробных условиях ароматическое кольцо подвергается восстановлению с последующим гидролитическим расщеплением образовавшейся алициклической структуры. Стратегия анаэробных бактерий заключается в превращении многочисленных низкомолекулярных ароматических ростовых субстратов в несколько ключевых интермедиатов, а именно в бензоил-КоА, флороглюцин (1,3,5-тригидроксибензол), резорцин (1,3-тригидроксибензол) и гидроксигидрохинон (1,2,4-тригидроксибензол), которые являются субстратами для соответствующих деароматических редуктаз (Harwood et al., 1999; Schink et al., 2000). Последние три соединения содержат ОН-группы в *мета*-положении, которое значительно ослабляет ароматические свойства интермедиата. Вследствие этого, двухэлектронное восстановление данных соединений может осуществляться в экзергонических реакциях с обычными физиологическими восстановителями. НАД(Ф)Н (в случае флороглюцина и гидроксигидрохинона) или ферредоксин (в случае резорцина) служат донорами электронов для соответствующих редуктаз (Haddock, Ferry, 1989; Kluge et al., 1990; Reichenbecher, Schink, 1997). Напротив, из-за высокой стабильности бензольного кольца, бензоил-КоА трудно восстановить физиологическими восстановителями. Единственный известный фермент, способный к такому восстановлению – бензоил-КоА редуктаза, – использует не только низкопотенциальный донор электронов ферредоксин, но, кроме того, связывает восстановление кольца со стехиометрическим гидролизом АТФ (Boll, Fuchs, 1995). Бензоил-КоА редуктаза (Bcr) является единственным чувствительным к кислороду ферментом из бензоил-КоА пути. К настоящему времени описано два класса бензоил-КоА редуктаз – АТФ-зависимая (Класс I), характерная для факультативных анаэробов, и АТФ-независимая, выявленная у облигатно анаэробных микроорганизмов (Класс II) (Boll, Fuchs, 1995; Holmes et al., 2012). Оба класса катализируют восстановление бензоил-КоА до неароматического продукта циклогекса-1,5-диен-1-карбоксил-КоА (1,5-диеноил-КоА) за счет последовательного переноса единичных электронов и протонов с крайне низким окислительно-восстановительным потенциалом. В процессе АТФ-

зависимого разрушения ароматического кольца восстановление бензоил-КоА может быть сопряжено с гидролизом АТФ, катализируемым бензоил-КоА редуктазой класса I (Boll, Fuchs, 1995; Boll, 2005). Бензоил-КоА редуктаза класса I из денитрифицирующей бактерии *Thauera aromatica* представляет собой нативный белок весом около 170 кДа, состоящий из четырех различных субъединиц с молекулярными массами 48, 45, 38 и 32 кДа, кодируемых генами *bcrABCD* (Boll, Fuchs, 1995).

Субъединицы *VcrAD* образуют электронный активирующий модуль, содержащий [4Fe–4S] кластер, в котором электроны от восстановленного ферредоксина активируются в результате гидролиза АТФ (1 молекула АТФ на 1 e⁻) и переносятся на субстрат-активирующий модуль *VcrBC*, содержащий два [4Fe–4S] кластера, а также бензоил-КоА связывающий сайт (Boll et al., 2000). Ген другой бензоил-КоА редуктазы *bzd*-типа (*bzdNOPQ*) выявлен у нескольких представителей рода *Azoarcus* (López Barragán et al., 2004). Данный ген проявлял 43% сходства по аминокислотной последовательности с бензоил-КоА редуктазами из *T. aromatica* и *Rhodospseudomonas palustris*. Структура оперона, отвечающего за анаэробное разложение бензоата у *T. aromatica* и *Azoarcus evansii*, значительно различается, хотя оба вида довольно близки согласно анализу 16S рРНК сиквенсов (Harwood et al., 1999). Оба филогенетически различных подкласса бензоил-КоА редуктаз *Thauera*- и *Azoarcus*-типов являются железосерными белками и состоят из АТФ-гидролизующего модуля активации электронов и модуля восстановления бензоил-КоА. Белки *VzdP* и *VzdQ* из гипертермофильной археи *Ferroglobus placidus* организованы в гетеродимер с молекулярным весом 73 кДа, содержат [4Fe–4S] кластер и образуют электронный активационный модуль, гомологичный активационному модулю 2-гидроксиацил-КоА дегидратаз, вовлеченных в сбрасывание аминокислот, а не *VcrAD* из *T. aromatica* (Schmid et al., 2016).

У *Geobacter metallireducens*, осуществлявшего анаэробное железное дыхание на ароматических субстратах, была выделена и охарактеризована АТФ-независимая бензоил-КоА редуктаза класса II (Wischgoll et al., 2005). Фермент состоит из восьми различных субъединиц (*VamBCDEFGHI*), которые содержат [4Fe–4S] кластеры, вольфрам, цинк, флаavin и селеноцистеин в качестве кофакторов (Wischgoll et al., 2005). Субъединица *VamB* содержит активный сайт с вольфрамово-птериновым кофактором и [4Fe–4S] кластером. Гены, кодирующие данные белки, были выявлены в геномах большинства облигатно анаэробных Fe(III)-восстановливающих, сульфатредуцирующих и ферментирующих бактерий, способных использовать ароматические соединения для роста (Löffler et al., 2011).

Несмотря на различный субъединичный состав, бензоил-КоА редуктазы обоих классов образуют один и тот же неароматический продукт – 1,5-диеноил-КоА, последующие пути трансформации которого катализируются сходными ферментами у всех анаэробных бактерий, метаболизирующих ароматические соединения (Wischgoll et al., 2005; Löffler et al., 2011), что приводит в итоге к образованию трех молекул ацетил-КоА и CO₂.

ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ И ПРИКЛАДНЫЕ АСПЕКТЫ АНАЭРОБНОЙ МЕТОКСИДОТРОФИИ

Анаэробные метоксидотрофные микроорганизмы играют важную роль в ряде природных процессов, таких как разложение лигнина, метоксидотрофный метаногенез, образование летучих серных соединений и разложение ксенобиотиков.

Разложение лигнина

Микробные процессы разложения лигнина вызывают большой интерес в самых разных областях, начиная от общеэкологических вопросов минерализации углерода до биоэнергетической инженерии и выяснения микробных путей превращения угля (Lehmann, Kleber, 2015; Welte, 2016). Переработка биомассы и целлюлозно-бумажная промышленность обеспечивают около 6.2×10^7 и 5×10^7 тонн лигнина соответственно (Zakzeski, 2010). Лигнин, как составная часть древесины, наиболее трудно утилизируемый отход, который образуется при ее химической переработке на целлюлозно-бумажных и гидролизных предприятиях и является довольно токсичным при захоронении на полигонах. В то же время лигнин выступает как перспективное сырье для производства биотоплива и биохимикатов, благодаря высокому соотношению углерода и кислорода в его составе. Считается, что в анаэробных условиях лигнин инертен, но он, по-видимому, может подвергаться незначительной деградации в некоторых анаэробных местообитаниях за счет факультативных анаэробов. Следует отметить, что разложение модифицированного лигнина происходит эффективнее по сравнению с натуральным, что может быть связано с его более высокой степенью метоксилирования (Ahning et al., 2015). Мономеры, образующиеся при деградации лигнина, могут быть легко метаболизированы и полностью разлагаются анаэробно, причем главным объектом реакции их анаэробного разложения являются метоксильные группы. Наиболее интенсивно микробиологами исследовались МАС, структурно связанные с функциональными группами лигнина, такие как ванилат, ферулат, сирингат и их гидроксильные производные – протокатехоат, кафеат и галлат (рис. 1). Для связи

фундаментальных знаний с развивающейся в последнее время областью биовалоризации лигнина, сотрудниками Университета г. Лунд (Швеция), создана свободно доступная база данных по микробному катаболизму лигнина eLignin Microbial Database (www.elignindatabase.com), в которой каталогизированы данные по микроорганизмам-лигнинолитикам, ароматическим субстратам, в т.ч. метоксилированным, а также метаболическим путям их превращения (Brink et al., 2019). Поскольку аэробное разложение лигнина и его составляющих выходит за рамки данного обзора, более подробную информацию по указанной тематике можно найти в следующих источниках (Abdelaziz et al., 2016; Venkatesagowda, Dekker, 2021).

Метоксидотрофный метаногенез

Метан является вторым по значимости парниковым газом на Земле, его выделение в атмосферу достигает 600×10^9 кг в год (Conrad, 2009). Около 70% метана образуется метаногенными археями, что подтверждает важность метаногенеза в глобальном цикле углерода (Conrad, 2009). Метаногены используют очень ограниченный набор субстратов для образования CH_4 , основными из которых являются ацетат, H_2/CO_2 , метанол и метиламины. Недавно перечень метаногенных субстратов был расширен вследствие открытия прямого использования МАС метаногеном *Methermicoccus shengliensis* (Mayumi et al., 2016). Метоксидотрофный метаногенез устанавливает ранее неизвестную связь между C_1 -метаболизмом и анаэробным разложением инертных ароматических соединений. Факт обнаружения метоксидотрофного метаногенеза, наряду с широким распространением МАС, позволяет предположить, что роль этого процесса в глобальном цикле углерода, особенно в подземной биосфере, недооценена (Welte, 2016). Микробные сообщества глубокой биосферы участвуют в превращении растительного вещества в уголь, причем наличие МАС влияет на количество образовавшегося в угольных пластах метана (Lloyd et al., 2021). Особенно много метоксильных групп содержится в незрелом угле, что повышает возможность метоксидотрофного метаногенеза. И хотя ранее предполагали, что для превращения соединений угля в метан требуются метаболические взаимодействия между несколькими микроорганизмами, способность *M. shengliensis* осуществлять метоксидотрофный метаногенез в одиночку, минуя полную микробную трофическую цепь, может оказывать существенное влияние на образование метана в угольных пластах, которое составляет 7% мировой годовой продукции CH_4 (Ritter et al., 2015). Метан, образующийся из угля, может стать экономической альтернативой сланцевому газу, который добывается посредством гидроразрыва пластов. Несмотря на довольно не-

большие объемы образования метана из угля в настоящее время, понимание биологических механизмов метоксидотрофного метаногенеза в дальнейшем может облегчить задачу его добычи (Welte, 2016). Сейчас известно лишь два штамма метоксидотрофных метаногенов. Оба принадлежат к виду *Methermicoccus shengliensis*, являются термофилами и выделены из пластовых вод нефтяных месторождений в Китае и Японии. Метоксидотрофный штамм *Methermicoccus shengliensis* АтаМ был изначально выделен на метаноле и затем протестирован на способность к использованию МАС (Mayumi et al., 2016). Этой же исследовательской группой был продемонстрирован метоксидотрофный метаногенез и для типового штамма *M. shengliensis* ZC-1^T (Cheng et al., 2007), выделенного ранее. Кажется весьма вероятным, что должны существовать и другие метаногенные археи, использующие МАС, однако пока попытки прямого выделения представителей этой физиологической группы не привели к положительным результатам.

Образование летучих серных соединений

В отличие от гомоацетогенов, которые переносят метильную группу с метоксилированного ароматического соединения на CO_2 с образованием ацетата, некоторые микроорганизмы могут осуществлять реакцию трансметилирования между МАС и неорганическим сульфидом с образованием диметилсульфида (ДМС) и метантиола (МТ) (Bak et al., 1992). Эти два продукта представляют собой летучие органические серные соединения, играющие важную роль в процессах глобального потепления, кислотных осадках, а также в глобальном цикле серы. Биогенная эмиссия метилированных серных соединений, образующихся в осадочных породах и почвах, является наиболее важным природным источником серы в атмосфере. В противоположность морским экосистемам, где МТ и ДМС образуются, главным образом, из диметилсульфониопропионата (осмолит многих морских водорослей и галофитных растений), в пресноводных экосистемах летучие органические серные соединения образуются преимущественно в результате метилирования сульфида в процессе анаэробного *O*-деметилирования МАС и, в гораздо меньшей степени, в процессе разложения серосодержащих аминокислот (Lomans et al., 2002). Значительная часть образованных МТ и ДМС в дальнейшем могут подвергаться анаэробному разложению метилотрофными метаногенами (Lomans et al., 1999).

Разложение ксенобиотиков

Многочисленные химикаты и ксенобиотики содержат метоксильные функциональные груп-

пы. Эти *O*-метилловые эфиры весьма стабильны во многих химических процессах, и основной начальной реакцией при их анаэробном разложении является отщепление защитной $-\text{CH}_3$ группы, поскольку фенольные продукты легче подвергаются последующей деградации (Azzena et al., 1992). Эксперименты *in vitro* с *O*-деметилазой, выделенной из *Sporomusa ovata*, показали ее способность деметилировать такие субстраты, как метоксианафтол, метоксифуран и фторанизолы (Stupperich et al., 1996). Анаэробное *O*-деметилирование является важным этапом и в биотрансформации хлорсодержащих метоксикатехолов. Хлоровератролы и хлорогваяколы являются ксенобиотиками, которые попадают в сточные воды в результате химического отбеливания целлюлозы. Установлено, что ацетогены *A. woodii* и *E. limosum* могут осуществлять *O*-деметилирование ряда хлорогваяколов без последующего дехлорирования образующихся хлорокатехолов (Häggbloom et al., 1993). Другое хлорсодержащее органическое соединение — широко распространенный гербицид дикамба (3,6-дихлор-2-метоксибензоат) — является субстратом для *Moorella thermoacetica* и *O*-деметилируется до 3,6-дихлорсалицилата (Naidu, Ragsdale, 2001). Дикамба представляет собой синтетический аналог природного растительного гормона индол-3-уксусной кислоты и используется в качестве селективного гербицида для ряда сельскохозяйственных культур в борьбе с сорняками. В 2007 году фирма Monsanto вставила один из компонентов трехкомпонентной системы *O*-деметилазы из облигатного аэроба *Stenotrophomonas (Pseudomonas) maltophilia*, в геном сои и несколько широколиственных хлебных злаков, сделав их устойчивыми к дикамбе. Однако это не исключает дальнейший поиск новых биотехнологических подходов и делает гены *O*-деметилаз из ацетогенов перспективными кандидатами для решения проблемы селективности сельскохозяйственных культур в отношении гербицидов.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ГЕНОМОВ АНАЭРОБНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ, ИСПОЛЬЗУЮЩИХ МАС

В данной работе мы провели сравнительный анализ доступных полных геномов микроорганизмов, способных метаболизировать МАС анаэробно (46 геномов). Объектом анализа было наличие и организация генов *O*-деметилазы (МТI и МТII, CoP и активирующий фермент), бензоил-КоА редуктазы различных типов (BcrCBAD, BzdQ и VamB), а также СО-дегидрогеназы/ацетил-КоА синтазы, ключевого фермента пути Вуда–Льюнгаля (табл. 3). Исследование проводилось с использованием биоинформатических методов, предоставляемых интернет-сервисами GenBank

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) и IMG/M (<https://img.jgi.doe.gov>).

Как видно из табл. 3, организация всех генов системы *O*-деметилирования в один кластер не является обязательным требованием для проявления ее активности. Однако все биохимически охарактеризованные к настоящему моменту *O*-деметилазы кодируются кластером, состоящим не менее чем из трех генов (табл. 2). Более того, даже полное отсутствие *O*-деметилазных генов не исключает для организма возможности роста на МАС, поскольку у большинства проанализированных микроорганизмов в геномах выявлены как гены *O*-деметилирования, так и гены расщепления ароматического кольца. В связи с этим, в каждом конкретном случае, для выяснения возможных путей разложения МАС, требуется более подробный геномный анализ в совокупности с физиологическими и биохимическими экспериментами. Особенно это относится к микроорганизмам, растущим на таких ароматических субстратах, как ванилин, ванилат, ферулат, сирингат (рис. 1, табл. 1), содержащим в своем составе как метоксильные, так и гидроксильные группы. В филуме *Bacillota* гены *O*-деметилазы отсутствуют у *Papillibacter cinnamivorans*, *Catenibacillus scindens*, *Cl. methoxybenzovorans*, тогда как подавляющее большинство ацетогенов содержит полный набор этих генов (во многих случаях и несколько копий), также как и ген СО-дегидрогеназы/ацетил-КоА синтазы. *Koleobacter methoxysyntrophicus*, способный расти на триметоксибензоате только в присутствии метаногена, не содержит генов, СО-ДГ/ацетил-КоА синтазы и МТI, хотя остальные гены *O*-деметилазы локализованы в кластере. Подобная способность разлагать МАС исключительно путем синтрофного взаимодействия констатирует со всеми выделенными к данному моменту чистыми культурами, метаболизирующими МАС, и требует более детального изучения.

Все проанализированные представители *Pseudomonadota*, кроме *Desulfomonile tiedjei*, являются факультативными анаэробами, и в их геномах не выявлено генов анаэробной *O*-деметилазной системы, а также СО-ДГ/ацетил-КоА синтазного комплекса и генов бензоил-КоА редуктаз. У *Desulfomonile tiedjei* из класса *Deltaproteobacteria* обнаружено несколько классических оперонов *O*-деметилаз, однако этот микроорганизм является облигатным анаэробом и способен расти на широком спектре метоксилированных ароматических субстратов (DeWeerd et al., 1990). Геном *Rhodospseudomonas palustris* содержит полный оперон генов бензоил-КоА редуктазы bcr-типа, что свидетельствует об отщеплении функциональной гидроксильной группы ферулата, а не метильной. С другой стороны, мутант *R. palustris* с “выключенным” опероном *bcrCABD* все равно оказался способен расти на сирингате за счет вовлечения

Таблица 3. Гены ферментов системы *O*-деметилазы и восстановления ароматического кольца у культивируемых анаэробных прокариот, способных к анаэробному росту на МАС

Микроорганизм, штамм	Номер генома в GenBank	Гены <i>O</i> -деметилазы	Комплекс СО-дегидрогеназа/ацетил-КоА синтаза	Кластер бензоил-КоА редуктазы BcrBAD	Бензоил-КоА редуктаза BzdQ	Бензоил-КоА редуктаза BamB
<i>Acetopetia longum</i> DSM 6540	PRJNA66109	Несколько кластеров	+	Неполный кластер из двух генов	–	–
<i>Acetitomaculum ruminis</i> DSM 5522	PRJEB17106	Кластер	+	–	+	–
“ <i>Acetobacterium dehalogenans</i> ” DSM 11527	PRJNA165505	Несколько кластеров	+	–	Несколько генов	Несколько генов
<i>Acetobacterium malicum</i> DER-2019	PRJNA586871	Несколько кластеров	+	Кластер из трех генов	Несколько генов	Несколько генов
<i>Acetobacterium woodii</i> DSM 1030	PRJNA60713	Несколько кластеров	+	Неполный кластер из двух генов	Несколько генов	+
<i>Acinetobacter johnsonii</i> DSM 6963	PRJDB1754	–	–	–	–	–
<i>Achromobacter denitrificans</i> LMG 1231	PRJEB37567	–	–	–	–	–
<i>Alkalibacter mobilis</i> M17 DMB	PRJNA676094	Несколько кластеров	+	–	+	Несколько генов
<i>Alkalibaculum bacchi</i> DSM 22112	PRJNA456024	Не в кластере	+	–	Несколько генов	+
<i>Alkalibaculum sporogenes</i> M08 DMB	PRJNA578292	Не в кластере	+	–	Несколько генов	Несколько генов
<i>Archaeoglobus fulgidus</i> DSM 4304	PRJNA104	Кластер	+	Кластер из трех генов	+	Несколько генов
<i>Blautia producta</i> ATCC 27340	PRJNA169801	Кластер	+	Кластер из трех генов	Несколько генов	–
“ <i>Butyrivacterium methylotrophicum</i> ” DSM 3468	PRJNA342396	Не в кластере	+	–	+	Несколько генов
<i>Calorimonas adulescens</i> A05MB	PRJNA560519	Не в кластере	+	Неполный кластер из двух генов	Несколько генов	+
<i>Catenibacillus scindens</i> DSM 106146	PRJNA632145	МТII отсутствует, остальные гены не в кластере	–	Неполный кластер из двух генов	Несколько генов	–
<i>Cl. acetiscum</i> DSM 1496	PRJNA263904	Несколько кластеров	+	Неполный кластер из двух генов	Несколько генов	Несколько генов

Таблица 3. Продолжение

Микроорганизм, штамм	Номер генома в GenBank	Гены O-деметилазы	Комплекс СО-дегидрогеназа/ацетил-КоА синтаза	Кластер бензоил-КоА редуктазы BcrCBAD	Бензоил-КоА редуктаза BzdQ	Бензоил-КоА редуктаза BamB
<i>Cl. formicasepticum</i> DSM 92	PRJNA380994	Кластер	+	Неполный кластер из двух генов	Несколько генов	+
<i>Cl. methoxybenzovorans</i> SR3	PRJNA187237	–	Неполный кластер	Кластер из трех генов	Несколько генов	–
<i>Cl. scatologenes</i> ATCC 25775	PRJNA265889	Кластер	+	Кластер из трех генов	Несколько генов	–
<i>Desulfotobacterium hafniense</i> DCB-2	PRJNA205	Несколько кластеров	+	Кластер из трех генов	Несколько генов	+
<i>D. chlororespirans</i> DSM 11544	PRJEB18450	Кластер	+	Кластер из трех генов	Несколько генов	+
<i>D. delhalogenans</i> ATCC 51507	PRJNA61181	Кластер	+	Кластер из трех генов	Несколько генов	+
<i>Desulfofundulus therrnbenzoicus</i> DSM 14055	PRJNA579145	Кластер	Неполный кластер	Неполный кластер из двух генов	Несколько генов	Несколько генов
<i>Desulfoscapio gibsoniae</i> DSM 7213	PRJNA59873	Кластер	+	Неполный кластер из двух генов	+	Несколько генов
<i>Desulfosporosinus</i> DSM 765	PRJNA66191	Кластер	+	Кластер из трех генов	Несколько генов	Несколько генов
<i>Desulfomonile tiepfei</i> DSM 6799	PRJNA43133	Несколько кластеров	+	Неполный кластер из двух генов	+	Несколько генов
<i>Dehalococcoides mccartyi</i> 195	PRJNA214	–	–	–	+	–
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13047	PRJNA45793	–	–	–	–	–
<i>Eubacterium limosum</i> ATCC 8486	PRJNA270275	Кластер	+	–	+	Несколько генов
<i>Eubacterium callanderi</i> FD	PRJEB18374	Не в кластере	+	–	+	Несколько генов
<i>Holophaga foetida</i> DSM 6591	PRJNA53485	Не в кластере	+	–	+	–
<i>Klebsiella oxytoca</i> DSM 5175	PRJNA543274	–	–	Неполный кластер из двух генов	+	–

Таблица 3. Окончание

Микроорганизм, штамм	Номер генома в GenBank	Гены O-деметиلاзы	Комплекс СО-дегидрогеназа/ацетил-КоА синтаза	Кластер бензоил-КоА редуктазы BcrCBAD	Бензоил-КоА редуктаза BzdQ	Бензоил-КоА редуктаза BamB
<i>Kleobacter methoxyautotrophicus</i> NRmbB1	PRJNA645406	Отсутствует МПГ, остальные гены в кластере	-	Неполный кластер из двух генов	Несколько генов	Несколько генов
<i>Methermicrococcus shengtensis</i> DSM 18856	PRJNA235052	Кластер	+	-	-	-
<i>Moorella thermoacetica</i> DSM 2955	PRJNA292083	Несколько кластеров	+	Кластер из трех генов	Несколько генов	Несколько генов
<i>Oxobacter pfennigii</i> DSM 3222	PRJNA297260	Несколько кластеров	+	Неполный кластер из двух генов	Несколько генов	Несколько генов
<i>Papillibacter cinnamivorans</i> DSM 12816	PRJEB20323	-	-	Полный кластер из четырех генов	Несколько генов	-
<i>Parasporobacterium paucivorans</i> DSM 15970	PRJEB18299	Кластер	+	-	+	-
<i>Rhodomicrobium vannielii</i> ATCC 17100	PRJNA38253	-	-	Полный кластер из четырех генов	+	-
<i>Rhodopseudomonas palustris</i> RCB100	PRJNA683609	-	-	Полный кластер из четырех генов	-	-
<i>Sporobacter termitidis</i> DSM 10068	PRJEB18258	Не в кластере	+	-	Несколько генов	+
<i>Sporomusa malonica</i> DSM 5090	PRJEB20330	Не в кластере	+	Неполный кластер из двух генов	Несколько генов	-
<i>Sporomusa ovata</i> DSM 2662	PRJNA205246	Не в кластере	+	Неполный кластер из двух генов	Несколько генов	-
<i>Sporomusa silvacetica</i> DSM 10669	PRJNA310713	Не в кластере	+	Кластер из трех генов	+	+
<i>Sporomusa termitida</i> DSM 4440	PRJNA523110	Не в кластере	+	-	Несколько генов	-
<i>Thermacetogenium phaeum</i> DSM 12270	PRJNA168373	Не в кластере	+	Кластер из трех генов	Несколько генов	Несколько генов

Обозначения. Кластер; рядом расположены три и более гена. В качестве референсных использовались гены из базы данных GenBank с доказанной биохимической активностью генового продукта. Гены O-деметилазы из *Acetobacterium dehalogenans*: *odmA* (AAC83695.2), *odmB* (AAC83696.1), *odmC* (ACJ01666.1), *odmD* (AAR11880.2); гены бензоил-КоА редуктазы из *Thalassia atomatica*: *bcrA* (O87876.1), *bcrB* (O87875.1), *bcrC* (O87874.1), *bcrD* (O87877.1); ген бензоил-КоА редуктазы из *Geobacter metallireducens bamB* (ABV2316.1); ген бензоил-КоА редуктазы из *Azoarcus* штамм CIP bzdQ (AAQ08809.1); гены СО-дегидрогеназы/ацетил-КоА синтазы из *Moorella thermoacetica* α -субъединица (P27988.1) и β -субъединица (P27989.1).

белков, кодируемых опероном *vanARB*, который отвечает за *O*-деметилирование ароматического кольца у аэробных бактерий (Oshlag et al., 2020). Мы проанализировали присутствие в геномах *vanARB* оперона у всех микроорганизмов из табл. 3 с отсутствующими генами анаэробной *O*-деметилазы (данные не представлены). Оказалось, что только *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae* и *Achromobacter denitrificans* содержат кластер *vanAB*, тогда как ген регулятора транскрипции *vanR* располагается не в опероне. С учетом вышесказанного вопрос о том, каким образом группа факультативных анаэробов осуществляет деградацию МАС, остается открытым.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Трансформация МАС микроорганизмами изучается на протяжении нескольких десятилетий. Наиболее многочисленной группой анаэробов, способных к росту на МАС, являются ацетогенные бактерии класса *Clostridia*. Факультативно анаэробные метоксидотрофы гораздо менее многочисленны и относятся к филуму *Pseudomonadota*. Недавно установлено, что и археи способны метаболить МАС в анаэробных условиях. Открытие метоксидотрофного метаногенеза существенно меняет взгляд на пути образования метана в природе.

Энергию для роста при использовании МАС микроорганизм может получать либо за счет деметилирования, либо за счет разрыва ароматического кольца, а иногда за счет обеих реакций. В большинстве случаев, метоксидотрофный рост обусловлен наличием *O*-деметилазной энзиматической системы, состоящей из четырех компонентов и сходной у бактерий и архей. Проведенный нами анализ геномов 46 прокариот, анаэробно разлагающих МАС, на наличие генов *O*-деметилаз, СО-дегидрогеназы/ацетил-КоА синтазы, а также бензоил-КоА редуктаз показал, что факультативные анаэробы, принадлежащие к филуму *Pseudomonadota*, не имеют известных генетических детерминант анаэробной *O*-деметилазной реакции и восстановления ароматического кольца. Таким образом, трансформация МАС анаэробными микроорганизмами осуществляется различными биохимическими механизмами.

Практически отсутствует информация о вкладе анаэробного метаболизма МАС в глобальный цикл углерода, однако можно предположить, что он может быть довольно существенным, принимая во внимание значительные концентрации МАС в природных органических веществах, таких как лигнин и уголь. Потенциальная способность к анаэробному *O*-деметилированию у некультивируемых представителей филумов *Bathyarchaeota*, *Korarchaeota* и ряда других свидетельствует о более широких экологических функциях, выполня-

емой анаэробными метоксидотрофными микроорганизмами.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 22-24-00868.

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

- Abdelaziz O.Y., Brink D.P., Prothmann J., Ravi K., Sun M., García-Hidalgo J., Sandahl M., Hulteberg C.P., Turner C., Lidén G., Gorwa-Grauslund M.F. Biological valorization of low molecular weight lignin // *Biotechnol. Adv.* 2016. V. 34. P. 1318–1346.
- Ahring B.K., Biswas R., Ahamed A., Teller P.J., Uellendahl H. Making lignin accessible for anaerobic digestion by wet-explosion pretreatment // *Bioresour. Technol.* 2015. V. 175. P. 182–188.
- Allen T.D., Caldwell M.E., Lawson P.A., Huhnke R.L., Tanner R.S. *Alkalibaculum bacchi* gen. nov., sp. nov., a CO-oxidizing, ethanol-producing acetogen isolated from livestock-impacted soil // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2010. V. 60. P. 2483–2489.
- Ander P., Eriksson K.B. Lignin degradation and utilization by micro-organisms // *Prog. Ind. Microbiol.* 1978. V. 14. P. 1–58.
- Azzena U., Denurra T., Melloni G., Fenude E., Rassu G. Electron-transfer-induced reductive demethoxylation of anisole: evidence for cleavage of a radical anion // *J. Org. Chem.* 1992. V. 57. P. 1444–1448.
- Bache R., Pfennig N. Selective isolation of *Acetobacterium woodii* on methoxylated aromatic acids and determination of growth yields // *Arch. Microbiol.* 1981. V. 130. P. 255–261.
- Bak F., Finster K., Rothfuss F. Formation of dimethyl sulfide and methanethiol from methoxylated aromatic compounds and inorganic sulfide by newly isolated anaerobic bacteria // *Arch. Microbiol.* 1992. V. 159. P. 529–534.
- Berman M.H., Frazer A.C. Importance of tetrahydrofolate and ATP in the anaerobic *O*-demethylation reaction for phenylmethylethers // *Appl. Environ. Microbiol.* 1992. V. 58. P. 925–931.
- Bernhardt F.H., Ruf H.H., Staudinger H. Purification of a 4-methoxybenzoate *O*-demethylase from *Pseudomonas putida* // *Biol. Chem.* 1971. V. 352. P. 1091–1099.
- Boll M. Dearomatizing benzene ring reductases // *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2005. V. 10. P. 132–142.
- Boll M., Fuchs G. Benzoyl-coenzyme A reductase (dearomatizing), a key enzyme of anaerobic aromatic metabolism.

- ATP dependence of the reaction, purification and some properties of the enzyme from *Thauera aromatica* strain K172 // Eur. J. Biochem. 1995. V. 234. P. 921–933.
- Boll M., Fuchs G., Meier C., Trautwein A., Lowe D.J. EPR and Mössbauer studies of benzoyl-CoA reductase // J. Biol. Chem. 2000. V. 275. P. 31857–31868.
- Braune A., Blaut M. *Catenibacillus scindens* gen. nov., sp. nov., a C-deglycosylating human intestinal representative of the *Lachnospiraceae* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2018. V. 68. P. 3356–3361.
- Breznak J.A., Switzer J.M., Seitz H.J. *Sporomusa termitida* sp. nov., an H₂/CO₂-utilizing acetogen isolated from termites // Arch. Microbiol. 1988. V. 150. P. 282–288.
- Brink D.P., Ravi K., Lidén G., Gorwa-Grauslund M.F. Mapping the diversity of microbial lignin catabolism: experiences from the eLignin database // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2019. V. 103. P. 3979–4002.
- Brunow G., Lundquist K. Functional groups and bonding patterns in lignin (including the lignin-carbohydrate complexes) // Lignin and Lignans / Eds. Heitner C., Dimmel D., Schmidt J. CRC Press, 2010. P. 267–299.
- Chen J.X., Deng C.Y., Zhang Y.T., Liu Z.M., Wang P.Z., Liu S.L., Qian W., Yang D.H. Cloning, expression, and characterization of a four-component O-demethylase from human intestinal bacterium *Eubacterium limosum* ZL-II // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2016. V. 100. P. 9111–9124.
- Cheng L., Qiu T.L., Yin X.B., Wu X.L., Hu G.Q., Deng Y., Zhang H. *Methermicoccus shengliensis* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, methylotrophic methanogen isolated from oil-production water, and proposal of *Methermicoccaceae* fam. nov. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2007. V. 57. P. 2964–2969.
- Christiansen N., Ahring B.K. *Desulfitobacterium hafniense* sp. nov., an anaerobic, reductively dechlorinating bacterium // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 1996. V. 46. P. 442–448.
- Conrad R. The global methane cycle: recent advances in understanding the microbial processes involved // Environ. Microbiol. Rep. 2009. V. 1. P. 285–292.
- Daniel S.L., Keith E.S., Yang H., Lin Y.S., Drake H.L. Utilization of methoxylated aromatic compounds by the acetogen *Clostridium thermoaceticum*: expression and specificity of the co-dependent O-demethylating activity // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1991. V. 180. P. 416–422.
- Defnouv S., Labat M., Ambrosio M., Garcia J.L., Patel B.K. *Papillibacter cinnamivorans* gen. nov., sp. nov., a cinnamate-transforming bacterium from a shea cake digester // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2000. V. 50. P. 1221–1228.
- Dehning I., Stieb M., Schink B. *Sporomusa malonica* sp. nov., a homoacetogenic bacterium growing by decarboxylation of malonate and succinate // Arch. Microbiol. 1989. V. 151. P. 421–426.
- DeWeerd K.A., Mandelco L., Tanner R.S., Woese C.R., Sufliata J.M. *Desulfomonile tiedjei* gen. nov. and sp. nov., a novel anaerobic, dehalogenating, sulfate-reducing bacterium // Arch. Microbiol. 1990. V. 154. P. 23–30.
- DeWeerd K.A., Saxena A., Nagle D.P., Jr., Sufliata J.M. Metabolism of the ¹⁸O-methoxy substituent of 3-methoxybenzoic acid and other unlabeled methoxybenzoic acids by anaerobic bacteria // Appl. Environ. Microbiol. 1988. V. 54. P. 1237–1242.
- Dürichen H., Diekert G., Studenik S. Redox potential changes during ATP-dependent corrinoid reduction determined by redox titrations with europium(II)-DTPA // Protein Sci. 2019. V. 28. P. 1902–1908.
- Engelmann T., Kaufmann F., Diekert G. Isolation and characterization of a veratrol:corrinoid protein methyl transferase from *Acetobacterium dehalogenans* // Arch. Microbiol. 2001. V. 175. P. 376–383.
- Frazer A.C. O-Demethylation and other transformations of aromatic compounds by acetogenic bacteria // Acetogenesis / Eds. Drake H.L. Chapman & Hall Microbiology Series. Boston: Springer, 1994. P. 445–483.
- Grbić-Galić D. Fermentative and oxidative transformation of ferulate by a facultatively anaerobic bacterium isolated from sewage sludge // Appl. Environ. Microbiol. 1985. V. 50. P. 1052–1057.
- Grech-Mora M.L., Fardeau M.L., Patel B.K.C., Ollivier B., Rimbault A., Prensier G., Garcia J.L., Garnier-Sillam E. Isolation and characterization of *Sporobacter termitidis* gen. nov., sp. nov., from the digestive tract of the wood-feeding termite // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 1996. V. 46. P. 512–518.
- Greening R.C., Leedle J.A. Enrichment and isolation of *Acetitomaculum ruminis*, gen. nov., sp. nov.: acetogenic bacteria from the bovine rumen // Arch. Microbiol. 1989. V. 151. P. 399–406.
- Haddock J.D., Ferry J.G. Purification and properties of phloroglucinol reductase from *Eubacterium oxidoreducens* G-41 // J. Biol. Chem. 1989. V. 264. P. 4423–4427.
- Hagel J., Facchini P. Biochemistry and occurrence of O-demethylation in plant metabolism // Front. Physiol. 2010. V. 1. P. 14.
- Hägglom M.M., Berman M.H., Frazer A.C., Young L.Y. Anaerobic O-demethylation of chlorinated guaiacols by *Acetobacterium woodii* and *Eubacterium limosum* // Biodegradation. 1993. V. 4. P. 107–114.
- Hatcher P.G., Clifford D.J. The organic geochemistry of coal: from plant materials to coal // Org. Geochem. 1997. V. 27. P. 251–274.
- Harwood C.S., Burchhardt G., Herrmann H., Fuchs G. Anaerobic metabolism of aromatic compounds via the benzoyl-CoA pathway // FEMS Microbiol. Rev. 1999. V. 22. P. 4439–4458.
- Harwood C.S., Gibson J. Anaerobic and aerobic metabolism of diverse aromatic compounds by the photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas palustris* // Appl. Environ. Microbiol. 1988. V. 54. P. 712–717.
- Hattori S., Kamagata Y., Hanada S., Shoun H. *Thermacetogenium phaeum* gen. nov., sp. nov., a strictly anaerobic, thermophilic, syntrophic acetate-oxidizing bacterium // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2000. V. 50. P. 1601–1609.
- Healy J.B., Young L.Y. Anaerobic biodegradation of eleven aromatic compounds to methane // Appl. Environ. Microbiol. 1979. V. 38. P. 84–89.
- Holmes D.E., Risso C., Smith J.A., Lovley D.R. Genome-scale analysis of anaerobic benzoate and phenol metabolism in the hyperthermophilic archaeon *Ferroglobus placidus* // ISME J. 2012. V. 6. P. 146–157.
- Kane M.D., Breznak J.A. *Acetonema longum* gen. nov. sp. nov., an H₂/CO₂ acetogenic bacterium from the termite, *Pterotermes occidentis* // Arch. Microbiol. 1991. V. 156. P. 91–98.
- Kaufmann F., Wohlfarth G., Diekert G. Isolation of O-demethylase, an ether-cleaving enzyme system of the homo-

- cetogenic strain MC // Arch. Microbiol. 1997. V. 166. P. 136–142.
- Kaufmann F., Wohlfarth G., Diekert G. O-demethylase from *Acetobacterium dehalogenans* – cloning, sequencing, and active expression of the gene encoding the corrinoid protein // Eur. J. Biochem. 1998a. V. 257. P. 515–521.
- Kaufmann F., Wohlfarth G., Diekert G. O-demethylase from *Acetobacterium dehalogenans* – substrate specificity and function of the participating proteins // Eur. J. Biochem. 1998b. V. 253. P. 706–711.
- Khomyakova M.A., Merkel A.Y., Kopitsyn D.S., Bonch-Osmolovskaya E.A., Slobodkin A.I. *Calorimonas adulescens* gen. nov., sp. nov., an anaerobic thermophilic bacterium utilizing methoxylated benzoates // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2020a. V. 70. P. 2066–2071.
- Khomyakova M., Merkel A., Novikov A., Klyukina A., Slobodkin A. *Alkalibacter mobilis* sp. nov., an anaerobic bacterium isolated from a coastal lake // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2021. V. 71. Art. 5174.
- Khomyakova M.A., Merkel A.Y., Petrova D.A., Bonch-Osmolovskaya E.A., Slobodkin A.I. *Alkalibaculum sporogenes* sp. nov., isolated from a terrestrial mud volcano and emended description of the genus *Alkalibaculum* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2020b. V. 70. P. 4914–4919.
- Kluge C., Tschuch A., Fuchs G. Anaerobic metabolism of resorcylic acids (*m*-dihydroxybenzoic acids) and resorcinol (1,3-benzenediol) in a fermenting and in a denitrifying bacterium // Arch. Microbiol. 1990. V. 155. P. 68–74.
- Krumholz L.R., Bryant M.P. *Clostridium pfennigii* sp. nov. uses methoxyl groups of monobenzenoids and produces butyrate // Int. J. Syst. Bacteriol. 1985. V. 35. P. 454–456.
- Krumholz L.R., Bryant M.P. *Syntrophococcus sucromutans* sp. nov., gen. nov. uses carbohydrates as electron donors and formate, methoxybenzenoids or *Methanobrevibacter* as electron acceptor systems // Arch. Microbiol. 1986. V. 143. P. 313–318.
- Kuever J., Rainey F.A., Hippe H. Description of *Desulfotomaculum* sp. Groll as *Desulfotomaculum gibsoniae* sp. nov. // Int. J. Syst. Bacteriol. 1999. V. 49. P. 1801–1808.
- Kuhner C.H., Frank C., Griesshammer A., Schmittroth M., Acker G., Gössner A., Drake H.L. *Sporomusa silvacetica* sp. nov., an acetogenic bacterium isolated from aggregated forest soil // Int. J. Syst. Bacteriol. 1997. V. 47. P. 352–358.
- Kurth J.M., Nobu M.K., Tamaki H., de Jonge N., Berger S., Jetten M.S.M., Yamamoto K., Mayumi D., Sakata S., Bai L., Cheng L., Nielsen J.L., Kamagata Y., Wagner T., Welte C.U. Methanogenic archaea use a bacteria-like methyltransferase system to demethoxylate aromatic compounds // ISME J. 2021. V. 15. P. 3549–3565.
- Kurth J.M., Op den Camp H.J.M., Welte C.U. Several ways one goal-methanogenesis from unconventional substrates // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2020. V. 104. P. 6839–6854.
- Küsel K., Dorsch T., Acker G., Stackebrandt E., Drake H.L. *Clostridium scatologenes* strain SL1 isolated as an acetogenic bacterium from acidic sediments // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2000. V. 50. P. 537–546.
- Lechtenfeld M., Heine J., Sameith J., Kremp F., Müller V. Glycine betaine metabolism in the acetogenic bacterium *Acetobacterium woodii* // Environ. Microbiol. 2018. V. 20. P. 4512–4525.
- Lehmann J., Kleber M. The contentious nature of soil organic matter // Nature. 2015. V. 528. P. 60–68.
- Libes S.M. The origin of petroleum in the marine environment // Introduction to Marine Biogeochemistry. Amsterdam: Elsevier Science, 2009. P. 1–33.
- Liesack W., Back F., Kreft J.U., Stackebrandt E. *Holophaga foetida* gen. nov., sp. nov., a new homoacetogenic bacterium degrading methoxylated aromatic compounds // Arch. Microbiol. 1994. V. 162. P. 85–90.
- Lloyd M.K., Trembath-Reichert E., Dawson K.S., Feakins S.J., Mastalerz M., Orphan V.J., Sessions A.L., Eiler J.M. Methoxyl stable isotopic constraints on the origins and limits of coal-bed methane // Science. 2021. V. 374. P. 894–897.
- Löffler C., Kuntze K., Vazquez J.R., Rugor A., Kung J.W., Böttcher A., Boll M. Occurrence, genes and expression of the W/Se-containing class II benzoyl-coenzyme A reductases in anaerobic bacteria // Environ. Microbiol. 2011. V. 13. P. 696–709.
- Löffler F.E., Yan J., Ritalahti K.M., Adrian L., Edwards E.A., Konstantinidis K.T., Müller J.A., Fullerton H., Zinder S.H., Spormann A.M. *Dehalococcoides mccartyi* gen. nov., sp. nov., obligately organohalide-respiring anaerobic bacteria relevant to halogen cycling and bioremediation, belong to a novel bacterial class, *Dehalococcoidia* classis nov., order *Dehalococcoidales* ord. nov. and family *Dehalococcoidaceae* fam. nov., within the phylum *Chloroflexi* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2013. V. 63. P. 625–635.
- Lomans B.P., Leijdekkers P., Wesselink J.-J., Bakkes P., Pol A., van der Drift C., Op den Camp H.J.M. Obligate sulfide-dependent degradation of methoxylated aromatic compounds and formation of methanethiol and dimethyl sulfide by a freshwater sediment isolate, *Parasporobacterium paucivorans* gen. nov., sp. nov. // Appl. Environ. Microbiol. 2001. V. 67. P. 4017–4023.
- Lomans B.P., Op den Camp H.J., Pol A., van der Drift C., Vogels G.D. Role of methanogens and other bacteria in degradation of dimethyl sulfide and methanethiol in anoxic freshwater sediments // Appl. Environ. Microbiol. 1999. V. 65. P. 2116–2121.
- Lomans B.P., van der Drift C., Pol A., Op den Camp H.J. Microbial cycling of volatile organic sulfur compounds // Cell. Mol. Life Sci. 2002. V. 59. P. 575–588.
- López Barragán M.J., Carmona M., Zamarro M.T., Thiele B., Boll M., Fuchs G., García J.L., Díaz E. The *bzd* gene cluster, coding for anaerobic benzoate catabolism, in *Azoarcus* sp. strain CIB // J. Bacteriol. 2004. V. 186. P. 5762–5774.
- Lorowitz W.H., Bryant M.P. *Peptostreptococcus productus* strain that grows rapidly with CO as the energy source // Appl. Environ. Microbiol. 1984. V. 47. P. 961–964.
- Lu P., Huang H., Sun Y., Qiang M., Zhu Y., Cao M., Peng X., Yuan B., Feng Z. Biodegradation of 4-hydroxybenzoic acid by *Acinetobacter johnsonii* FZ-5 and *Klebsiella oxytoca* FZ-8 under anaerobic conditions // Biodegradation. 2022. V. 33. P. 17–31.
- Lux M.F., Drake H.L. Re-examination of the metabolic potentials of the acetogens *Clostridium aceticum* and *Clostridium formicoaceticum*: chemolithoautotrophic and aromatic-dependent growth // FEMS Microbiol. Lett. 1992. V. 95. P. 49–56.
- Masai E., Katayama Y., Fukuda M. Genetic and biochemical investigations on bacterial catabolic pathways for lignin derived aromatic compounds // Biosci. Biotechnol. Biochem. 2007. V. 71. 1e15.

- Mayumi D., Mochimaru H., Tamaki H., Yamamoto K., Yoshioka H., Suzuki Y., Kamagata Y., Sakata S. Methane production from coal by a single methanogen // Science. 2016. V. 354. P. 222–225.
- Mechichi T., Labat M., Garcia J.-L., Thomas P., Pate B.K.C. *Sporobacterium olearium* gen. nov., sp. nov., a new methanethiol-producing bacterium that degrades aromatic compounds, isolated from an olive mill wastewater treatment digester // Int. J. Syst. Bacteriol. 1999a. V. 49. P. 1741–1748.
- Mechichi T., Labat M., Patel B.K., Woo T.H., Thomas P., Garcia J.L. *Clostridium methoxybenzovorans* sp. nov., a new aromatic o-demethylating homoacetogen from an olive mill wastewater treatment digester // Int. J. Syst. Bacteriol. 1999b. V. 49. P. 1201–1209.
- Mingo F.S., Studenik S., Diekert G. Conversion of phenyl methyl ethers by *Desulfotobacterium* spp. and screening for the genes involved // FEMS Microbiol. Ecol. 2014. V. 90. P. 783–790.
- Möller B., Oßmer R., Howard B.H., Gottschalk G., Hippe H. *Sporomusa*, a new genus of gram-negative anaerobic bacteria including *Sporomusa sphaeroides* spec. nov. and *Sporomusa ovata* spec. nov. // Arch. Microbiol. 1984. V. 139. P. 388–396.
- Mountfort D.O., Grant W.D., Clarke R., Asher R. *Eubacterium callanderi* sp. nov. that demethoxylates *O*-methoxylated aromatic acids to volatile fatty acids // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 1988. V. 38. P. 254–258.
- Naidu D., Ragsdale S.W. Characterization of a three-component vanillate *O*-demethylase from *Moorella thermoacetica* // J. Bacteriol. 2001. V. 183. P. 3276–3281.
- Oshlag J.Z., Ma Y., Morse K., Burger B.T., Lemke R.A., Karlen S.D., Myers K.S., Donohue T.J., Noguera D.R. Anaerobic degradation of syringic acid by an adapted strain of *Rhodospseudomonas palustris* // Appl. Environ. Microbiol. 2020. V. 86. e01888–19.
- Paarup M., Friedrich M.W., Tindall B.J., Finster K. Characterization of the psychrotolerant acetogen strain SyrA5 and the emended description of the species *Acetobacterium carbinolicum* // Antonie Van Leeuwenhoek. Int. J. 2006. V. 89. P. 55–69.
- Parekh M., Keith E.S., Daniel S.L., Drake H.L. Comparative evaluation of the metabolic potentials of different strains of *Peptostreptococcus productus*: utilization and transformation of aromatic compounds // FEMS Microbiol. Lett. 1992. V. 73. P. 69–74.
- Pierce E., Xie G., Barabote R.D., Saunders E., Han C.S., Detter J.C., Richardson P., Brettin T.S., Das A., Ljungdahl L.G., Ragsdale S.W. The complete genome sequence of *Moorella thermoacetica* (f. *Clostridium thermoaceticum*) // Environ. Microbiol. 2008. V. 10. P. 2550–2573.
- Ragsdale S.W. Catalysis of methyl group transfers involving tetrahydrofolate and B₁₂ // Vitam. Horm. 2008. V. 79. P. 293–324.
- Reichenbecher W., Schink B. *Desulfovibrio inopinatus*, sp. nov., a new sulfate-reducing bacterium that degrades hydroxyhydroquinone // Arch. Microbiol. 1997. V. 168. P. 338–344.
- Ritter D., Vinson D., Barnhart E., Akob D.M., Fields M.W., Cunningham A.B., Orem W., McIntosh J.C. Enhanced microbial coalbed methane generation: a review of research, commercial activity, and remaining challenges // Int. J. Coal. Geol. 2015. V. 146. P. 28–41.
- Rosazza J.P., Huang Z., Dostal L., Volm T., Rousseau B. Review: biocatalytic transformations of ferulic acid: an abundant aromatic natural product // J. Ind. Microbiol. 1995. V. 15. P. 457–471.
- Sakamoto S., Nobu M.K., Mayumi D., Tamazawa S., Kusada H., Yonebayashi H., Iwama H., Ikarashi M., Wakayaäma T., Maeda H., Sakata S., Tamura T., Nomura N., Kamagata Y., Tamaki H. *Koleobacter methoxysyntrophicus* gen. nov., sp. nov., a novel anaerobic bacterium isolated from deep subsurface oil field and proposal of *Koleobacteraceae* fam. nov. and *Koleobacterales* ord. nov. within the class *Clostridia* of the phylum *Firmicutes* // Syst. Appl. Microbiol. 2021. V. 44. Art. 126154.
- Sanford R.A., Cole J.R., Löffler F.E., Tiedje J.M. Characterization of *Desulfotobacterium chlororespirans* sp. nov., which grows by coupling the oxidation of lactate to the reductive dechlorination of 3-chloro-4-hydroxybenzoate // Appl. Environ. Microbiol. 1996. V. 62. P. 3800–3808.
- Schilhabel A., Studenik S., Vödisch M., Kreher S., Schlott B., Pierik A.J., Diekert G. The ether-cleaving methyltransferase system of the strict anaerobe *Acetobacterium dehalogenans*: analysis and expression of the encoding genes // J. Bacteriol. 2009. V. 191. P. 588–599.
- Schink B., Philipp B., Müller J. Anaerobic degradation of phenolic compounds // Naturwissenschaften. 2000. V. 87. P. 12–23.
- Schmid G., Auerbach H., Pierik A.J., Schünemann V., Boll M. ATP-dependent electron activation module of benzoyl-coenzyme A reductase from the hyperthermophilic archaeon *Ferroplasma placidus* // Biochemistry. 2016. V. 55. P. 5578–5586.
- Siebert A., Schubert T., Engelmann T., Studenik S., Diekert G. Veratrol-*O*-demethylase of *Acetobacterium dehalogenans*: ATP-dependent reduction of the corrinoid protein // Arch. Microbiol. 2005. V. 183. P. 378–384.
- Sjuts H., Dunstan M.S., Fisher K., Leys D. Structure of the cobalamin-binding protein of a putative *O*-demethylase from *Desulfotobacterium hafniense* DCB-2 // Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. 2013. V. 69. P. 1609–1616.
- Sjuts H., Dunstan M.S., Fisher K., Leys D. Structures of the methyltransferase component of *Desulfotobacterium hafniense* DCB-2 *O*-demethylase shed light on methyltetrahydrofolate formation // Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. 2015. V. 71. P. 1900–1908.
- Stackebrandt E., Sproer C., Rainey F.A., Burghardt J., Päuker O., Hippe H. Phylogenetic analysis of the genus *Desulfotomaculum*: evidence for the misclassification of *Desulfotomaculum guttoideum* and description of *Desulfotomaculum orientis* as *Desulfosporosinus orientis* gen. nov., comb. nov. // Int. J. Syst. Bacteriol. 1997. V. 47. P. 1134–1139.
- Studenik S., Kreher S., Diekert G. The ether-cleaving methyltransferase of the strict anaerobe *Acetobacterium dehalogenans*: analysis of the zinc-binding site // FEMS Microbiol. Lett. 2011. V. 318. P. 131–136.
- Studenik S., Vogel M., Diekert G. Characterization of an *O*-demethylase of *Desulfotobacterium hafniense* DCB-2 // J. Bacteriol. 2012. V. 194. P. 3317–3326.
- Stupperich E., Konle R. Corrinoid-dependent methyl transfer reactions are involved in methanol and 3,4-dimethoxybenzoate metabolism by *Sporomusa ovata* // Appl. Environ. Microbiol. 1993. V. 59. P. 3110–3116.

- Stupperich E., Konle R., Eckerskorn C.* Anaerobic *O*-demethylations of methoxynaphthols, methoxyfuran, and fluoroanisols by *Sporotomusa ovata* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996. V. 223. P. 770–777.
- Subramanian M., Tuckey J., Patel B., Jensen P.J.* Engineering dicamba selectivity in crops: a search for appropriate degradative enzyme(s) // *J. Ind. Microbiol. Biotech.* 1997. V. 19. P. 344–349.
- Tanaka K., Pfennig N.* Fermentation of 2-methoxyethanol by *Acetobacterium malicum* sp. nov. and *Pelobacter venetianus* // *Arch. Microbiol.* 1988. V. 149. P. 181–187.
- Taylor B.F.* Aerobic and anaerobic catabolism of vanillic acid and some other methoxy-aromatic compounds by *Pseudomonas* sp. strain PN-1 // *Appl. Environ. Microbiol.* 1983. V. 46. P. 1286–1292.
- Tasaki M., Kamagata Y., Nakamura K., Mikami E.* Utilization of methoxylated benzoates and formation of intermediates by *Desulfotomaculum thermobenzoicum* in the presence or absence of sulfate // *Arch. Microbiol.* 1992. V. 157. P. 209–212.
- Trauneker J., Preuß A., Diekert G.* Isolation and characterization of a methyl chloride utilizing, strictly anaerobic bacterium // *Arch. Microbiol.* 1991. V. 156. Art. 4162421.
- Utkin I., Woese C., Wiegel J.* Isolation and characterization of *Desulfitobacterium dehalogenans* gen. nov., sp. nov., an anaerobic bacterium which reductively dechlorinates chlorophenolic compounds // *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1994. V. 44. P. 612–619.
- Vanholme R., Demedts B., Morreel K., Ralph J., Boerjan W.* Lignin biosynthesis and structure // *Plant Physiol.* 2010. V. 153. P. 895–905.
- Venkatesagowda B., Dekker R.F.H.* Microbial demethylation of lignin: Evidence of enzymes participating in the removal of methyl/methoxyl groups // *Enzyme Microb. Technol.* 2021. V. 147. Art. 109780.
- Wang S., Chen Y., Cao Q., Lou H.* Long-lasting gene conversion shapes the convergent evolution of the critical methanogenesis genes // *G3.* 2015. V. 5. P. 2475–2486.
- Welte C.U.* A microbial route from coal to gas // *Science.* 2016. V. 354. P. 184.
- Welte C.U., de Graaf R., Dalcin Martins P., Jansen R.S., Jetten M.S.M., Kurth J.M.* A novel methoxydotrophic metabolism discovered in the hyperthermophilic archaeon *Archaeoglobus fulgidus* // *Environ. Microbiol.* 2021. V. 23. P. 4017–4033.
- Wischgoll S., Heintz D., Peters F., Erxleben A., Sarnighausen E., Reski R., Van Dorsselaer A., Boll M.* Gene clusters involved in anaerobic benzoate degradation of *Geobacter metallireducens* // *Mol. Microbiol.* 2005. V. 58. P. 1238–1252.
- Wright G.E., Madigan M.T.* Photocatabolism of aromatic compounds by the phototrophic purple bacterium *Rhodomicrobium vannielii* // *Appl. Environ. Microbiol.* 1991. V. 57. P. 2069–2073.
- Yin X., Cai M., Liu Y., Zhou G., Aromokeye D.A., Kulkarni A.C., Nimzyk R., Cullhed H., Zhou Z., Pan J., Yang Y., Gu J.D., Elvert M., Li M., Friedrich M.W.* Subgroup level differences of physiological activities in marine *Lokiarchaeota* // *ISME J.* 2020. V. 15. P. 848–861.
- Yu T., Wu W., Liang W., Alexander M., Hinrichs K.U.* Growth of sedimentary *Bathyarchaeota* on lignin as an energy source // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2018. V. 115. P. 6022–6027.
- Zakzeski J.* The catalytic valorization of lignin for the production of renewable chemicals // *Chem. Rev.* 2010. V. 110. P. 3552–3599.
- Zeikus J.G.* Lignin metabolism and the carbon cycle // *Advances in Microbial Ecology* / Eds. Alexander M. Boston (MA): Springer, 1981. P. 211–243.
- Zeikus J.G., Lynd L.H., Thompson T.E., Krzycki J.A., Weimer P.J., Hegge P.W.* Isolation and characterization of a new, methylotrophic, acidogenic anaerobe, the marburg strain // *Curr. Microbiol.* 1980. V. 3. P. 381–386.

Transformation of Methoxylated Aromatic Compounds by Anaerobic Microorganisms

M. A. Khomyakova^{1, *} and A. I. Slobodkin¹

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

*e-mail: mary_klimova@mail.ru

Received September 26, 2022; revised October 11, 2022; accepted October 12, 2022

Abstract—Methoxylated aromatic compounds (MAC) are widely distributed in various habitats and are components of lignin, the second most abundant biopolymer on Earth. This review summarizes the results on microbiology, ecology, and biochemistry of anaerobic MAC catabolism in bacteria and archaea. We analyzed the genomes of 46 prokaryotes anaerobically degrading MAC for the presence of *O*-demethylase, CO-dehydrogenase/acetyl-CoA synthase, and benzoyl-CoA reductase genes, which determine the possibility of methoxydotrophic growth. It was found that facultative anaerobes of the phylum *Pseudomonadota* do not have any known genetic determinants of anaerobic *O*-demethylase reaction as well as of aromatic ring reduction. Thus, the MAC transformation by anaerobic microorganisms can be carried out by diverse biochemical mechanisms and probably plays a more significant role in the global carbon cycle than previously supposed.

Keywords: anaerobic microorganisms, aromatic compounds, lignin, *O*-demethylase, acetogens, methoxydotrophic methanogenesis

НОВАЯ МЕТАНОБРАЗУЮЩАЯ ВОДОРОДИСПОЛЬЗУЮЩАЯ АРХЕЯ ИЗ МНОГОЛЕТНЕМЕРЗЛЫХ ОТЛОЖЕНИЙ О. ЗАПАДНЫЙ ШПИЦБЕРГЕН

© 2023 г. В. Э. Трубицын^а, *, Н. Е. Сузина^а, Е. М. Ривкина^б, В. А. Щербакова^а

^аИнститут биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина, ФИЦ “Пушчинский научный центр биологических исследований Российской академии наук”, Пушкино, 142290 Россия

^бИнститут физико-химических и биологических проблем почвоведения, ФИЦ “Пушчинский научный центр биологических исследований Российской академии наук”, Пушкино, 142290 Россия

*e-mail: lichoradkin43@gmail.com

Поступила в редакцию 05.09.2022 г.

После доработки 26.10.2022 г.

Принята к публикации 27.10.2022 г.

Из образца многолетнемерзлых отложений о. Западный Шпицберген выделен новый штамм метанобразующих архей, названный нами VT^T. Клетки штамма представлены изогнутыми неподвижными палочками размером 2.7–5.3 × 0.3 мкм. Оптимальными условиями для роста были температура 20°C, pH 6.6, содержание NaCl 0.03–0.05 М. Единственным используемым субстратом являлась газовая смесь H₂/CO₂. В присутствии H₂/CO₂ рост стимулировался добавлением дрожжевого экстракта и жидкости рубца. По результатам филогенетического анализа последовательностей гена 16S рРНК штамм VT^T отнесен к роду *Methanobacterium* с ближайшим родственником *M. lacus 17A1^T* (сходство 97.02%). Сравнение секвенированного и собранного генома штамма VT^T с геномами других видов рода подтвердило эти данные, а также показало их отличия на видовом уровне. По результатам проведенных исследований мы полагаем, что выделенный нами метаноген является представителем нового вида метанобразующих архей, для которого предложено название *Methanobacterium spitsbergense* sp. nov. с типовым штаммом VT^T (=VKM В-3566^T = JCM 39284^T).

Ключевые слова: метанобразующие археи, *Methanobacterium spitsbergense*, Западный Шпицберген, многолетнемерзлые отложения, филогенетический анализ, секвенирование генома

DOI: 10.31857/S002636562260064X, EDN: ATFLJN

Метанобразующие археи – это таксономически разнородные хемолитоавтотрофные облигатно анаэробные микроорганизмы, получающие энергию в процессе метаногенеза. Эта небольшая полифилетическая группа ответственна за продукцию большей части биогенного метана на планете. Культивируемые и некультивируемые представители этой группы прокариот распространены почти во всех известных биотопах и могут составлять до половины организмов сообществ экстремальных местообитаний (Кадников и соавт., 2017; Vishivetskaia et al., 2018). Они играют ключевую роль в анаэробном разложении биомассы и глобальном углеродном цикле Земли, в том числе, в постоянно холодных местах обитания (Каллистова и соавт., 2017).

Многолетнемерзлые отложения (ММО) содержат в себе, по разным оценкам, от 25 до 50% мирового пула углерода, при их таянии активизируются процессы образования метана, увеличивается его эмиссия в атмосферу, что вносит до-

полнительный вклад в глобальное потепление (Hugelius et al., 2014; Schuur et al., 2015).

Биология микроорганизмов – обитателей вечной мерзлоты – остается относительно неисследованной, однако недавние находки показывают, что метаногенные сообщества в этой экстремальной среде включают в себя представителей наиболее распространенных родов метаногенных архей с общей биомассой, сопоставимой с почвенными экосистемами умеренного климата (Wagner, Liepner, 2010). В ММО были обнаружены гены представителей порядков *Methanobacteriales*, *Methanopyrales*, *Methanomicrobiales*, *Methanococcales* и *Methanosarcinales* (Garcia et al., 2000; Hultman et al., 2015; Shcherbakova et al., 2016; Rivkina et al., 2016).

ДНК, выделяемая из мерзлых почв и ММО, по большей части, принадлежит некультивируемым представителям микробных сообществ, и количество выделенных чистых культур остается достаточно скромным. Из ММО выделены всего три новых вида: *Methanobacterium arcticum* M2^T (Shcherbakova

et al., 2011), *Methanobacterium veterum* МК4^T (Krivushin et al., 2010) и *Methanosarcina soligelidi* SMA-21^T (Wagner et al., 2013), а также новые штаммы уже известных видов *Methanosarcina mazei* JL01 (Oshurkova et al., 2020), *Methanosarcina mazei* МТ (Simankova et al., 2003). Таким образом, микроорганизмы вечной мерзлоты остаются крайне мало изученными, и потенциал поиска в ней новых видов и штаммов метанобразующих архей далеко не исчерпан.

Архипелаг Шпицберген представляет собой уникальный объект с ММО, расположенный на границе Арктики и Атлантического океана. Около 60% суши покрыто ледниками, но остальная территория содержит самую большую площадь ММО в Европе за пределами России. В отличие от других регионов с обширными площадями ММО, таких как Сибирь и Северная Аляска, вечная мерзлота на Шпицбергене, предположительно, имеет молодой возраст (голоцен), особенно в низкогорных районах вокруг центрального острова Шпицберген (Humlum et al., 2003).

Несмотря на постоянные отрицательные температуры (от -2.6 до -1.7°C), в ММО Шпицбергена обнаружена микробная активность и определена скорость сульфатредукции (Knoblauch et al., 1999), сравнимая с таковой в отложениях умеренных широт. Однако изучение биогеохимических процессов, в основном, ограничивалось экосистемами фьордов, торфяников и почв (Buongiorno et al., 2019; Jørgensen et al., 2021). Исследованию микробных сообществ ММО архипелага Шпицберген посвящено лишь несколько работ (Hansen et al., 2007; Singh et al., 2017; Xue et al., 2020).

Ранее нами в процессе микробиологического исследования проб мерзлых отложений о. Западный Шпицберген, отобранных вблизи пос. Баренцбург, была определена численность культивируемых аэробных и анаэробных микроорганизмов, выделены 60 штаммов психрофильных и психротолерантных бактерий. Впервые в исследованных образцах ММО было обнаружено присутствие метаногенных архей и бактерий, образующих ацетат из H_2 и CO_2 (Трубицын и соавт., 2019).

Целью данной работы было исследование морфологических, физиологических, филогенетических и геномных характеристик нового водород-использующего штамма VT^T, выделенного из образца многолетнемерзлых пород о. Западный Шпицберген и описание нового вида метанобразующих архей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Отбор проб и хранение образцов. Образцы многолетнемерзлых отложений были отобраны в 2016 г. вблизи пос. Баренцбург на побережье Гринфьорда сотрудниками лаборатории криологии почв Инсти-

тута физико-химических и биологических проблем почвоведения ПНЦБИ РАН. Геологическое описание района исследования проведено сотрудником ИФХиБПП РАН Н.Э. Демидовым (Демидов и соавт., 2016). Предварительный газовый анализ показал, что в некоторых образцах присутствовали следовые количества метана, что указывало на возможное наличие метанобразующих архей.

Получение чистой культуры. Накопительная культура с метаногенной активностью была получена при 20°C из образца, отобранного из скважины 3 ($78^{\circ}01'48''\text{ N}$, $14^{\circ}19'25''\text{ E}$) с глубины 1.5 м (Трубицын и соавт., 2019). Для этого использовали среду DSMZ 141 с добавлением формиата и H_2/CO_2 . Культивирование проводили с использованием техники Хангейта (Hungate, 1969). Чистая культура штамма VT^T выделена при использовании метода десятикратных разведений с антибиотиками (ванкомицином и стрептомицином, 0.5 и 0.2 мг/мл соответственно).

Культивирование. Для культивирования штамма VT^T была использована среда следующего состава (г/л): $\text{KCl} - 0.03$, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O} - 0.4$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0.345$, $\text{NH}_4\text{Cl} - 0.025$, $\text{K}_2\text{HPO}_4 - 0.014$, $\text{CaCl}_2 - 0.14$ мл 10% р-ра, $\text{NaCl} - 0.2$, $\text{NH}_2\text{CO}_3 - 0.5$, дрожжевой экстракт $- 0.2$, триптиказа $- 0.2$, раствор резазурина $- 1$ мл 0.2% р-ра, раствор витаминов по Волину $- 10$ мл, раствор микроэлементов $- 10$ мл.

Раствор микроэлементов включал в себя (г/л): нитрилотриуксусную кислоту $- 1.5$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 3$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O} - 0.5$, $\text{NaCl} - 1$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0.1$, $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0.18$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O} - 0.1$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0.18$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} - 0.01$, $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O} - 0.02$, $\text{H}_3\text{BO}_3 - 0.01$, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} - 0.01$, $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O} - 0.03$, $\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O} - 0.3$ мг, $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} - 0.4$ мг.

Состав раствора витаминов (мг/л): биотин $- 2$, фолиевая кислота $- 2$, пиридоксин- $\text{HCl} - 10$, тиамин- $\text{HCl} - 5$, рибофлавин $- 5$, никотиновая кислота $- 5$, Са-D-пантотенат $- 5$, витамин $\text{B}_{12} - 0.1$, *p*-аминобензойная кислота $- 5$, α -липоевая кислота $- 5$.

Приготовление и разлив среды осуществляли под током газовой смеси Ag/CO_2 (при соотношении газов 3 : 1). Восстановитель готовили по стандартной методике (Bryant, Boone, 1987) и добавляли перед посевом из расчета 0.2 мл на 10 мл питательной среды. Субстрат (смесь H_2/CO_2 в соотношении 4 : 1) подавали через бактериальный фильтр во флаконы или пробирки Хангейта после инокуляции среды, создавая давление 1–1.5 атм.

Для получения колоний на питательных средах использовали описанную выше среду с добавлением 1.5% (в/в) агара и метод вращающихся пробирок (Hungate, 1969).

Определение чистоты культуры. Для определения чистоты полученных культур использовали разбавленный триптиказо-соевый бульон 1/4TSB (“Difco”) или стандартные среды с добавлением смеси глюкозы (10%) и пептона (10%) в объеме 0.1 мл на 10 мл среды. Чистоту культур определяли визуально под микроскопом.

Микроскопические исследования. Прямое наблюдение за клеточными культурами проводилось в режиме фазового контраста на микроскопе Axiostar PLUS (“Carl Zeiss”, Германия) при увеличении 1000×. Для дифференциального окрашивания клеток использовали метод Грама.

Ультратонкие срезы клеток получали по модифицированному методу Рейнольдса, как было описано ранее (Shcherbakova et al., 2005). Их исследование проводили на трансмиссионном электронном микроскопе JEM 100 (“Jeol”, Япония).

Содержание метана в газовой фазе измеряли на газовом хроматографе Pye Unicam 304 (Великобритания) с пламенно-ионизационным детектором. Для определения была использована стеклянная колонка (длина 1 м, внутренний диаметр 2 мм), заполненная Парапаком Q, 80–100 меш (“Fluka”, Германия). Температура колонки, инжектора и детектора были 90, 150 и 180°C соответственно. Газ-носитель – азот, скорость потока – 20 мл/мин.

Исследования физиологии. Способность штамма использовать для роста различные субстраты исследовали на характерном для гидрогенотрофных метаногенных микроорганизмов ряде субстратов. Жидкие субстраты добавляли в среды после стерилизации из стоковых растворов до конечных концентраций 0.1% (об./об.). Газы задували до давления 1 атм. Нейтральный уровень pH в пробах поддерживали с помощью гидрокарбонатного (в случае с субстратами, компонентом которых был углекислый газ) либо фосфатного буферов.

Для исследования влияния температуры культивирования проводили при температурах 0, 10, 20, 28, 36, 45°C. Оптимум pH был определен при использовании K/Na фосфатного буфера в диапазоне pH от 6.3 до 6.8. Исследование зависимости роста штамма VT^T от солености проводилось путем варьирования содержания NaCl в среде культивирования. Результаты учитывались на третьем пересеве культур.

Для проверки стимуляции роста в минеральную питательную среду помимо основного субстрата H₂/CO₂ вносили формиат, ацетат, казаминовые кислоты, дрожжевой экстракт, жидкость рубца, кофермент М (CoM), триптиказный пептон. Жидкость рубца вносили в количестве 20 мл/л, конечная концентрация остальных стимулирующих веществ в пробах составляла 0.1% (об./об.). Стимулирующий эффект устанавливали во втором посеве на основании сравнения с контрольной пробой, растущей без добавок.

Для определения устойчивости использовали антибиотики различной химической природы в следующих конечных концентрациях: амикацин – 0.001 мг/мл, бацитрацин – 0.005 мг/мл, ванкомицин – 0.5 мг/мл, канамицин – 0.1 мг/мл, метицилин – 1 мг/мл, стрептомицин – 0.2 мг/мл, тетрациклин – 6.25×10^{-5} и эритромицин – 0.05 мг/мл.

Способность клеток штаммов к лизису оценивалась несколькими способами: экспозицией культуры в 1% раствор SDS в течение 10 мин, центрифугированием при 12000 g в течение 5 мин, помещением клеток в гипотонические условия.

Выделение ДНК и анализ генов 16S рРНК и *mcgA*. Клеточную биомассу отбирали в экспоненциальной фазе роста культуры и осаждали на центрифуге при 6000 g. Выделение и очистку хромосомной ДНК проводили по модифицированному методу Мармура (Marmur, 1961).

Аmplификация целевых генов проводилась на амплификаторе Терцик (“ДНК-Технология”, Россия). Суммарный объем реакционной смеси составлял 25 мкл, в ее состав входили следующие компоненты: 1× буфер для *Taq*-полимеразы (“Fermentas”, Литва); 10 нг ДНК-матрицы; 50 мкМ каждого dNTP (“Fermentas”, Литва); 0.25 мкМ каждого праймера.

Для амплификации фрагментов гена 16S рРНК использовали универсальные архейные праймеры 21f (5'-TTCCGGTTGATCCYGCCGGA-3') (DeLong, 1992) и 1378r (5'-TGTGCAAGGAGCAGGGAC-3'). Для амплификации фрагментов гена *mcgA* использовали праймеры MCRF (5'-TAYGAYCAR-ATHTGGYT-3') и MCRR (5'-ACRTTCATNG-CRTARTT-3').

Успешность проведения ПЦР оценивали с помощью горизонтального гель-электрофореза в 1% агарозном геле.

Для переосаждения ДНК использовался раствор следующего состава (мкл): деионизованная вода – 4.7, 5 M CH₃COONa – 1.5, 96% этанол – 43.8. Раствор нагревали до комнатной температуры и добавляли в соотношении 50 мкл на 10 мкл ПЦР-продукта, перемешивали покачиванием и оставляли при комнатной температуре в течение 20 мин. Получившийся осадок отделяли от супернатанта центрифугированием (12000 g, 20 мин), промывали охлажденным 96% этанолом и высушивали. После высыхания ПЦР-продукт растворяли в деионизованной воде.

Полученные фрагменты ДНК были секвенированы в Межинститутском Центре коллективного пользования “Геном” ИМБ РАН с помощью набора реактивов ABI PRISM® BigDyeTM Terminator v. 3.1. Анализ продуктов реакции производился на автоматическом секвенаторе ДНК ABI PRISM 3730 Applied Biosystems. Подготовку ДНК для секвенирования проводили согласно инструкциям по пробоподготовке ЦКП “Геном”.

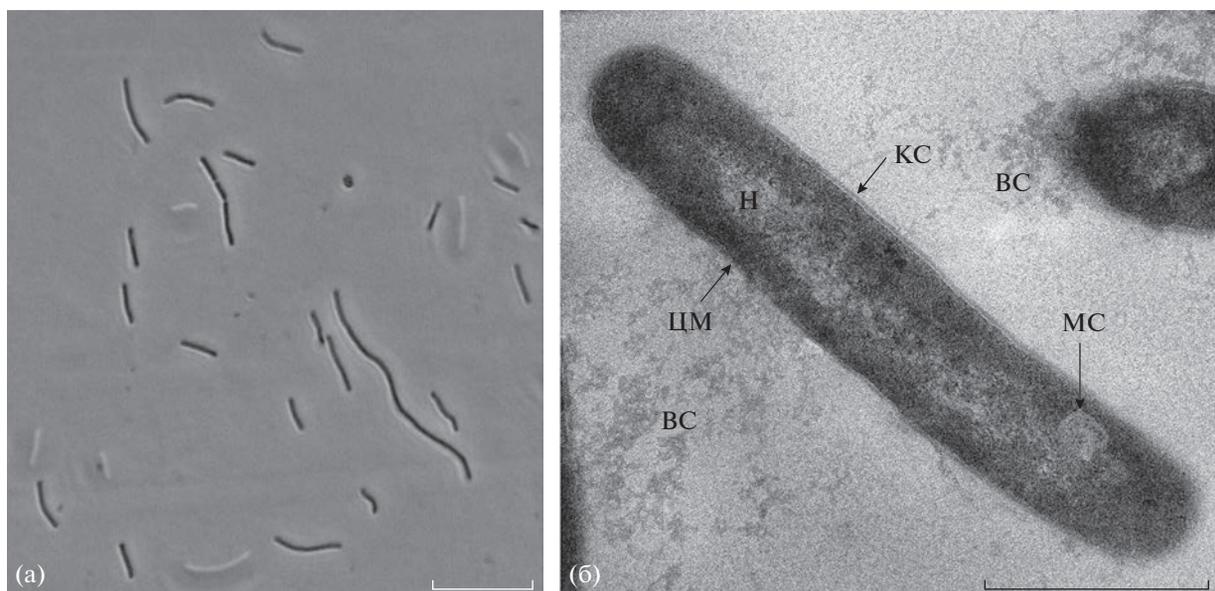


Рис. 1. Микрофотографии клеток штамма VT^T: (а) — фазово-контрастная микроскопия, видны делящиеся клетки с перетяжкой; (б) — ультратонкий срез клетки, трансмиссионная электронная микроскопия. Обозначения: Н — нуклеоид; ЦМ — цитоплазматическая мембрана; КС — клеточная стенка; МС — мезосомоподобные мембранные структуры; ВС — внеклеточная слизь. Размер масштабной линейки: (а) — 10 мкм; (б) — 0.5 мкм.

Результаты секвенирования обрабатывали с помощью пакета программ MEGA11. Для выравнивания последовательностей использовали алгоритмы ClustalW и Muscle, для улучшения качества выравнивания использовался алгоритм Gblocks. Построение филогенетических деревьев по фрагментам генов проводили тремя методами: Neighbour Joining, Maximum Likelihood и Minimum Evolution. Построенные деревья были подвергнуты тестированию по методам Maximum Composite Likelihood и “Tamura-Nei” с количеством циклов 1000 (“bootstrap”). Вероятность положения более 70% являлась значимой и указывалась у мест расхождения ветвей. Полученные последовательности 16S рРНК и *mcrA* депонированы в базе данных NCBI под номерами OK037044 и OM927980 соответственно.

Сравнительный геномный анализ. Сборку и анализ генома проводили на сервере Kbase, как было описано ранее (Trubitsyn et al., 2022). Геном и библиотеки ридов были депонированы в базе данных NCBI под номерами GCA_019931065.1 и SRA SRX12179610 соответственно.

Для сравнительного анализа полученных сборок вычисляли сравнительные коэффициенты ANI, AAI и DDH. Для подтверждения филогенетического положения и поиска ближайших родственных штаммов использовалась программа GTDBtk. Филогенетические деревья с использованием 49 house-keeping генов были построены в программе SpiecesTree v.2.2.0 (<https://github.com/kbaseapps/SpeciesTreeBuilder>) из набора Kbase с

применением алгоритма Gblocks и метода Maximum Likelihood для построения деревьев.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Морфология, ультраструктурная организация клеток и культуральные свойства. Клетки штамма VT^T представляли собой неподвижные изогнутые палочки размером 2.7–5.3 × 0.3 мкм, растущие одиночно, парно, или формирующие нити из 10–12 палочек (рис. 1а). Деление происходило путем образования перетяжек. По Граму окрашивались отрицательно. Клеточная стенка, как следует из анализа ультратонких срезов, у большинства клеток популяции очень тонкая, иногда ее толщина составляет около 7 нм. Клеточная стенка штамма VT^T структурирована таким образом, что имеет некоторое сходство с наружной мембраной грамотрицательных бактерий, однако при этом не имеет характерных извилистых контуров (рис. 1б). Для клеток этого штамма характерно образование внеклеточной слизи (ВС) и внутрицитоплазматических мезосомоподобных мембранных структур (МС) (рис. 1б). Клеточная стенка была устойчива к лизису в гипотонических условиях, центрифугированию и экспозиции в 0.1% растворе SDS в течение 1 мин.

На жидких питательных средах культура росла с образованием белого мутного осадка. На плотной питательной среде в анаэробных условиях были получены точечные (диаметр 0.4–0.8 мм) беловатые полупрозрачные колонии выпуклой

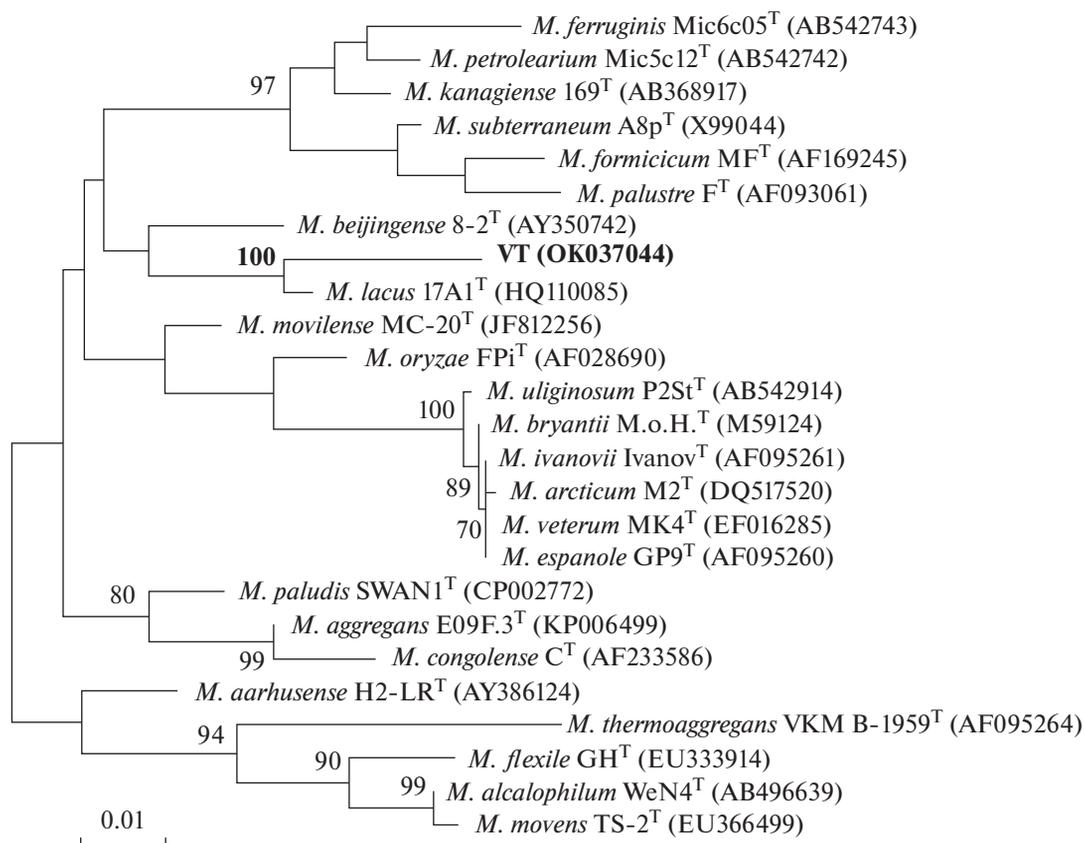


Рис. 2. Филогенетическое бескорневое древо рода *Methanobacterium* с указанием положения нового штамма VT^T, построенное по частичным нуклеотидным последовательностям гена 16S рРНК (1205 п.н.). Построено по алгоритму Maximum Likelihood с повторностью 1000.

формы с ровными краями, гладкие, мягкой консистенции.

Филогенетический анализ. Для определения филогенетического положения штамма были секвенированы частичные нуклеотидные последовательности гена 16S рРНК длиной 1205 п.н. и гена *mcrA* длиной 503 п.н. (транслирована в аминокислотную последовательность длиной 167 а.о.).

Филогенетический анализ показал, что штамм VT^T кластеризуется с представителями рода *Methanobacterium*, ближайшим к нему типовым штаммом является *Methanobacterium lacus* 17A1^T, выделенный из донных осадков пресноводного озера Павин (Borrel et al., 2012), со сходством последовательностей генов 16S рРНК и *mcrA* 97.0 и 97.6% соответственно. Филодендрограммы, построенные тремя различными методами, имели сходную топологию, что подтверждает полученные данные (рис. 2 и 3).

Субстратная специфичность и стимулирующие добавки. *Methanobacterium* sp. VT^T использовал как единственный источник углерода и энергии только газовую смесь H₂/CO₂ и не рос на формиате, метаноле, ацетате, этаноле/CO₂, метаноле/H₂, аце-

тате/H₂, изопропанолe/CO₂ и изобутанолe/CO₂. В присутствии H₂/CO₂ рост стимулировался добавлением дрожжевого экстракта и жидкости рубца. Триптиказа, формиат, казаминовые кислоты и кофермент М оказывали слабый стимулирующий эффект, а ацетат не влиял на рост.

Оптимальные для роста параметры среды. Рост штамма наблюдали в диапазоне от 10 до 37°C. Оптимальный рост отмечался при 20°C. При 0°C и температурах выше 45°C метаногенез не наблюдался. На данный момент это наименьшая оптимальная температура роста, обнаруженная среди представителей рода *Methanobacterium*. Ранее самые низкие оптимальные температуры роста 28 и 30°C были зафиксированы, соответственно, у *M. veterum* MK4^T (Krivushin et al., 2010) и *M. lacus* 17A1^T (Borrel et al., 2012).

Зависимость роста от pH среды была определена на узком диапазоне (от 6.2 до 7.2) с оптимумом при 6.6. Близкие значения оптимумов pH наблюдаются у *M. petrolearium* Mic5c12^T (6.5) и *M. lacus* 17A1^T (6.5), ближайшего типового штамма.

Было показано, что VT^T способен расти на используемой среде без дополнительного внесения

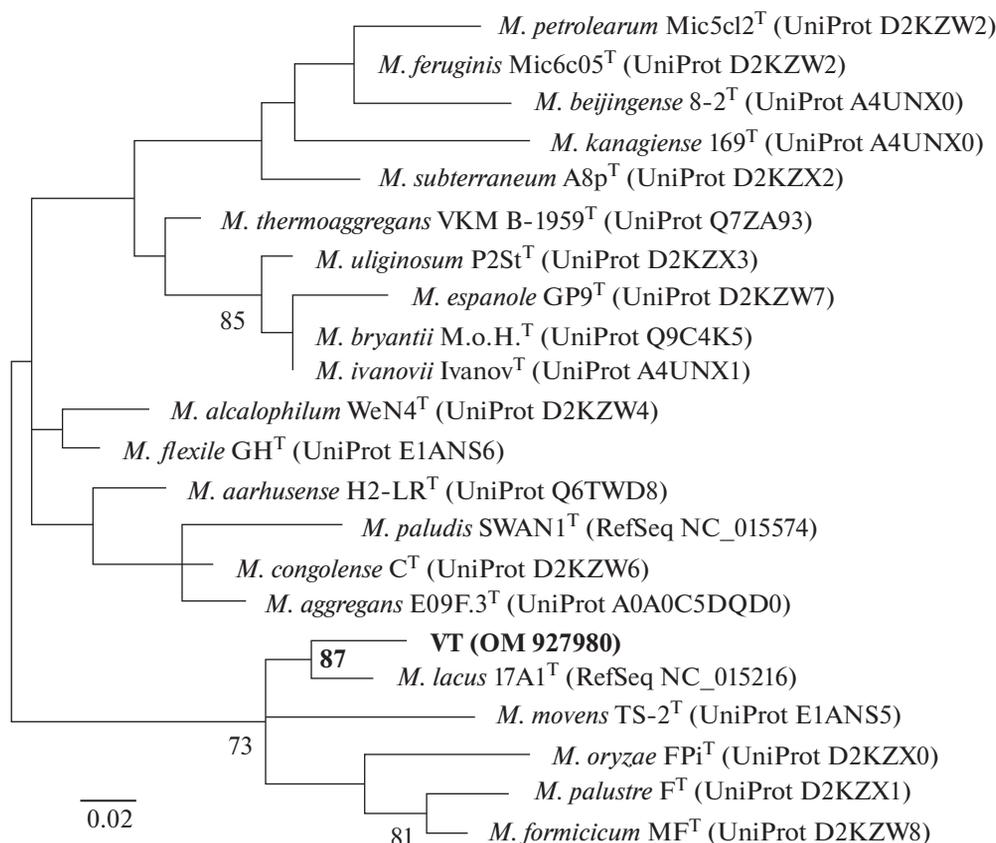


Рис. 3. Филогенетическое бескорневое древо рода *Methanobacterium* с указанием положения нового штамма VT^T, построенное по частичным аминокислотным последовательностям С-концевого домена белка McrA (127 а.о.). Построено по алгоритму Maximum Likelihood с повторностью 1000.

NaCl, максимальная концентрация, при которой происходил рост, составила 0.4 М (25 г/л). Наибольшей скорости роста (0.48 сут⁻¹) штамм достигал при концентрации NaCl 0.03–0.05 М (2–3 г/л).

Чувствительность к антибиотикам. Новый штамм был устойчив к действию метицилина, ванкомицина и стрептомицина. Канамицин и эритромицин вызывали угнетение роста; бацитрацин, амикацин и тетрациклин полностью его ингибировали.

Анализ последовательности генома. Полученная последовательность имела длину 2662706 п.н., включая 600 пропусков, и состояла из 18 скаффолдов (24 контигов) с N50, равным 340628 п.н., и L50, равным 3. Среднее покрытие составило 709.5 ± 147.9 при 87.38% картированных прочтений. В геноме обнаружено 2788 генов, включая 2699 белок-кодирующих последовательностей, 39 псевдогенов, 44 тРНК, 4 рРНК (2 5S, 1 16S, 1 23S) и 2 нкРНК. Коэффициент кодирования составил 82.03%, завершенность генома по CheckM 98.8%, контаминация отсутствовала.

С помощью GTDBtk было показано, что наиболее близким к VT^T является таксономически не

описанный *Methanobacterium* sp. SMA-27 (Serrano et al., 2014), выделенный в 2014 г. из мерзлых почв о-ва Самойловский на побережье моря Лаптевых. Сравнение репрезентативных геномов рода *Methanobacterium* по коэффициентам ANI, AAI, DDH и проценту пар G + C показало, что VT^T намного ближе штамму SMA-27 (табл. 1), чем другим организмам, в том числе используемому в исследованиях вместо типового *M. lacus* AL-21.

При этом значения сравнительных коэффициентов находятся ниже границы межвидовых различий, и новый штамм не может быть отнесен к какому-либо из представленных в табл. 1 видов. Это наглядно видно по филогенетическому дереву, построенному на основе сравнения отдельных групп house-keeping генов (рис. 4).

Фенотипическое сравнение. Штамм VT^T физиологически отличается от типовых штаммов ближайших видов, в том числе *M. lacus* 17A1^T (табл. 2). Он более холодолюбив, использует как единственный источник углерода и энергии только смесь H₂/CO₂. В отличие от *M. lacus* 17A1^T, его рост может стимулироваться дрожжевым экс-

Таблица 1. Сравнение геномов штамма VT^T и представителей рода *Methanobacterium*

Геномы (размеры, п.н.)	Завершенность	ANI*, %	AAI*, %	DDH*, %	G + C, %
Штамм VT ^T (2662706)	Скаффолды	—	—	—	32.53
<i>Methanobacterium</i> sp. SMA-27 (2490725)	Полный	95.54	94.32	65.30	32.57
<i>M. lacus</i> AL-21 (2583753)	Полный	73.94	73.24	19.00	35.83
<i>M. paludis</i> SWAN1 ^T (2546541)	Полный	73.10	69.52	20.10	35.73
<i>M. congolense</i> Buetzberg (2469575)	Полный	72.15	68.07	20.40	38.51
<i>M. formicicum</i> Mb9 (2494510)	Полный	69.52	64.30	18.80	41.14
<i>M. subterraneum</i> A8p ^T (2515817)	Полный	69.46	64.44	19.00	39.40
<i>M. arcticum</i> M2 ^T (3393923)	Скаффолды	71.07	63.91	18.30	33.17
<i>M. veterum</i> МК4 ^T (3369555)	Скаффолды	71.07	63.88	18.30	33.21
<i>M. oryzae</i> FPi ^T (2449774)	Скаффолды	71.06	64.89	17.90	31.40
<i>M. bryantii</i> M.o.H. ^T (3466370)	Контиги	71.30	64.33	18.50	33.19
<i>M. aggregans</i> E09F.3 ^T (2347771)	Контиги	72.03	68.44	19.50	38.14
<i>M. petrolearium</i> Mic5c12 ^T (2468550)	Контиги	69.52	64.22	18.30	37.77

* Указанные коэффициенты являются результатом попарного сравнения с геномом штамма VT^T.

трактом и жидкостью рубца, но не ацетатом. Кроме того, оптимальная соленость для VT^T более чем в два раза ниже, чем для 17A1^T.

На основании морфологических, физиологических, генотипических и филогенетических данных можно сделать вывод, что исследуемый

штамм является представителем нового вида рода *Methanobacterium*.

Предложение нового вида метанобразующих архей.
Methanobacterium spitsbergense (shpits.ber.gen' sis., N.L. neut. adj. spitsbergense, относящийся к Шпицбергену).

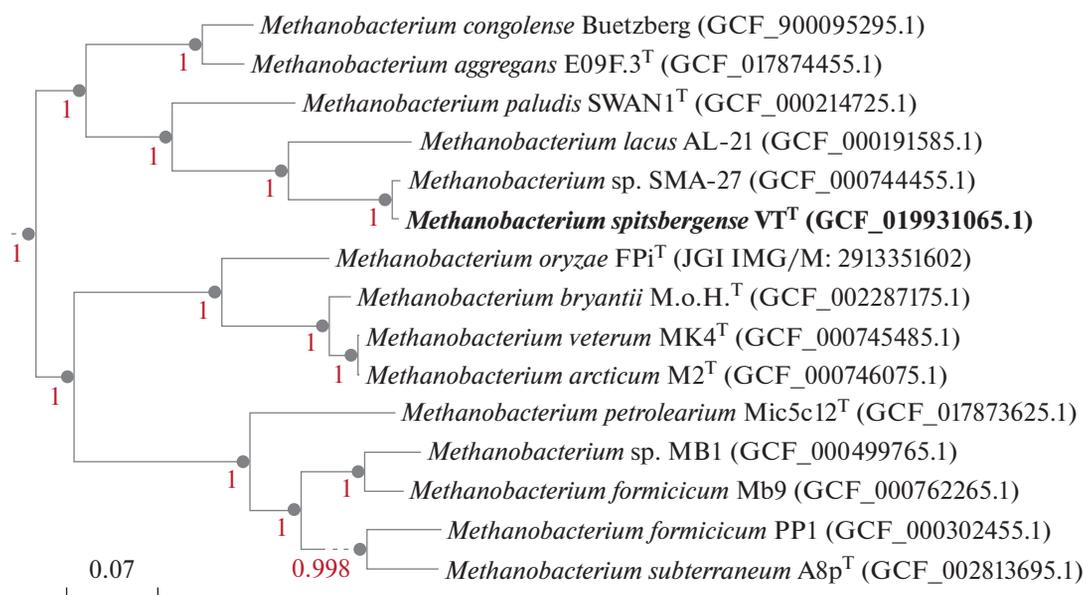


Рис. 4. Филогенетическое дерево рода *Methanobacterium*, построенное на основе сравнения 49 групп генов.

Таблица 2. Сравнение физиологических и морфологических особенностей штамма VГ^T и типовых штаммов близкородственных видов рода *Methanobacterium*

Характеристики	<i>M. spitsbergense</i> VГ ^T	<i>M. lacus</i> 17A1 ^T	<i>M. lacus</i> AL-21	<i>M. beijngense</i> 8-2 ^T	<i>M. paludis</i> F ^T	<i>M. movilense</i> MC-20 ^T
Размеры клеток, мкм	2.7–5.3 × 0.3	2–15 × 0.2–0.4	1.5–35 × 0.45–0.85	3–5 × 0.4–0.5	2–15 × 0.5	3.5–4.0 × 0.6–0.7
Окрашивание по Граму	–	–	–	–	–	–
Температурный диапазон, °С	10–37	14–41	10–37	25–50	16–40	0–44
Температурный оптимум, °С	20	30	32–37	37	32–37	30
Диапазон pH	6.2–6.8	5.0–8.5	4.7–7.1	6.5–8.0	4.8–6.6	6.2–9.9
Оптимум pH	6.6	6.5	6.2	7.2	5.4–5.7	7.4
Соленость среды, М	0–0.4	0–0.4	0–0.06	0–0.5	0–0.25	0.02–0.6
Оптимальная соленость, М	0.03–0.05	0.1	0.05	ND	ND	0.08
Субстраты	Н	Н, МН	Н	Н, F	Н	Н, F, P, B
Стимулирующие добавки	F, YE, K, T, R, C	A, R, YE	A, C	A, YE	A, C	ND
G + C в ДНК, мол. %	32.5 (Gs)	37.0 (HPLC)	35.8 (Gs)	38.9 (Tm)	35.7 (Gs)	33.0 (HPLC)
Источник	Это исследование	Borrel et al., 2012	Cadillo-Quiroz et al., 2014	Ma et al., 2005	Cadillo-Quiroz et al., 2014	Schirmack et al., 2014

Примечание. “–” – отрицательно, “+” – положительно, ND – нет данных, Н – H₂/CO₂, МН – меганол/H₂, F – формил, Р – 2-пропанол, В – 2-бутанол, А – ацетат, YE – дрожжевой экстракт, К – казеиновые кислоты, Т – триптиказный пептон, R – жидкость рубца, C – CoM; определение G + C состава: Gs – геномное секвенирование, HPLC – жидкостная хроматография, Tm – температура плавления.

Клетки представляют собой грамотрицательные, неподвижные, неспорообразующие, изогнутые палочки 0.3 мкм шириной и 2.7–5.3 мкм длиной. Клетки способны формировать нити до 10–12 палочек. На плотной питательной среде растет в виде точечных (0.4–0.8 мм) беловатых полупрозрачных колоний выпуклой формы с ровными краями, гладких, мягкой консистенции. Строгий анаэроб. Хемоавтотроф. Оптимальная температура роста близка к 20°C. Рост не наблюдался при температуре ниже 10°C и выше 36°C. Оптимальное значение pH для роста и метанообразования составляет 6.6 при определенном диапазоне от 6.2 до 7.2. Оптимальная соленость среды составляет 0.03–0.05 М; способен расти без NaCl в среде культивирования. Единственным используемым субстратом является газовая смесь H₂/CO₂, не использует формиат, ацетат, метанол, ацетат/H₂, метанол/H₂, этанол/CO₂, 2-пропанол, 2-бутанол, метиламин. Добавление дрожжевого экстракта и жидкости рубца не требуется, но стимулирует рост. Устойчив к действию метициллина, ванкомицина и стрептомицина. Канамицин и эритромицин ингибируют рост, а бацитрацин, амикацин и тетрациклин полностью его подавляют.

Типовой штамм VT^T (=VKM В-3566^T = JCM 39284^T) выделен из образца многолетнемерзлых отложений, отобранного с глубины 1.5 м вблизи п. Баренцбург на территории о. Западный Шпицберген, Норвегия. Содержание Г + Ц в ДНК типового штамма составляет 32.53 мол. %.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (РФФИ), грант 20-34-90087 и Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2021-1051).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Демидов Н.Э., Караевская Е.С., Веркулич С.Р., Никулина А.Л., Саватюгин Л.М. Первые результаты мерзлотных наблюдений на криосферном полигоне Российского научного центра на архипелаге Шпицберген (РНЦШ) // Проблемы Арктики и Антарктики. 2016. Т. 4. № 110. С. 67–79.
Demidov N.E., Karaevskaya E.S., Verkulich S.R., Nikulina A.L., Savatyugin L.M. First results of permafrost monitoring on

the cryospheric site of Russian Scientific Center on Spitsbergen (RSCS) // Problemy Arktiki i Antarktiki [Arctic and Antarctic Problems]. 2016. V. 4. № 110. P. 67–79 (in Russian).

Кадников В.В., Марданов А.В., Белецкий А.В., Ивасенко Д.А., Пименов Н.В., Карначук О.В., Равин Н.В., Франк Ю.А. Вариабельность состава микробного сообщества резервуара подземных термальных вод в Западной Сибири // Микробиология. 2017. Т. 86. С. 739–747.

Kadnikov V.V., Mardanov A.V., Beletsky A.V., Ivasenko D.A., Pimenov N.V., Karnachuk O.V., Ravin N.V., Frank Y.A. Variability of microbial community composition of the Western Siberia underground thermal waters reservoir // Microbiology (Moscow). 2017. V. 86. P. 765–772.

Каллистова А.Ю., Меркель А.Ю., Тарновецкий И.Ю., Пименов Н.В. Образование и окисление метана прокариотами // Микробиология. 2017. Т. 86. С. 661–683.

Kallistova A.U., Merkel A.U., Tarnovetskiy I.U., Pimenov N.V. Formation and oxidation of methane by prokaryotes // Microbiology (Moscow). 2017. V. 86. P. 671–691.

Трубицын В.Э., Рыжманова Я.В., Захарюк А.Г., Ошуркова В.И., Лауринавичюс К.С., Спирина Е.В., Щербакова В.А., Ривкина Е.М. Разнообразие культивируемых прокариот в образцах многолетнемерзлых отложений острова Западный Шпицберген // Криосфера Земли. 2019. Т. 23. № 6. С. 37–46.

Trubitsyn V.E., Ryzhmanova Y.V., Zaharuk A.G., Oshurkova V.I., Laurinavichius K.S., Spirina E.V., Shcherbakova V.A., Rivkina E.M. Diversity of cultured prokaryotes in permafrost sediment samples of West Spitsbergen Island // Earth's Cryosph. 2019. V. 23. № 6. P. 37–46 (in Russian).

Borrel G., Joblin K., Guedon A., Colombet J., Tardy V., Lehours A.-C., Fonty G. *Methanobacterium lacus* sp. nov., isolated from the profundal sediment of a freshwater meromictic lake // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2012. V. 62. P. 1625–1629.

Bryant M.P., Boone D.R. Emended description of strain MS^T (DSM 800^T), the type strain of *Methanosarcina barkeri* // Int. J. Syst. Bacteriol. 1987. V. 37. P. 169–170.

Buongiorno J., Herbert L.C., Wehrmann L.M., Michaud A.B., Laufer K., Roy H., Jorgensen B.B., Szykiewicz A., Faiia A., Yeager K.M., Schindler K., Lloyd K.G. Complex microbial communities drive iron and sulfur cycling in Arctic fjord sediments // Appl. Environ. Microbiol. 2019. V. 85. e00949-19.

<https://doi.org/10.1128/AEM.00949-19>

Cadillo-Quiroz H., Bräuer S.L., Goodson N., Yavitt J.B., Zinder S.H. *Methanobacterium paludis* sp. nov. and a novel strain of *Methanobacterium lacus* isolated from northern peatlands // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2014. V. 64. P. 1473–1480.

DeLong E.F. Archaea in coastal marine environments // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1992. V. 89. P. 5685–5689.

Garcia J.L., Patel B.K.C., Ollivier B. Taxonomic, phylogenetic, and ecological diversity of methanogenic *Archaea* // Anaerobe. 2000. V. 6. P. 205–226.

Hansen A.A., Herbert R.A., Mikkelsen K., Jensen L.L. Viability, diversity and composition of the bacterial community in a high Arctic permafrost soil from Spitsbergen, Northern Norway // Environ. Microbiol. 2007. V. 9. P. 2870–2884.

Hugelius G., Strauss J., Zubrzycki S., Harden J.W., Schuur E.A.G., Ping C.L., Schirmermeister L., Grosse G., Michaelson G.J.,

- Koven C.D., O'Donnell J.A., Elberling B., Mishra U., Camill P., Yu Z., Palmtag J., Kuhry P. Estimated stocks of circumpolar permafrost carbon with quantified uncertainty ranges and identified data gaps // *Biogeosciences*. 2014. V. 11. P. 6573–6593.
- Hultman J., Waldrop M.P., Mackelprang R., David M.M., McFarland J., Blazewicz S.J., Harden J., Turetsky M.R., McGuire A.D., Shah M.B., VerBerkmoes N.C., Lee L.H., Mavrommatis K., Jansson J.K. Multi-omics of permafrost, active layer and thermokarst bog soil microbiomes // *Nature*. 2015. V. 521. P. 208–212.
- Humlum O., Instanes A., Sollid J.L. Permafrost in Svalbard: A review of research history, climatic background and engineering challenges // *Polar Res*. 2003. V. 22. P. 191–215.
- Hungate R.E. Chapter IV. A roll tube method for cultivation of strict anaerobes // *Methods in Microbiology*. 1969. P. 117–132.
- Jørgensen B.B., Laufer K., Michaud A.B., Wehrmann L.M. Biogeochemistry and microbiology of high Arctic marine sediment ecosystems – case study of Svalbard fjords // *Limnol. Oceanogr*. 2021. V. 66. P. S273–S292.
- Knoblauch C., Jørgensen B.B., Harder J. Community size and metabolic rates of psychrophilic sulfate-reducing bacteria in Arctic marine sediments // *Appl. Environ. Microbiol*. 1999. V. 65. P. 4230–4233.
- Krivushin K.V., Shcherbakova V.A., Petrovskaya L.E., Rivkina E.M. *Methanobacterium veterum* sp. nov., from ancient Siberian permafrost // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. 2010. V. 60. P. 455–459.
- Ma K., Liu X., Dong X. *Methanobacterium beijingense* sp. nov., a novel methanogen isolated from anaerobic digesters // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. 2005. V. 55. P. 325–329.
- Marmur J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms // *J. Mol. Biol*. 1961. V. 3. P. 208–218.
- Oshurkova V., Troshina O., Trubitsyn V., Ryzhmanova Y., Bochkareva O., Shcherbakova V. Characterization of *Methanosarcina mazei* JL01 isolated from holocene arctic permafrost and study of the archaeon cooperation with bacterium *Sphaerochaeta associata* GLS2^T // The 1st International Electronic Conference on Microbiology. Basel Switzerland: MDPI, 2020. P. 4.
- Ran Y., Li X., Cheng G., Zhang T., Wu Q., Jin H., Jin R. Distribution of permafrost in China: An overview of existing permafrost maps // *Permafr. Periglac. Process*. 2012. V. 23. P. 322–333.
- Rivkina E., Petrovskaya L., Vishnivetskaya T., Krivushin K., Shmakova L., Tutukina M., Meyers A., Kondrashov F. Metagenomic analyses of the late Pleistocene permafrost – additional tools for reconstruction of environmental conditions // *Biogeosciences*. 2016. V. 13. P. 2207–2219.
- Schirmack J., Mangelsdorf K., Ganzert L., Sand W., Hillebrand-Voiculescu A., Wagner D. *Methanobacterium movilense* sp. nov., a hydrogenotrophic, secondary-alcohol-utilizing methanogen from the anoxic sediment of a subsurface lake // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. 2014. V. 64. P. 522–527.
- Schuur E.A.G., McGuire A.D., Schädel C., Grosse G., Harden J.W., Hayes D.J., Hugelius G., Koven C.D., Kuhry P., Lawrence D.M., Natali S.M., Olefeldt D., Romanovsky V.E., Schaefer K., Turetsky M.R., Treat C.C., Vonk J.E. Climate change and the permafrost carbon feedback // *Nature*. 2015. V. 520. P. 171–179.
- Serrano P., Hermelink A., Lasch P., de Vera J.-P., König N., Burckhardt O., Wagner D. Confocal Raman microspectroscopy reveals a convergence of the chemical composition in methanogenic archaea from a Siberian permafrost-affected soil // *FEMS Microbiol. Ecol*. 2015. V. 91. fiv126.
- Shcherbakova V., Rivkina E., Pecheritsyna S., Laurinavichius K., Suzina N., Gilichinsky D. *Methanobacterium arcticum* sp. nov., a methanogenic archaeon from Holocene Arctic permafrost // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. 2011. V. 61. P. 144–147.
- Shcherbakova V.A., Chuvilskaya N.A., Rivkina E.M., Pecheritsyna S.A., Laurinavichius K.S., Suzina N.E., Osipov G.A., Lysenko A.M., Gilichinsky D.A., Akimenko V.K. Novel psychrophilic anaerobic spore-forming bacterium from the overcooled water brine in permafrost: description *Clostridium algorithilum* sp. nov. // *Extremophiles*. 2005. V. 9. P. 239–246.
- Simankova M.V., Kotsyurbenko O.R., Lueders T., Nozhevnikova A.N., Wagner B., Conrad R., Friedrich M.W. Isolation and characterization of new strains of methanogens from cold terrestrial habitats // *Syst. Appl. Microbiol*. 2003. V. 26. P. 312–318.
- Singh P., Singh S.M., Singh R.N., Naik S., Roy U., Srivastava A., Bölter M. Bacterial communities in ancient permafrost profiles of Svalbard, Arctic // *J. Basic Microbiol*. 2017. V. 57. P. 1018–1036.
- Trubitsyn V., Rivkina E., Shcherbakova V. Draft genome sequence of a methanogenic archaeon from West Spitsbergen permafrost // *Microbiol. Resour. Announc*. 2022. V. 11. <https://doi.org/10.1128/mra.00938-21>
- Vishnivetskaya T.A., Buongiorno J., Bird J., Krivushin K., Spirina E.V., Oshurkova V., Shcherbakova V.A., Wilson G., Lloyd K.G., Rivkina E.M. Methanogens in the Antarctic Dry Valley permafrost // *FEMS Microbiol. Ecol*. 2018. V. 94. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiy109>
- Wagner D., Liebner S. Methanogenesis in Arctic permafrost habitats // *Handbook of Hydrocarbon Microbiology: Microbial Interactions with Hydrocarbons, Oils, Fats and Related Hydrophobic Substrates and Products. Section B: The Microbiology of Production of Hydrocarbons, Lipids* / Ed. Timmis K.N. Springer, 2010. P. 663–666.
- Wagner D., Schirmack J., Ganzert L., Morozova D., Mangelsdorf K. *Methanosarcina soligelidi* sp. nov., a desiccation- and freeze-thaw-resistant methanogenic archaeon from a Siberian permafrost-affected soil // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. 2013. V. 63. P. 2986–2991.
- Xue Y., Jonassen I., Øvreås L., Taş N. Metagenome-assembled genome distribution and key functionality highlight importance of aerobic metabolism in Svalbard permafrost // *FEMS Microbiol. Ecol*. 2020. V. 96. fiae057.

A New Methanogenic, Hydrogenotrophic Archaeon from Spitsbergen Permafrost

V. E. Trubitsyn^{1,*}, N. E. Suzina¹, E. M. Rivkina², and V. A. Shcherbakova¹

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

²*Institute of Physicochemical and Biological Problems of Agriculture, Pushchino Scientific Center for Biological Research, Russian Academy of Sciences, Pushchino, 142290 Russia*

*e-mail: lichoradkin43@gmail.com

Received September 5, 2022; revised October 26, 2022; accepted October 27, 2022

Abstract—A new strain of methanogenic archaea, designated VT^T, was isolated from a sample of Spitsbergen permafrost. The cells were nonmotile curved rods, 2.7–5.3 × 0.3 μm. The optimal conditions for growth were 20°C, pH 6.6, and NaCl concentrations 0.03–0.05 M. The H₂/CO₂ gas mixture was the only substrate used. In the presence of H₂/CO₂, growth was stimulated by addition of yeast extract or rumen fluid. Phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene sequences indicated that strain VT^T belonged to the genus *Methanobacterium* and was most closely related to *M. lacus 17A1^T* (97.02% similarity). Comparison of the sequenced and assembled genome of strain VT^T with the genomes of other members of this genus confirmed these results and revealed species-level differences. Our results indicate that this methanogenic isolate belongs to a new species of methanogenic archaea, for which the name *Methanobacterium spitsbergense* sp. nov. was proposed, with the type strain VT^T (=VKM B-3566^T = JCM 39284^T).

Keywords: methanogenic archaea, *Methanobacterium spitsbergense*, Spitsbergen, permafrost deposits, phylogenetic analysis, genome sequencing

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИ

МИКРОБНЫЕ ПРОЦЕССЫ ОКИСЛЕНИЯ МЕТАНА В РАЙОНАХ
ГАЗОРАЗВЕДЫВАТЕЛЬНОГО БУРЕНИЯ В КАРСКОМ МОРЕ

© 2023 г. Е. Н. Тихонова^{а, *}, И. И. Русанов^а, В. В. Кадников^а, Е. В. Демкина^а, С. В. Тошаков^б,
А. О. Изотова^б, Н. В. Пименов^а

^аФедеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” РАН, Москва, 119071 Россия

^бКурчатовский геномный центр, НИЦ “Курчатовский институт”, Москва, 123098 Россия

*e-mail: katerina_inmi@mail.ru

Поступила в редакцию 25.10.2022 г.

После доработки 14.11.2022 г.

Принята к публикации 14.11.2022 г.

Исследованы скорости окисления метана и разнообразие метанооксиляющих микроорганизмов в верхних слоях осадков района законсервированных скважин газоразведывательного бурения в Карском море. Анализ последовательностей гена *16S rDNA* выявил микроорганизмы класса *Gamma proteobacteria*, порядка *Methylococcales*. Сходное разнообразие микроорганизмов метанового фильтра показано для всех образцов, его основу составляли метанотрофы, близкие к роду *Methyloprofundus*, и некультивируемые метанотрофные бактерии, обнаруженные ранее в поверхностных отложениях Арктических морей. Молекулярная идентификация метанооксиляющих бактерий в составе такого сообщества с помощью высокопроизводительного секвенирования гена *pmoA*, кодирующего мембранную метанмонооксигеназу, подтверждает сходную структуру метанового фильтра поверхностных осадков, нарушенных в результате бурения, и фоновых районов, находящихся на значительном расстоянии от скважин. Показано, что осадочные отложения вблизи законсервированной скважины, пробуренной менее двух лет назад, имеют характерные признаки метанового сипа, выраженные в повышенном содержании растворенного метана и высоких скоростях его микробного окисления. Скважины, законсервированные более двух лет назад, не обнаруживали признаков высачивания метана, а наблюдаемое количество метанооксиляющих бактерий в непосредственной близости от них находилось ниже уровня детекции.

Ключевые слова: метан, окисление метана, аэробные метанотрофы, Карское море, газоразведывательное бурение, высокопроизводительное секвенирование, антропогенно-нарушенные экосистемы

DOI: 10.31857/S0026365622600705, EDN: AUHNZW

Метан – основной компонент природного газа. Он занимает второе по значимости место среди парниковых газов, уступая лишь углекислому газу. Доля метана в общемировом объеме выбросов парниковых газов составляет 14%. Добыча, транспортировка, переработка нефти и природного газа в совокупности образуют второй по величине источник антропогенного метана, поступающего в атмосферу (<https://www.globalmethane.org>).

Шельф российских арктических морей характеризуется огромными запасами разведанных газовых и нефтяных месторождений, часть из которых активно эксплуатируется в настоящее время.

Карское море является частью Арктического бассейна и играет ведущую роль в формировании среды всей Арктики (Лисицын и соавт., 1994; Мошаров, Мошарова, 2010). Карское море относится к западно-арктическим акваториям, наиболее изученным сейсморазведкой и бурением. Его до-

ля в общей структуре начальных суммарных геологических ресурсов углеводородов арктического шельфа России составляет 39% (Григоренко и соавт., 2006).

Шельф Карского моря включает две существенно отличающиеся по геологическому строению части – южную и северную. Первая – Южно-Карская нефтегазоносная область (НГО) в нефтегазогеологическом отношении является акваториальным продолжением Западно-Сибирской нефтегазоносной провинции, и это является определяющей чертой перспективности региона на присутствие морских месторождений углеводородного сырья (УВС). Здесь около 30 лет назад были открыты два уникальных газоконденсатных месторождения – Русановское и Ленинградское, а в 2019 г. – газоконденсатное месторождение им. В.А. Динкова и крупное газовое – Няремское. Вторая, северная часть, является самостоя-

тельной Северо-Карской перспективной нефтегазонасыщенной областью, на площади которой до настоящего времени не пробурено ни одной скважины (<https://neftegaz.ru>).

Микробиом морей Российской Арктики изучен с помощью молекулярно-генетических методов достаточно хорошо. В бактериальных сообществах донных отложений моря Лаптевых, Карского и Баренцева морей показано доминирование *Proteobacteria* (более 60% всех последовательностей генов 16S рРНК). В большом количестве представлен филум *Bacteroidetes*, составлявший до 26% микробного сообщества. Также широко распространены представители *Firmicutes*, *Chloroflexi*, *Verrucomicrobia* и *Actinobacteria*. Более 20% последовательностей генов 16S рРНК представлено некультивируемыми линиями (Саввичев и соавт., 2018; Savvichev et al., 2018a; Begmatov et al., 2021; Tikhonova et al., 2021, 2022).

Показано, что процессы аэробного окисления метана (МО) в осадках Арктических морей протекают с разной интенсивностью, степень которой прямо пропорциональна концентрациям метана. Максимальные величины МО зафиксированы для отдельных районов моря Лаптевых, где в осадках, формирующихся в районах струйных высачиваний метана, скорости МО достигают 3,9 мкмоль CH_4 /(л сут), в то время как в осадках, не подверженных влиянию метановых сипов, скорость окисления метана не превышает 50 нмоль CH_4 /(л сут) (Savvichev et al., 2018a, Tikhonova et al., 2021). Схожая картина по скорости биогеохимических процессов описана для Баренцева (0,3–23 нмоль CH_4 /(л сут)) (Begmatov et al., 2021) и Карского (2,2–103 нмоль CH_4 /(л сут)) (Саввичев и соавт., 2018) морей. С помощью высокопроизводительного секвенирования гена 16S рРНК выявлены физиологические группы микроорганизмов, ответственные за протекание процесса аэробного окисления метана, объединенные в семейство *Methylococcaceae* (Саввичев и соавт., 2018; Savvichev et al., 2018a; Begmatov et al., 2021). По численности представители метанооксиляющих бактерий составляют минорную часть бактериального сообщества. Показано, что в местах, не подверженных влиянию метановых сипов, доля метанотрофов составляет от 0,1 до 0,4%. Вблизи струйных высачиваний метана их количество в осадках возрастает до 2,5% (Tikhonova et al., 2021, 2022).

Проведение поисково-разведочных работ предполагает различные исследования, среди которых одно из основных мест отводится скважинному бурению. Законсервированные устья скважин – это газовые скважины, использованные ранее в целях разведывательно-исследовательских работ. Несмотря на консервацию, метан может просачиваться из таких скважин как в виде

пузырьковых, так и диффузных высачиваний и воздействовать на структуру и активность микробного сообщества осадочных отложений прилегающих районов. Вопрос консервации скважин, в том числе газоразведывательных, является весьма спорным и актуальным. Высказываются мнения о деградации материалов, с последствиями в виде возникновения активных газовых высачиваний (<https://neftegaz.ru>).

Изучение микробных сообществ, формирующихся под влиянием метановых сипов, вызывает широкий научный интерес. Вопрос о влиянии законсервированных скважин газоразведывательного бурения на структуру сообществ микроорганизмов не изучен.

Целью настоящей работы было изучение влияния антропогенного воздействия на структуру и функционирование сообществ аэробных метанооксиляющих бактерий в осадках Карского моря.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Отбор образцов. Пробы донных осадков были отобраны в сентябре 2020 г. в рейсе НИС “Виктор Буйницкий”, на полигоне Ямальской акватории юго-западной части Карского моря (72,6° и 73,6° N; 64,4° и 68,4° E) (рис. 1). Акватория, на которой были отобраны пробы, располагается западнее северной половины п-ова Ямал, от побережья и на несколько сотен километров по акватории. Для данной работы взяты поверхностные осадки на 12 станциях из 6 различных по глубине и удаленности от берега районов. Образцы донных осадков (отбор приповерхностного слоя 1–3 см) отбирали в устьях законсервированных скважин, образовавшихся при проведении газоразведывательного бурения. Для каждой скважины была взята контрольная (“фоновая”) точка на удалении 1 км. Диапазон глубин водной толщи в акватории проведения исследований составлял 14–117 м. Точки отбора находились на разной удаленности от берега в рамках указанного координатами региона.

В работе использован комплекс радиоизотопных, газо-геохимических, микробиологических и молекулярно-биологических методов.

Пробы донных осадков отбирали дночерпателем “Океан”. Для газохроматографических, биогеохимических, микробиологических и молекулярно-биологических исследований использовали одни и те же стандартные поверхностные горизонты. Все эксперименты с осадками, их первичную обработку и консервацию проводили в первые часы после отбора проб.

Концентрацию метана в донных отложениях измеряли на газовом хроматографе Кристалл-2000-М (ЗАО СКБ “Хроматэк”, Россия) с пламенно-ионизационным детектором методом фа-



Рис. 1. Карта-схема расположения станций, исследованных в ходе рейса НИС “Виктор Буйницкий” 2020 г.

зово-равновесной дегазации (Egogov, Ivanov, 1998). Погрешность измерения не превышала 5%.

Иловые (поровые) воды получали центрифугированием осадков при 5000 g на центрифуге “ЦУМ-1” (Россия). Величину щелочного резерва определяли с использованием набора реактивов (“Merck”, Германия). Определение содержания хлорид-иона и сульфат-иона в поровых водах осадков проводили на ионном хроматографе “Стайер” (Россия).

Измерение скорости окисления метана радиоизотопным методом. Скорость окисления метана (МО) определяли радиоизотопным методом с ^{14}C -метаном, растворенным в дегазированной дистиллированной воде. Ненарушенные осадки в количестве 2.5 см³ из каждого горизонта отбирали пластиковыми шприцами (общий объем 5 см³) с резиновым поршнем и отсеченным краем, герметично закрывали пробкой из бутиловой резины. 0.2 мл меченого ^{14}C -метана (1 мКи на пробу) вносили туберкулиновым шприцем, прокалывая резиновую пробку иглой по центру и равномерно распределяя субстрат по длине шприца с осадком. Контролем служили пробы, фиксированные 1 мл 0.5 н раствора КОН и выдержанные в холодильнике 6 ч до внесения меченого субстрата. По-

сле внесения меченого метана образцы донных осадков инкубировали в течение 2 сут при температуре, близкой к температуре *in situ*. После инкубации пробы фиксировали и транспортировали в стационарную лабораторию для дальнейшего определения продуктов микробного окисления и трансформации ^{14}C метана: в углекислоту (CO_2), в биомассу микроорганизмов (БМ) и в растворенный органический углерод (РОУ) в составе растворенного органического вещества (РОВ). Обработку проб и расчеты интенсивности метаноокисления проводили по ранее описанной методике (Русанов и соавт., 1998; Ivanov et al., 2002). Радиоактивность (^{14}C) продуктов микробного процесса МО измеряли на жидкостном сцинтилляционном счетчике PackardTRI-CarbTR 2400 (США). Для расчетов численных показателей интенсивности образования продуктов микробного окисления и трансформации углерода метана использовали среднюю величину, полученную из двух повторностей измерений для каждого образца.

Идентификация аэробных метанооксиляющих бактерий методом высокопроизводительного секвенирования гена 16S рРНК. Суммарная ДНК была выделена из 3 г осадка с помощью DNeasy PowerMax Soil Kit (“Qiagen”, Carlsbad, CA, США). ПЦР фрагменты гена 16S рРНК были получены с ис-

Транслированные последовательности выровняли при помощи MAFFT (Katoh, Standley, 2013), после чего выравнивание обрезалось при помощи пакета Trimal, в автоматическом режиме выбора параметров (Capella-Gutiérrez et al., 2009). Дерево было построено на основании пакета RAxML с применением гамма модели аминокислотных замен на основе WAG матрицы (GTRGAMMAWAG), с использованием быстрого бутстрэп-анализа по 1000 репликам (Stamatakis, 2014).

Проведение инкубационного эксперимента. Для проведения эксперимента по оценке влияния температуры на активность и состав метанового фильтра 5 г осадка помещали в 120 мл флаконы и добавляли 5 мл минеральной среды следующего состава: (г/л): KNO_3 – 0.25; NH_4Cl – 0.25; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.4; CaCl_2 – 0.1; NaCl – 20.0; KCl – 1.5; Na_2HPO_4 – 0.358; KH_2PO_4 – 0.13 и 1 мл раствора микроэлементов следующего состава (мг/100 мл): нитрилтриуксусная кислота (НТА) – 150; $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 50; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 10; CoCl_2 – 10; ZnSO_4 – 10; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 1; $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$ – 1; H_3BO_3 – 1; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 1; pH готовой среды составлял 6.8–7.2. В газовую фазу добавляли 5% метана, инкубирование проводили при 4, 10, 15 и 20°C в течение 30 сут. Убыль метана оценивали методом газовой хроматографии на приборе ГХ Кристалл 5000.2 (ЗАО “Хроматэк”, Россия) с пламенно-ионизационным детектором. После окончания эксперимента из образцов выделена тотальная ДНК для проведения анализа метагеномных библиотек *тотА* методом высокопроизводительного секвенирования (HiSeq Illumina) и количественной ПЦР.

Определение количественного содержания метанотрофных бактерий методом ПЦР в реальном времени. Количественное содержание метанотрофов в исследуемых образцах проводили методом ПЦР в режиме реального времени с использованием праймерной системы: A189/mb661 (Chen et al., 2007).

ПЦР в режиме реального времени по технологии SYBR Green I проводили в ПЦР буфере-RB (“Синтол”, Россия) в присутствии пассивного референсного красителя ROX для нормализации сигнала флуоресценции красителя, используемого в реакции. Детекцию для каждого образца осуществляли в двукратной повторности. В качестве отрицательного контроля (реакционная смесь без ДНК-матрицы) использовали ddH_2O (“Синтол”, Россия). Амплификацию проводили с использованием Системы ПЦР-обнаружения реального времени CFX96 TouchTM (“Bio-Rad”). Состав реакционной смеси: 2.5× ПЦР буфер-Б – 10 мкл, праймер A189 (20 пкмоль/мкл) – 0.25 мкл, праймер mb661R (20 пкмоль/мкл) – 0.25 мкл, образец ДНК – 5 мкл, деионизованная вода – до конечного объема 25 мкл. Температурно-временной про-

филь реакции: активация полимеразы 5 мин при 95°C, следующие 40 циклов – 20 с при 95°C, 56°C – 20 с, 62°C – 50 с.

Для подсчета количества клеток в анализируемых образцах, сравнивали сигнал, полученный в исследуемом образце, со стандартной кривой. Для построения стандартных кривых применяли серию последовательных разведений стандартного образца. В качестве стандартного образца использовали предварительно очищенный с помощью набора WizardSV Gel and PCR Clean-Up System (“Promega”, США) и впоследствии клонированный в pGEM-T вектор (“Promega”, США) целевой ПЦР-фрагмент.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Характеристика района исследований и интенсивности микробного окисления метана. Исследованные скважины пробурены в период с 2017 по 2021 г. Устье скважины представляло собой выход к поверхности дна трубы диаметром около 70 см, залитой бетонной смесью. В поверхностных осадках, в непосредственной близости от скважины, выявлены повышенные концентрации метана по сравнению с фоновыми осадками, отобранными на расстоянии 1 км от скважины. Предполагается, что аномалии по содержанию метана связаны с капиллярным высачиванием газа из трубы.

Характеристики осадков для большинства образцов были сходными, как в целом по району исследований, так и в парах “скважина” – “фоновая” (табл. 1). Гранулометрия донных осадков не имеет явных закономерностей в зависимости от глубины водной толщи. Основным источником для формирования поверхностных донных отложений служат рыхлые отложения западного берега п-ова Ямал и п-ова Югорский. В результате термоабразии с Ямальского берега в акваторию поступают мелкозернистые пески с суглинистым материалом, а более тонкодисперсные выносы глинистой фракции – с п-ова Югорский (Саввичев и соавт., 2018). Современные донные осадки представлены алеврито-пелитовыми, пелито-алевритовыми илами, песчаным илом, пелитовым илом и смесью среднезернистого и мелкозернистого песков. Большинство осадков слагаются в разном соотношении несколькими видами илов с мелкозернистым песком. Большинство отобранных осадков характеризуется серо-коричневым цветом, типичным для окисленных осадочных отложений. Величина pH осадков изменялась в интервале 6.8–8.0 единиц. Значения температуры варьировали в пределах $-0.5...+1.5^\circ\text{C}$.

Содержание хлорид-аниона (консервативного показателя минерализации) в иловых водах варьировало от 441 до 512 ммоль л^{-1} . Незначительное распреснение иловых вод связано с придон-

Таблица 1. Характеристика станций отбора образцов

Скважина (дата бурения)	Координаты	Глубина, м	Характеристика осадка	Хлорид, мМ	Сульфат, мМ	SO ₄ ²⁻ /Cl ⁻ , %	Alk, мМ
Ленинградская 1							
1Л/1 (скважина, 2017 г.)	72°18'25.82" N 65°40'09.89" E	85	Серый, песчано-глинисто-алевритовый, мягкий, влажный, с темными вкраплениями, запах органики	504.6	29.9	15.8	4.7
1Л/6 (фон)	72°18'10.94" N 65°38'35.74" E	90	Коричневато-сероватый, песчано-глинисто-алевритовый с темными вкраплениями, слабый запах, мягкий, влажный	500.3	30.5	16.3	5.3
Ленинградская 2							
2Л/1 (скважина, 2018 г.)	72°13'22.49" N 65°34'26.40" E	114	Темно-серый, обводненный, алевритово-пелитовый, мягкий, без запаха	511.3	32.8	17.1	3.3
2Л/6 (фон)	72°13'29.44" N 65°32'43.24" E	117	Серый, алевритовый, с песком, влажный, мягкий, без запаха	501.8	30.4	16.1	3.9
Ленинградская 3							
3Л/1 (скважина, 2019 г.)	72°18'06.26" N 65°50'36.94" E	104	Серый, песчаный, плотный, водянистый, без запаха	512.3	32.2	16.7	3.8
3Л/6 (фон)	72°18'31.93" N 65°49'32.64" E	103	Коричнево-серый, глинистый, мягкий, влажный, без запаха	507.0	29.4	15.4	4.0
Русановская							
6Р/1 (скважина, 2017 г.)	73°01'35.81" N 65°56'26.46" E	64	Серый песчано-алевритовый, влажный, мягкий, без запаха	487.9	29.1	15.9	3.2
6Р/6 (фон)	73°01'48.31" N 65°54'44.61" E	75	Коричневый с серыми вкраплениями, алевритовый с песчаными добавками, влажный, мягкий, без запаха	497.5	29.5	15.8	3.3
Скуратовская							
1С/1 (скважина, 2020 г.)	73°00'07.49" N 68°55'13.90" E	14	Серо-коричневый, мелкий песок с добавками алеврита, водянистый, без запаха	446.4	25.9	15.5	4.3
1С/6 (фон)	72°59'37.15" N 68°54'36.32" E	14	Коричнево-серый алеврито-песчаный, водянистый, без запаха	440.9	27.3	16.5	6.5
Нярмейская							
1Н/1 (скважина, 2021 г.)	72°23'56.30" N 68°15'38.25" E	21	Коричнево-серый пелито-алевритовый, песчаный, водянистый, без запаха	468.8	28.5	16.2	6.1
1Н/6 (фон)	72°23'24.59" N 68°15'58.05" E	21	Серовато-коричневый, глинисто-алеврито-пелитовый, маслянистый, мягкий, без запаха	481.7	29.1	16.1	5.9

Таблица 2. Содержание метана и активность его микробного окисления в образцах осадков юго-западного сектора Карского моря

Скважина	Содержание CH ₄ , нМ	Скорость окисления CH ₄ , нмоль CH ₄ /(л сут)	Включение C-CH ₄ в CO ₂	Включение C-CH ₄ в POY	Включение C-CH ₄ в БМ
			нмоль CH ₄ /(л сут) (% от общего)		
Ленинградская					
1Л/6	33.24	3.04	1.31 (43.2)	1.72 (56.4)	0.01 (0.4)
1Л/1	37.10	2.71	2.04 (75.3)	0.64 (23.5)	0.03 (1.2)
Ленинградская					
2Л/6	60.19	3.64	2.26 (62.0)	1.36 (37.3)	0.03 (0.7)
2Л/1	48.43	1.77	0.8 (45.2)	0.87 (49.0)	0.10 (5.8)
Ленинградская					
3Л/6	18.43	2.05	1.00 (48.6)	0.94 (45.9)	0.11 (5.5)
3Л/1	60.69	5.55	2.76 (49.7)	2.72 (48.9)	0.08 (1.4)
Русановская					
6Р/1	38.04	1.68	1.3 (77.4)	0.34 (20.5)	0.04 (2.1)
6Р/6	17.37	0.69	0.61 (87.5)	0.06 (9.0)	0.02 (3.5)
Скуратовская					
1С/1	51.98	5.98	1.4 (23.5)	4.20 (70.3)	0.37 (6.2)
1С/6	42.89	2.64	0.45 (17.1)	1.94 (73.6)	0.25 (9.3)
Нярмейская					
1Н/6	8.97	1.60	0.83 (51.8)	0.74 (46.2)	0.03 (2.0)
1Н/1	85.15	11.11	4.56 (41.0)	6.50 (58.5)	0.06 (0.5)

ными течениями, неравномерными на большой площади морского дна. Содержание сульфат-аниона в иловых водах варьировало от 25.9 до 32.8 г л⁻¹. Значения хлор-сульфатного коэффициента ($Cl^-/SO_4^{2-} \times 100, \%$), показателя активности процесса микробной сульфатредукции, варьировали от 15.4 до 17.1 (табл. 1). Незначительное увеличение значений хлор-сульфатного коэффициента является геохимическим показателем слабовыраженного процесса сульфатредукции.

Содержание щелочного резерва (Alk) в иловых водах исследованных осадков варьировало от 3.2 до 6.5 ммоль л⁻¹, что является характерным для поверхностных осадков Карского моря (Саввичев и соавт., 2018).

Содержание растворенного метана в осадках варьировало от 9 до 85 нмоль/дм⁻³, при среднем значении в 42 нмоль/дм⁻³. Существенных различий между скважинами и контрольными (фоновыми) точками не отмечено, за исключением Нярмейской, где содержание метана практически на порядок было выше в осадках района скважины (85.15 нмоль/дм⁻³) по сравнению с фоновой (8.97 нмоль/дм⁻³).

Скорость окисления метана также была достаточно низкой (0.69–5.98 нмоль CH₄ дм⁻³ сут⁻¹),

без существенных различий между скважинами и фоновыми станциями для 5 площадок парных точек (скважина – фоновая) исследования (табл. 2). При этом, для Нярмейской скважины величина интенсивности окисления метана была выше, чем на всех остальных станциях исследования (11.1 нмоль CH₄ дм⁻³ сут⁻¹), и заметно отличалась от значений на фоновой станции (1.6 нмоль CH₄ дм⁻³ сут⁻¹).

Тем не менее, несмотря на низкие скорости МО, суточное микробное потребление метана составляло от 3.7 до 17.9% (среднее 8.5%) от концентрационного пула метана в каждом исследованных осадках (табл. 2).

Основными продуктами микробного окисления и трансформации углерода метана являлись углекислота (HCO₃⁻) и внеклеточные экзометаболиты (внеклеточный растворенный органический углерод – РОУ, в составе различных РОВ – растворенное органическое вещество). Соотношение продуктов микробного окисления углерода метана изменялось на разных станциях без видимых закономерностей. Основным продуктом микробной утилизации метана для всех исследованных образцов являлся HCO₃⁻ (от 17.1 до 87.5%, при среднем значении 51.9%). Диапазон величин

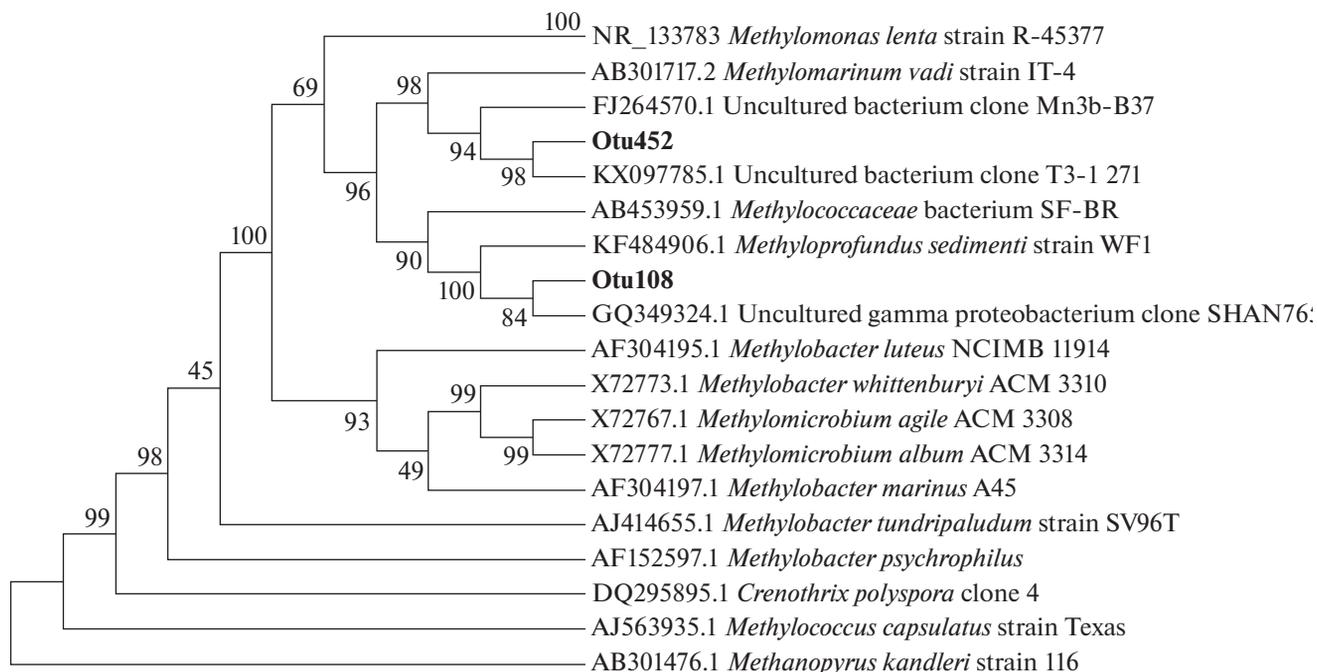


Рис. 2. Филогенетическое дерево, построенное на основе сравнительного анализа частичных последовательностей гена 16S рНК и отображающее положение выявленных в ходе данного исследования ОТЕ.

микробной трансформации углерода метана в РОУ составил для разных станций 9.0–73.6% углерода метана, при средней величине 44.9%. Доля включения углерода метана в биомассу была незначительной и составляла в среднем 3.2% (табл. 2).

Идентификация аэробных метанотрофов в нативных осадках. Анализ разнообразия метанотрофных микроорганизмов в нативных образцах, проведенный методом высокопроизводительного секвенирования гена 16S рНК, выявил присутствие представителей семейства *Methylococcales* класса *Gammaproteobacteria* (рис. 2). Таксономическое разнообразие метанотрофов было невелико, выявлены представители *Methylococcaeae*, близкие к роду *Methyloprofundus* и отнесенные в 2 ОТЕ (рис. 2). Их доля не превышала 0.06% от общего числа прочтений всех прокариот (табл. 3).

Проведен анализ разнообразия метанотрофных микроорганизмов методом высокопроизводительного секвенирования гена *pmoA* (метанмонооксигеназа, ключевой фермент процесса окисления метана). Ввиду специфичности и избирательности анализа выявлено большее разнообразие ор-

ганизмов, отнесенных к 7 ОТЕ. Среди них представители *Methylococcales* класса *Gammaproteobacteria* родов *Methyloprofundus*, *Methylomonas*, *Methylobacter*, а также *Alphaproteobacteria* рода *Methylocystis*. Существенных различий в составе метанотрофов, детектированных в естественных и антропогенно-нарушенных осадках выявлено не было (рис. 3).

Влияние температуры на состав и функционирование аэробного метанотрофного сообщества. Методом ПЦР в реальном времени установлено, что количество копий генов *pmoA* в нативных образцах осадков составляло 5.2×10^2 – 3.5×10^4 (табл. 4). В инкубационных экспериментах проведена оценка воздействия температуры на активность окисления метана и динамики количества метанотрофов в исследуемых осадках. Во всех образцах, инкубированных при 4 и 20°C отмечена убыль метана. За время эксперимента его количество снизилось с 10000 до 100–30 ppm. В образцах, инкубированных при 4°C, потребление метана было отмечено лишь по истечении 7 сут с максимальной убылью на 13–14 сут. Количество копий гена метанмонооксигеназы увеличилось на 1–2 порядка и соста-

Таблица 3. Относительное обилие метанотрофов в образцах ила Карского моря по результатам секвенирования гена 16S рНК (% от всего сообщества)

ОТЕ	1Л/1	1Л/6	2Л/1	2Л/6	3Л/1	3Л/6	6Р/1	6Р/6	1С/1	1С/6	1Н/1	1Н/6
108	0.02	0	0	0	0.02	0	0.02	0	0	0	0.02	0
452	0.04	0	0.01	0	0	0	0	0	0.06	0.04	0.02	0.01

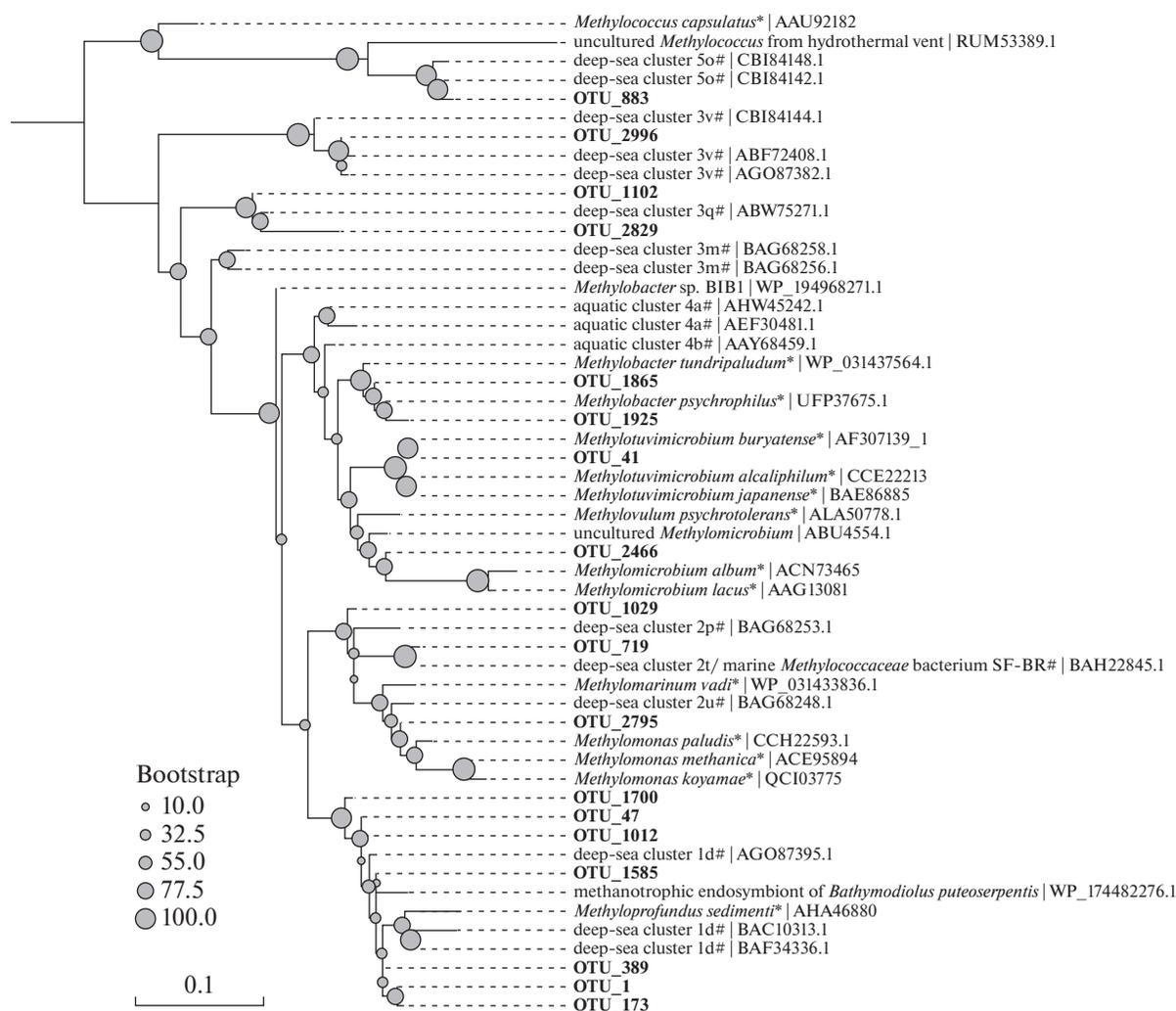


Рис. 3. Дерево максимального правдоподобия на основе последовательностей гена *rpoA* валидных видов, последовательностей гена *rpoA*, полученных на основании метагеномного анализа и полученных в ходе данной работы ампликонов. Результаты бутстрэп-анализа отображены рядом с ветвями в виде серых кругов разного размера. Валидные виды обозначены звездочкой. Отрисовка дерева производилась при помощи сервера iTOL (Letunic, Bork, 2021).

вило 1.1×10^4 – 7.2×10^5 . При инкубировании образцов осадков при температуре 20°C потребление метана отмечено начиная с 4 сут. Потребление метана шло интенсивнее, чем в образцах, инкубированных при 4°C. Однако достоверного увеличения копий гена метанмонооксигеназы не отмечено, количество оставалось на уровне 4.3×10^2 – 4.7×10^4 . Окисления метана в образцах, инкубированных при температурах 10 и 15°C, не происходило.

ОБСУЖДЕНИЕ

В последние десятилетия в связи с глобальным потеплением большое внимание уделяется междисциплинарным исследованиям процессов эмиссии метана с акватории морей Арктического региона. Установлено, что годовая эмиссия метана из Арктических морей достигает 4–6 Тг

CH₄/год (1 Тг = 10¹² г) (Shakhova et al., 2010; Yurganov, Leifer 2016). При этом общая эмиссия от Северного Ледовитого океана, согласно Yurganov et al. (2016), составляет примерно 49 Тг CH₄ в год.

Основной вклад в суммарную эмиссию метана в атмосферу с поверхности шельфовой зоны и континентального склона морей вносят естественные глубинные газовые высачивания (сипы). Такие источники природных газопроявлений распределены в пространстве неравномерно, а их интенсивность может быть самой разной, от диффузных высачиваний до струйных газовыделений и даже залповых выбросов. По результатам изотопно-геохимических исследований установлено, что происхождение метана в сипах может быть различным и связано с функционированием сообщества метаногенных архей (микробный метан), термokatалитическим разложением органического ве-

Таблица 4. Количества копий генов *pmoA* на 1 г осадка

Станция	Нативный осадок	Инкубирование при 4°C	Инкубирование при 20°C
1Л/1	(2.95 ± 0.34)E+03	(3.13 ± 0.50)E+05	(2.89 ± 0.52)E+03
1Л/6	(7.22 ± 0.25)E+03	(3.96 ± 0.24)E+04	(3.13 ± 0.28)E+03
2Л/1	(3.47 ± 0.34)E+03	(6.21 ± 0.16)E+04	(3.52 ± 0.03)E+03
2Л/6	(5.45 ± 0.38)E+03	(6.48 ± 0.19)E+03	(9.46 ± 0.21)E+03
3Л/1	(5.24 ± 0.20)E+02	(1.56 ± 0.23)E+05	(4.32 ± 0.28)E+02
3Л/6	(1.96 ± 0.06)E+03	(1.06 ± 0.10)E+04	(6.42 ± 0.07)E+03
6Р/1	(3.29 ± 0.51)E+03	(7.21 ± 0.26)E+05	(3.97 ± 0.30)E+04
6Р/6	(5.36 ± 0.17)E+03	(3.43 ± 0.21)E+05	(4.12 ± 0.23)E+03
1С/1	(2.80 ± 0.07)E+04	(1.77 ± 0.30)E+05	(4.43 ± 0.47)E+04
1С/6	(2.79 ± 0.09)E+04	(4.15 ± 0.13)E+05	(4.69 ± 0.13)E+04
1Н/1	(3.55 ± 0.50)E+04	(1.05 ± 0.03)E+05	(1.17 ± 0.39)E+05
1Н/6	(5.55 ± 0.35)E+03	(4.03 ± 0.48)E+03	(3.68 ± 0.01)E+03

шества (термогенный метан) и абиотический метан, поступающий в составе газов в зонах разгрузки подводных гидротерм и грязевых вулканов (Пименов и соавт., 2000). Метан, попавший в воду, распространяется путем диффузии и пузырьковым способом. Диффузия метана в воду является медленным процессом. Пузырьковый перенос значительно интенсивнее диффузионного. В глубоководной части Северного Ледовитого океана этот процесс может обеспечивать вынос метана к поверхности морского льда, если объем пузырьков достаточно велик. В противном случае метан успевает раствориться по мере поднятия пузырьков до полного их исчезновения (Шахова и соавт., 2009).

Проведение газоразведывательного бурения в морских акваториях сопровождается выбросами метана в толщу воды, что позволяет рассматривать такие скважины как сипы антропогенного происхождения. При консервировании поисковых скважин возможно неполное прекращение выброса или высачивания метана, что может провоцировать дополнительную нагрузку на экосистему.

Литературные данные, полученные в ходе исследования арктических морей, свидетельствуют о том, что в местах отсутствия признаков газовой выделений из морского дна концентрация растворенного метана в воде невелика. Так, для Баренцева моря содержание метана в фоновых образцах поверхностных осадков не превышало 0.5 мкМ, в то время как в районе сипа концентрация метана повышалась до 9.5 мкМ (Begmatov et al., 2021). Для моря Лаптевых влияние сипов прослеживалось более отчетливо: на сиповых станциях содержание метана варьировало от 19 до 539 мкМ, на фоновых станциях не превышало 0.012 мкМ (Savvichev et al., 2018a).

В ходе исследований поверхностного слоя донных осадков Ямальского сектора Карского моря по-

казано, что содержание метана, растворенного в поверхностных осадках, составляет от 1.9 до 20.3 мкМ дм⁻³ при среднем значении в 8.16 мкМ дм⁻³ (Саввичев и соавт., 2018). Это согласуется с данными, полученными в ходе более ранних исследований, проведенных в различных районах Карского моря (Леин и соавт., 1996; Саввичев и соавт., 2018). Значения концентрации метана, приведенные в нашей работе, невелики, варьируют в диапазоне 0.009–0.9 мкМ и соответствуют нижнему уровню интервалов, приведенных в более ранних работах.

В целом, анализ данных о скорости микробного окисления метана в поверхностных осадках арктических морей выявляет общие закономерности. Для осадков, не подверженных влиянию сипов, скорости МО были низкими и коррелировали с количеством содержащегося метана. Резко отличались скорости окисления метана в образцах, отобранных в районах сипов моря Лаптевых. Там величины интенсивности этого микробного процесса составляли 460–3900 нмоль СН₄/(л сут). В то время как на фоновых станциях значения МО не превышали 2 нмоль СН₄/(л сут). В Баренцевом море значения МО на сиповой станции также были выше, чем на фоновых (соответственно, 22.8 и 2.1–8.2 нмоль СН₄/(л сут)). Для Карского моря скорость окисления метана составляла от 0.69 до 5.98 нмоль СН₄/(л сут) (Саввичев и соавт., 2018). В образцах осадков, отобранных в районах законсервированных скважин, количество метана и скорости его окисления коррелируют с величинами, показанными для мест, не подверженных влиянию сипов. В то же время для законсервированной скважины Нярмейского месторождения (образец 1Н/1) зафиксирована максимальная величина МО, составлявшая 11.11 нмоль СН₄/(л сут). Наряду с повышенным содержанием

метана в осадках, можно полагать, что данная скважина проявляет признаки сипа. В образцах, отобранных на контрольной станции (образец 1Н/6), концентрация метана и скорость его микробного окисления меньше в 10 раз. Очевидно, что скважины, где бурение осуществлялось не более 1 года назад (Нярмейская), проявляют признаки сипов. Для станций, на которых газоразведывательное бурение проводилось более 2 лет назад (Ленинградская, Русановская, Скуратовская), количество метана и скорость его микробного окисления соотносятся с данными, показанными для фоновых станций.

Разнообразие аэробных метанотрофных бактерий в нативных осадках изучалось нами методами высокопродуктивного секвенирования генов 16S рРНК и *pmoA*. Анализ генов 16S рРНК позволяет оценить долю метанотрофов в сообществе бактерий, но не дает возможность детектировать полный спектр этих организмов, т.к. достоверно не учитывает минорные компоненты. Согласно результатам анализа гена 16S рРНК, разнообразие аэробных метанотрофов в исследованных осадках было невелико и ограничивалось 2 ОТЕ. На филогенетическом дереве детектированные последовательности образуют кластер организмов, типичных для морских экосистем. Так, ОТЕ 108 относится к “deep sea-1 cluster”. Единственным культивируемым представителем клады является *Methyloprofundus sedimenti* WF1. Представители этого кластера типичны не только для северных морей, но для морских экосистем в целом, что отмечено во многих работах (Knief, 2015; Hirayama et al., 2022). Их вклад в морской цикл метана заключается не только в потреблении метана в толще воды и морских отложениях, но и в образовании эндосимбиотических связей с морскими животными. В морских экосистемах условия обитания для аэробных метанотрофов ограничены количеством кислорода, а также нестабильным поступлением субстрата – метана, концентрации которого варьируют в зависимости от сезона (активности метаногенеза) или высачиваний газа. Низкие значения температур также сдерживают активность микробных клеток (Knoblauch et al., 2013). Поэтому представители клады “deep sea-1” адаптированы к неблагоприятным условиям среды: в клетках изменяется уровень насыщения жирными кислотами, увеличивается содержание кардиолипина, отвечающего за поддержание функционирования дыхательной цепи (Romantsov et al., 2009), увеличивается количество гранул запасных веществ в цитоплазме, происходит ряд структурных изменений. Метановое голодание провоцирует увеличение количества транскриптов генов *pmoA*, в то время как транскрипция всех остальных генов снижается. Таким образом, поступление метана после периода голодания провоцирует резкий скачок активности метанотрофов, при этом большая часть

метана окисляется не полностью, что приводит к значительным выбросам в окружающую среду метанола, давая субстрат для развития других звеньев трофической цепи (Tavormina et al., 2017).

Несмотря на постоянно низкие значения температур в исследуемых осадках, обнаруженные метанотрофные бактерии относятся к мезофильным (психротолерантным). Изучение чистой культуры *Methyloprofundus sedimenti* WF1 позволило определить температурный оптимум роста, находящийся в диапазоне 18–23°C, что характерно для мезофильных микроорганизмов. После инкубирования с метаном при 20°C достоверного увеличения количества копий гена метанмонооксигеназы не зафиксировано, однако потребление метана происходило более активно, чем при 4°C. Инкубирование образцов при 4°C сопровождалось пониженной активностью клеток, метан потреблялся медленнее, в то же время происходил прирост количества копий гена *pmoA*, что свидетельствует о снижении стрессового воздействия на клетки метанотрофов с повышением температуры. Обращает на себя внимание тот факт, что при 10 и 15°C в накопительных культурах мы не наблюдали активности потребления метана, что может свидетельствовать о существовании в микробном сообществе донных осадков как истинно психрофильных метанотрофных бактерий, так и мезофилов, рост которых начинается при температуре выше 15°C.

ОТЕ 452, принадлежащий к “deep sea-2 cluster”, относится к группе аэробных метанооксилирующих организмов, приуроченных к морским гидротермам. Представители этой группы также отмечаются как эндосимбионты моллюсков (Hirayama et al., 2012; Wang et al., 2018).

В районах законсервированных скважин метанотрофы представляли минорную часть микробного сообщества, их доля не превышала 0.06% от всех полученных ОТЕ. На фоновых станциях количество метанотрофов, как правило, было ниже уровня детекции (табл. 3).

Аналогичная структура сообщества метанотрофов показана для морей Восточно-Сибирского и Лаптевых, где по результатам анализа микробного сообщества нативных осадков методом секвенирования гена 16S рРНК также показано небольшое разнообразие аэробных метанотрофов. Обнаруженные последовательности входят в состав клады “deep sea-1”. В районах, не подверженных влиянию сипов, количество метанотрофов не превышает 0.4% и, как правило, составляет 0.01–0.1%. В местах постоянных выходов газа метанотрофы составляли 0.6–2.0% (Tikhonova et al., 2021, 2022, in press).

Для более детального выявления разнообразия аэробных метанотрофов мы использовали более специфичный и избирательный метод высокопро-

дуктивного секвенирования гена метанмоноокси-геназы *pmoA*, позволяющий детектировать минорные компоненты сообщества, которые при смене физико-химических параметров среды могут активно развиваться. При анализе результатов, полученных в ходе секвенирования гена *pmoA*, также показано присутствие в метанотрофном сообществе представителей “deep sea-1 и deep sea-2 clusters”, составляющих, соответственно, 40–50 и 0.1–0.2% от общего количества последовательно-стей, отнесенных к гену *pmoA*.

Дополнительно при анализе гена *pmoA* были обнаружены организмы, входящие в “deep sea-3 и 5 clusters” (4–8 и 1.5–14% соответственно). Представители данных кластеров присутствовали во всех исследованных осадках в разном количественном соотношении. Подобная структура метанотрофных сообществ типична для морских экосистем и отмечается в ряде исследований (Knief, 2015).

Таким образом, филогенетический состав аэробных метанотрофов для осадков, отобранных в районах законсервированных скважин, и на фоновых станциях аналогичен. Основу составляют метанотрофы, входящие в глубоководные кластеры, широко представленные в морских экосистемах.

Результаты проведенных исследований указывают на то, что в антропогенно нарушенных осадках с признаками газового высачивания активизируются процессы микробного окисления метана, способствующие вовлечению углерода метана в трофическую цепь. В этой связи повышенное содержание метана, а также более высокие активности его окисления в зонах законсервированных скважин могут свидетельствовать о неполной герметизации скважин. В нашей работе признаки метанового сипа с повышенным содержанием растворенного метана и высокими скоростями его микробного окисления проявляла Няремейская скважина, пробуренная в 2021 году. Скважины, законсервированные более 2 лет назад, не обнаруживали признаков высачивания метана.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при частичной поддержке гранта РФФИ А 20-04-00126, а также из средств государственного задания ФИЦ Биотехнологии РАН. Секвенирование и биоинформатический анализ последовательностей гена *pmoA* профинансированы Министерством высшего образования и науки РФ (соглашение № 075-15-2019-1659 на развитие Курчатовского центра геномных исследований).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Григоренко Ю.Н., Мирчинк И.М., Савченко В.И., Сенин Б.В., Супруненко О.И. Угледородный потенциал континентального шельфа России: состояние и проблемы освоения // Минеральные ресурсы российского шельфа: Спецвып. журн. “Минеральные ресурсы России: экономика и управление”. М., 2006. С. 14–71.
- Леин А.Ю., Русанов И.И., Пименов Н.В. Биогеохимические процессы циклов углерода и серы в Карском море // Геохимия. 1996. № 11. С. 1027–1044.
- Лисицын А.П., Шевченко В.П., Виноградов М.Е., Северина О.В., Вавилова В.В., Мицкевич И.Н. Потоки осадочного вещества в Карском море и в эстуариях Оби и Енисея // Океанология. 1994. Т. 34. С. 748–758.
- Lisitzin A.P., Shevchenko V.P., Vinogradov M.E., Severina O.V., Vavilova V.V., Mitzkevich I.N. Particle fluxes in the Kara Sea and Ob and Yenisei estuaries // Oceanology. 1995. V. 34. P. 683–693.
- Мошаров С.А., Мошарова И.В. Сравнительный анализ продукционных и микробиологических характеристик Карского и Чукотского морей // Физические, геологические и биологические исследования океанов и морей. М.: Научный мир, 2010. С. 494–505.
- Пименов Н.В., Саввичев А.С., Русанов И.И., Леин А.Ю., Иванов М.В. Микробиологические процессы цикла углерода и серы на холодных метановых сипах северной Атлантики // Микробиология. 2000. Т. 69. № 6. С. 831–843.
- Pimenov N.V., Savvichev A.S., Rusanov I.I., Lein A.Yu., Ivanov M.V. Microbiological processes of the carbon and sulfur cycles at cold methane seeps of the North Atlantic // Microbiology (Moscow). 2000. V. 69. P. 709–721.
- Русанов И.И., Саввичев А.С., Юсупов С.К., Пименов Н.В., Иванов М.В. Образование экзометаболитов в процессе микробного окисления метана в морских экосистемах // Микробиология. 1998. Т. 67. № 5. С. 710–717.
- Rusanov I.I., Savvichev A.S., Yusupov S.K., Pimenov N.V., Ivanov M.V. Production of exometabolites in the microbial oxidation of methane in marine ecosystems // Microbiology (Moscow). 1998. V. 67. P. 590–596.
- Тихонова Е.Н., Кадников В.В., Русанов И.И., Белецкий А.В., Захарова Е.Е., Самылина О.С., Равин Н.В., Пименов Н.В. Метаноксиляющая активность и филогенетическое разнообразие аэробных метанотрофов в поверхностных осадках моря Лаптевых // Микробиология. 2021. Т. 90. С. 304–314.
- Tikhonova E.N., Kadnikov V.V., Rusanov I.I., Beletsky A.V., Zakharova E.E., Samylina O.S., Ravin N.V., Pimenov N.V. Methane-oxidizing activity and phylogenetic diversity of aerobic methanotrophs in the Laptev Sea upper sediment horizons // Microbiology. 2021. V. 90. P. 314–323.
- Саввичев А.С., Русанов И.И., Кадников В.В., Белецкий А.В., Равин Н.В., Пименов Н.В. Состав микробного сообщества и активность микробных процессов цикла метана в поверхностных осадках Ямальского сектора юго-западной части Карского моря // Микробиология. 2018. Т. 87. С. 178–190.

- Savvichev A.S., Rusanov I.I., Kadnikov V.V., Beletskii A.V., Ravin N.V., Pimenov N.V.* Microbial community composition and rates of the methane cycle microbial processes in the upper sediments of the yamal sector of the southwestern Kara Sea // *Microbiology (Moscow)*. 2018. V. 87. P. 238–248.
- Begmatov S., Savvichev A.S., Kadnikov V.V., Beletsky A.V., Rusanov I.I., Klyuvitkin A.A., Novichkova E.A., Mardanov A.V., Pimenov N.V., Ravin N.V.* Microbial communities involved in methane, sulfur and nitrogen cycling in the sediments of the Barents Sea // *Microorganisms*. 2021. V. 9. P. 2362.
- Camacho C., Coulouris G., Avagyan V., Ma N., Papadopoulos J., Kevin Bealer K., Madden T.L.* BLAST+: architecture and applications // *BMC Bioinform.* 2009. V. 10. P. 421.
- Capella-Gutiérrez S., Silla-Martínez J.M., Gabaldón T.* trimAl: a tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses // *Bioinform.* 2009. V. 25. P. 1972–1973.
- Chen Y., Dumont M.G., Cébron A., Murrell J.C.* Identification of active methanotrophs in a landfill cover soil through detection of expression of 16S rRNA and functional genes // *Environ. Microbiol.* 2007. V. 9. P. 2855–2869.
- Edgar R.C.* Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST // *Bioinform.* 2010. V. 26. P. 2460–2461.
- Egorov A.V., Ivanov M.K.* Hydrocarbon gases in sediments and mud breccias from the central and eastern part of the Mediterranean Ridge // *Geo-Mar. Lett.* 1998. V. 18. P. 127–138.
- 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. fiw018.
- Gohl D., Gohl D.M., MacLean A., Hauge A., Becker A., Walek D., Beckman K.B.* An optimized protocol for high-throughput amplicon-based microbiome profiling // *Protocol Exchange*. Epub a head of print 25 July 2016. <https://doi.org/10.1038/protex.2016.030>
- Hirayama H., Takaki Y., Abe M., Imachi H., Ikuta T., Miyazaki J., Tasumi E.* Multispecies populations of methanotrophic *Methyloprofundus* and cultivation of a likely dominant species from the Iheya North deep-sea hydrothermal field // *Appl. Environ. Microbiol.* 2022. V. 88. e0075821.
- Hirayama H., Fuse H., Abe M., Miyazaki M., Nakamura T., Nunoura T., Furushima Y., Yamamoto H., Takai K.* *Methyloprofundus vadi* gen. nov., sp. nov., a methanotroph isolated from two distinct marine environments // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2012. V. 63. P. 1073–1082. <https://www.globalmethane.org>.
- Ivanov M.V., Pimenov N.V., Rusanov I.U., Lein A. Yu.* Microbial process of the methane cycle at the north-western shelf of the Black Sea // *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 2002. V. 54. P. 589–599.
- Katoh K., Standley D.M.* MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability // *Mol. Biol. Evol.* 2013. V. 30. P. 772–780.
- Knief C.* Diversity and habitat preferences of cultivated and uncultivated aerobic methanotrophic bacteria evaluated based on *pmoA* as molecular marker // *Front. Microbiol.* 2015. V. 6. Art. 1346.
- Knoblauch C., Beer C., Sosnin A., Wagner D., Pfeiffer E.-M.* Predicting long-term carbon mineralization and trace gas production from thawing permafrost of Northeast Siberia // *Global Change Biology*. 2013. V. 19. P. 1160–1172.
- Letunic I., Bork P.* Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation // *Nucl. Acids Res.* 2021. V. 49. P. W293–W296.
- Magoc T., Salzberg S.L.* FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies // *Bioinform.* 2011. V. 27. P. 2957–2963.
- Masella A.P., Bartram A.K., Truszkowski J.M., Brown D.G., Neufeld J.D.* PANDAseq: paired-end assembler for illumina sequences // *BMC Bioinform.* 2012. V. 13. P. 31. <https://neftgaz.ru/>.
- Renaud G., Stenzel U., Maricic T., Wiebe V., Kelso J.* deML: robust demultiplexing of Illumina sequences using a likelihood-based approach // *Bioinform.* 2015. V. 31. P. 770–772.
- Rognes T., Flouri T., Nichols B., Quince C., Mahé F.* VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics // *PeerJ Preprints*. 2016. V. 4. e2409v1.
- Romantsov T., Guan Z., Wood J.M.* Cardiolipin and the osmotic stress responses of bacteria // *Biochim. Biophys. Acta (BBA) Biomembr.* 2009. V. 1788. P. 2092–2100.
- Samad M.S., Bertilsson S.* Seasonal variation in abundance and diversity of bacterial methanotrophs in five temperate lakes // *Front. Microbiol.* 2017. V. 8. Art. 142.
- Savvichev A.S., Kadnikov V.V., Kravchishina M.D., Galkin S.V., Novigatskii A.N., Sigalevich P.A., Merkel A. Yu., Ravin N.V., Pimenov N.V., Flint M.V.* Methane as an organic matter source and the trophic basis of a Laptev Sea cold seep microbial community // *Geomicrobiol. J.* 2018a. V. 35. № 5. P. 1–13.
- Shakhova N., Semiletov I., Salyuk A., Yusupov V., Kosmach D., Gustafsson O.* Extensive methane venting to the atmosphere from sediments of the East Siberian Arctic Shelf // *Science*. 2010. V. 327. P. 1246–1250.
- Shakhova N.E., Semiletov I.P.* Methane hydrate feedbacks // *Arctic climate feedbacks: Global implications* / Eds. Sommerkorn M., Hassol S.J. WWF International Arctic Programme August. 2009. P. 81–92.
- Stamatakis A.* RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies // *Bioinform.* 2014. V. 30. P. 1312–1313.
- Tavormina P.L., Kellermann M.Y., Antony C.P., Tocheva E.I., Dalleska N.F., Jensen A.J., Valentine D.L., Hinrichs K.-U., Jensen G.J., Dubilier N., Orphan V.J.* Starvation and recovery in the deep-sea methanotroph *Methyloprofundus sedimenti* // *Mol. Microbiol.* 2017. V. 103. P. 242–252.
- Tavormina P.L., Ussler W., Orphan V.J.* Planktonic and sediment-associated aerobic methanotrophs in two seep systems along the North American Margin // *Appl. Environ. Microbiol.* 2008. V. 74. P. 3985–3995.
- Tikhonova E.N., Kadnikov V.V., Rusanov I.I., Pimenov N.V.* Structural and functional organization of methane filter in the Russian Arctic Seas upper sediment horizons. 2022, in press.
- Toshchakov S.V., Izotova A.O., Vinogradova E.N., Kachmazov G.S., Tuaeveva A.Y., Abaev V.T., Evteeva M.A., Gunitseva N.M., Korzhenkov A.A., Elcheninov A.G., Patrushev M.V., Kublanov I.V.* Culture-independent survey of thermophilic microbial communities of the North Caucasus // *Biology*. 2021. V. 10. P. 1352.

Wang L., Yu M., Liu Y., Liu J., Wu Y., Li L., Liu J., Wang M., Zhang X.-H. Comparative analyses of the bacterial community of hydrothermal deposits and seafloor sediments across Okinawa Trough // *J. Mar. Systems*. 2018. V. 180. P. 162–172.

Yurganov L.N., Leifer I. Оценки эмиссии метана от некоторых арктических и приарктических районов по данным орбитального интерферометра IASI // *Совре-*

менные проблемы дистанционного зондирования Земли из космоса. 2016. Т. 13. № 3. С. 173–183.

Yurganov L.N., Leifer I., Lund Myhre C. Seasonal and inter-annual variability of atmospheric methane over Arctic Ocean from satellite data // *Современные проблемы дистанционного зондирования Земли из космоса*. 2016. Т. 13. № 2. С. 107–119.

Microbial Processes of Methane Oxidation at the Kara Sea Sites of Gas Prospecting

E. N. Tikhonova¹, *, I. I. Rusanov¹, V. V. Kadnikov¹, E. V. Demkina¹, S. V. Toshchakov², A. O. Izotova², and N. V. Pimenov¹

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

²National Research Center “Kurchatov Institute”, Kurchatov Complex for Genetic Research (GosNIIgenetika), Moscow, 123098 Russia

*e-mail: katerina_inmi@mail.ru

Received October 25, 2022; revised November 14, 2022; accepted November 14, 2022

Abstract—Methane oxidation rates and diversity of methane-oxidizing microorganisms in the Kara Sea upper sediments at the sites of conserved gas prospecting wells were investigated. Analysis of the 16S rRNA gene sequences revealed members of the class *Gamma*proteobacteria, order *Methylococcales*. All samples exhibited similar diversity of the methane filter microorganisms, comprising mainly of methanotrophs related to the genus *Methyloprofundus* and of uncultured methanotrophic bacteria detected previously in the upper sediments of the Arctic seas. Molecular identification of methane-oxidizing bacteria of this community by high-throughput sequencing of the *pmoA* gene encoding particulate methane monooxygenase confirmed the similar structure of the methane filter in the upper sediments impaired by drilling and at the reference sites at significant distance from the wells. The sediments at the conserved well drilled less than two years earlier were shown to have the characteristics of a methane seep, i.e., elevated level of dissolved methane and high rates of microbial methane oxidation. No indication of methane seepage was observed for the wells conserved more than two years earlier; abundance of methane-oxidizing bacteria in their vicinity was below the detection threshold.

Keywords: methane, methane oxidation, aerobic methanotrophs, Kara Sea, gas prospecting, high-throughput sequencing, ecosystems under anthropogenic impact

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИ

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ТРЕХ
СТРАТИФИЦИРОВАННЫХ ОЗЕР НИЖЕГОРОДСКОЙ ОБЛАСТИ

© 2023 г. В. М. Горленко^а, *, М. Б. Вайнштейн^б

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

^бИнститут биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина, ФИЦ Пушкинский научный центр биологических исследований РАН, Пушкино, Московская обл., 142290 Россия

*e-mail: vgorlenko@mail.ru

Поступила в редакцию 20.10.2022 г.

После доработки 07.11.2022 г.

Принята к публикации 08.11.2022 г.

Были исследованы три карстовых озера в Нижегородской области: Старопустыньские озера Свято и Залив Некрасова, а также оз. Светлояр. Изученные озера относятся к мезотрофно-эвтрофному полигумозному типу, отличаются устойчивой стратификацией с признаками меромиксии. Их водная толща разделена на аэробную и анаэробную зоны, придонная вода содержит сульфид. В Старопустыньских озерах также присутствовали соединения Fe(II). В оз. Залив Некрасова в миксолимнионе отмечены высокая скорость окисленного фотосинтеза, до $1.2 \text{ мкг С л}^{-1} \text{ сут}^{-1}$, а также максимум аноксигенного фотосинтеза в хемоклине ($0.030\text{--}0.706 \text{ мкг С л}^{-1} \text{ сут}^{-1}$) на глубине 1.5–2.5 м. Пик темновой ассимиляции углекислоты ($0.146 \text{ мкг С л}^{-1} \text{ сут}^{-1}$) приходился на глубину 1.5 м в зоне оксиклина. В озерах Залив Некрасова и Свято на границе проникновения света обнаружены аноксигенные фототрофные бактерии (АФБ). Преобладали зеленые серобактерии с короткими клеточными выростами – “*Ancalochloris* sp.”. Встречались также консорциумы “*Chlorochromium aggregatum*” и нитчатые хлоробактерии “*Chloronema giganteum*”, в чехлах которых накапливаются соли окисного железа. В Старопустыньских озерах различные морфотипы железобактерий образовывали скопления в микроаэробной зоне. В оз. Светлояр хемоклин находился на глубине 16 м за пределами фотической зоны, поэтому условий для развития АФБ не было. В этих условиях в исследованных озерах основную роль в аэробном окислении серных соединений в зоне хемоклина играли гетеротрофные аэробные бактерии.

Ключевые слова: стратифицированные карстовые озера, круговорот серы и железа, аноксигенные фототрофные бактерии, сероокисляющие гетеротрофные бактерии, железобактерии

DOI: 10.31857/S0026365622600699, **EDN:** AUNIAU

Пресные озера карстового происхождения характеризуются повышенным содержанием солей, что способствует возникновению стратификации их водной толщи по плотности, приводящей к меромиксии (Gorlenko et al., 1983; Van Gemerden, Mas, 1995; Рогозин, 2019). Если озеро образовалось в гипсоносных породах, то в результате бактериального восстановления сульфатов образуется сероводород. Его окисление осуществляется преимущественно биологическим путем в зоне контакта сероводородных и кислородных вод (Hamilton et al., 2014). В зависимости от условий (степени эвтрофикации водоема, цветности воды, глубины распространения миксолимниона, глубины проникновения света и концентраций H_2S в мониолимнионе и значений pH), в окислении сероводорода принимают участие различные виды аноксигенных фототрофных бактерий (АФБ), а также автотрофные и гетеротрофные сероокисляющие

бактерии (Вайнштейн, 1979; Gorlenko et al., 1983; Gorlenko, 1988; Сорокин, 2003).

В озерах, обогащенных гуматами, в анаэробной зоне происходит аккумуляция соединений закисного железа Fe(II). Повышенное содержание железа существенно влияет на локализацию и ход процессов круговорота серы и железа в их сопряженных циклах (Горленко, Локк, 1979; Горленко и соавт., 1980; Bura-Nakic et al., 2009; Crowe et al., 2014; Дубинина, Сорокина, 2014; Savvichev et al., 2017). Современные стратифицированные озера с одновременным присутствием сульфида и солей железа принято рассматривать как модели древнего океана Архея и Протерозоя (Canfield et al., 2008; Poulton, Canfield, 2011; Walter et al., 2014). Интерес к озерам, содержащим значительные концентрации Fe(II), в эволюционном аспекте возрос после открытия способности некоторых видов пурпурных и зеленых бактерий к использо-

ванию солей закисного железа в качестве доноров электронов для фотосинтеза (Widdel et al., 1993; Heising et al., 1999; Straub et al., 1999; Crowe et al., 2014; Walter et al., 2014; Lambrecht et al., 2021).

В этом плане несомненный интерес представляют исследованные нами в 1974 г. карстовые озера Нижегородской области, два из которых кроме сульфида содержат в мнимомолибдате закисное железо. В настоящей статье представлены сведения о гидрохимии, продукционных процессах и распределении ключевых групп бактерий, способных участвовать в круговороте серы и железа в исследованных водоемах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Озера. Изученные карстовые озера Залив Некрасова и Свято образованы в результате размыва известняков Казанского яруса с многочисленными мощными прослоями гипса и ангидрита. В отношении происхождения оз. Светлояр существует ряд различных гипотез, но большинство исследователей относят его к провальным озерам карстового типа (Баянов, Никишин, 2005). Наши гидрохимические данные подтвердили устойчивую стратификацию оз. Светлояр на основе его карстового происхождения. Исследованные нами озера различались глубиной ложа, гидрохимическими показателями и, как следствие, микрофлорой, ее распределением и интенсивностью микробных процессов.

Озера Залив Некрасова и Свято находятся на юге Нижегородской области в долине реки Теши, они входят в систему Старопустыньских озер неподалеку от поселка Старая Пустынь (55°40'38" с.ш., 43°34'14" в.д.).

Оз. Залив Некрасова является плесом, отделившимся от оз. Великого и соединенным с ним узкой и неглубокой (до 2 м) протокой, имеет малую площадь (1 га) и максимальную глубину 9 м. Озеро защищено от ветров лесом, с берегов поступает болотный подток. Цветность поверхностных вод озера была высокой: XX баллов по шкале Фореля–Уля. Прозрачность по диску Секки в период исследования составляла всего 1.25 м.

Оз. Свято имеет площадь около 15 га и максимальную глубину 12 м. Оно окружено болотистыми берегами, в период наших исследований вода имела высокую цветность: более XXI балла по шкале Фореля–Уля. Прозрачность воды по диску Секки составляла в июне–июле всего 1.5 м.

Оз. Светлояр находится в северной части Нижегородской области (56°49'07" с.ш., 45°05'35" в.д.), в карбонатной карстовой провинции вблизи села Владимирского Воскресенского района. Оно является самым глубоким озером Нижегородской области: площадь около 12 га, наибольшая глубина – 31 м (Баянов, Никишин, 2005). Берега боло-

тистые, цветность воды по шкале Фореля–Уля в период наших исследований составила XVI. Прозрачность по диску Секки в период исследования составила 3.0 м.

Отбор проб, химические и микробиологические анализы. Пробы воды отбирали батометром Рутнера, а в зоне хемоклина – шприцевым батометром. Шприцевой батометр представлял собой 4 стерильных шприца объемом 50 мл, закрепленные на жесткой раме, что обеспечивало отбор проб воды в горизонтах с фиксированным промежутком в 25 см. Пробы ила отбирали трубочным стратометром диаметром 30 мм.

Интенсивность освещения на разных глубинах измеряли люксметром с подводным датчиком (Горленко и соавт., 1980). Температуру определяли по показаниям ртутного термометра, укрепленного внутри прозрачного корпуса батометра. Измерения pH и Eh проводили стандартными электродами на иономере И-102 в свежотобранной пробе воды. Величины pH и Eh в донных осадках измеряли непосредственно в трубке стратометра. Содержание кислорода в воде определяли методом Винклера, содержание сульфидов – иодометрическим титрованием. Концентрацию карбонатных форм углерода определяли ацидометрическим титрованием с использованием индикаторов pH метилового оранжевого и фенолфталеина (Кузнецов, Дубинина, 1989).

Перманганатную окисляемость определяли стандартным методом (Алекин и соавт., 1973). В коническую колбу вносили 100 мл испытуемой воды, приливали 5 мл разбавленной серной кислоты и 20 мл 0.01 N раствора перманганата. Смесь кипятили 10 мин, после чего к раствору добавляли 20 мл 0.01 N раствора щавелевой кислоты. Обесцвеченную, еще горячую (80–90°C) смесь титровали 0.01 N раствором перманганата до слабо-розовой окраски. Значение перманганатной окисляемости (X), выраженное в расчете на атомарный кислород в мг O₂/л, рассчитывали по формуле: $X = (V_1 C \times 8 \times 5 \times 1000 K_p) : V$, где: V_1 – объем раствора перманганата калия, израсходованного на титрование исследуемой пробы, мл; C – концентрация раствора перманганата калия, равная 0.002 моль/л; V – объем пробы, взятой для анализа, мл; K_p – коэффициент разбавления пробы; 8 – атомная масса кислорода; 5 – стехиометрический коэффициент.

Интенсивность фотосинтеза, темновой фиксации углекислоты, внеклеточную первичную продукцию, а также коэффициент К_т, характеризующий зависимость интенсивности фотосинтеза от подводной освещенности, определяли радиоуглеродным методом в соответствии со стандартной техникой (Sorokin, Kadota, 1972; Кузнецов, Дубинина, 1989). Радиоактивную метку в форме NaH¹⁴CO₃ (10 мкКи на пробу) вносили в пробы воды в гер-

метично закрытых флаконах объемом 50 мл. Темновой вариант флаконов помещали в светонепроницаемые мешки. Незатемненный и темновой варианты проб экспонировали в озере *in situ*, размещая флаконы на соответствующих глубинах. В отдельные пробы перед экспозицией добавляли в конечной концентрации 10^{-7} мМ 3-(3,4-дихлорфенил)-1,1-диметилмочевину (DCMU) в качестве ингибитора окислительного фотосинтеза. В этих пробах фотосинтез мог проходить только за счет аноксигенного фотосинтеза. После 1-суточной экспозиции пробы фиксировали 40% формалином (1 мл на 100 мл пробы). После фиксации пробы фильтровали через мембранные фильтры "Сынпор" (Чехословакия) с диаметром пор 0.2 мкм. Фильтры обрабатывали слабым раствором HCl, что позволяло избавиться от остаточного $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$. Радиоактивность фильтров соответствовала включению ^{14}C в клетки микроорганизмов, оставшихся на фильтрах. Радиоактивность подкисленного фильтрата соответствовала включению радиоактивного углерода во внеклеточную продукцию — растворенное органическое вещество. Ее измеряли после высушивания аликвоты фильтрата на подложке при температуре 50–60°C. Фотосинтетическую продукцию рассчитывали как разницу между темными и светлыми флаконами. Продукцию окислительного фотосинтеза рассчитывали за вычетом аноксигенного фотосинтеза, определенного в светлых флаконах с добавлением DSMU.

Общее количество бактерий подсчитывали под микроскопом с объективом $\times 100$ прямым счетом на мембранных фильтрах (диаметр пор 0.2 мкм) после их окраски эритрозином.

Среди бактерий, участвующих в трансформации соединений серы и железа, выявляли следующие специализированные группы: фототрофные зеленые и пурпурные серобактерии, сульфатредуцирующие, нефотосинтезирующие сероокисляющие автотрофные ("тионовые"), сероокисляющие гетеротрофные бактерии и железобактерии. Фототрофные бактерии, железобактерии и бесцветные серобактерии подсчитывали на неокрашенных фильтрах при микроскопировании в отраженном свете (Кузнецов, Дубинина, 1989), а их принадлежность к группам ориентировочно определяли по морфологическим признакам. Для железобактерий показателем, помимо морфологии, служила отмечаемая при микроскопии орудненность клеток. Относительную численность пурпурных и зеленых серобактерий, нефотосинтезирующих сероокисляющих, а также сульфатредуцирующих бактерий учитывали методом серийных разведений на селективных средах. АФБ учитывали на модифицированной среде Пфеннига (Горленко и соавт., 1980). Сульфатредуцирующие бактерии (СРБ) учитывали на модифицированной среде

Постгейта с лактатом, что позволяло учитывать СРБ с неполным и полным окислением органического субстрата (Widdel, Pfennig, 1981). Автотрофные сероокисляющие бактерии (тионовые), окисляющие тиосульфат, выявляли на среде Баллсруда с нейтральной величиной рН в аэробных и анаэробных условиях с нитратом в качестве акцептора электронов; гетеротрофные бактерии, окисляющие тиосульфат, учитывали по росту на среде Лондона с дрожжевым экстрактом и способности при пересеве расти на рыбо-пептонном агаре (РПА) (Вайнштейн, 1979). Способность к окислению сероводорода у выделенных в культуры гетеротрофных бактерий определяли в лабораторных экспериментах на аппарате Варбурга (Вайнштейн, 1977) в сравнении с культурами автотрофных сероокисляющих (тионовых) бактерий *Thiomonas intermedia* и *Thiobacillus thioparus*, полученными из рабочей коллекции лаборатории водной микробиологии Института биологии внутренних вод РАН.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Полевые исследования проводили в конце июня и в начале июля 1974 г. в наиболее глубоких точках водоемов. Гидрохимические характеристики и распределение микроорганизмов во всех озерах выявили отчетливую зональность водной толщи.

Оз. Залив Некрасова. Зона температурного скачка в период исследования простиралась от 1 до 3 м, однако кислород в воде исчезал уже на глубине 2 м, а следы сероводорода обнаруживались на глубине 1.75 м от поверхности. С этой же глубины происходило резкое падение величины окислительно-восстановительного потенциала (рис. 1а, 1б). В эпилимнионе рН был 7.5, а в мономимнионе повышался до 8.3. В неперемешиваемой анаэробной зоне концентрировалась взвесь гидрата окиси железа, оседавшая вместе с орудненными клетками железобактерий. Из-за избытка железа практически весь сероводород находился в виде сульфида железа. Взвесь сульфида железа оседала, его концентрация в воде была неравномерной и составляла у дна 3 мг S^{2-} /л. В августе 1978 г. содержание сульфида возрастало до 4 мг/л при концентрации Fe(II) и Mn(II) 6 и 2 мг/л соответственно (Лаптева и соавт., 1985).

Как видно на рис. 1в, в водоеме отмечена высокая (до $1.2 \text{ мг С л}^{-1} \text{ сут}^{-1}$) скорость фотосинтеза, обусловленная развитием цианобактерий и водорослей до глубины 1.5 м. Пик аноксигенного фотосинтеза ($706 \text{ мкг С л}^{-1} \text{ сут}^{-1}$) был зарегистрирован на глубине 1.5–2.5 м. Внеклеточная продукция фототрофных бактерий составляла 12.5% от клеточной. Пик темновой ассимиляции углекислоты ($146 \text{ мкг С л}^{-1} \text{ сут}^{-1}$) приходился на границу анаэ-

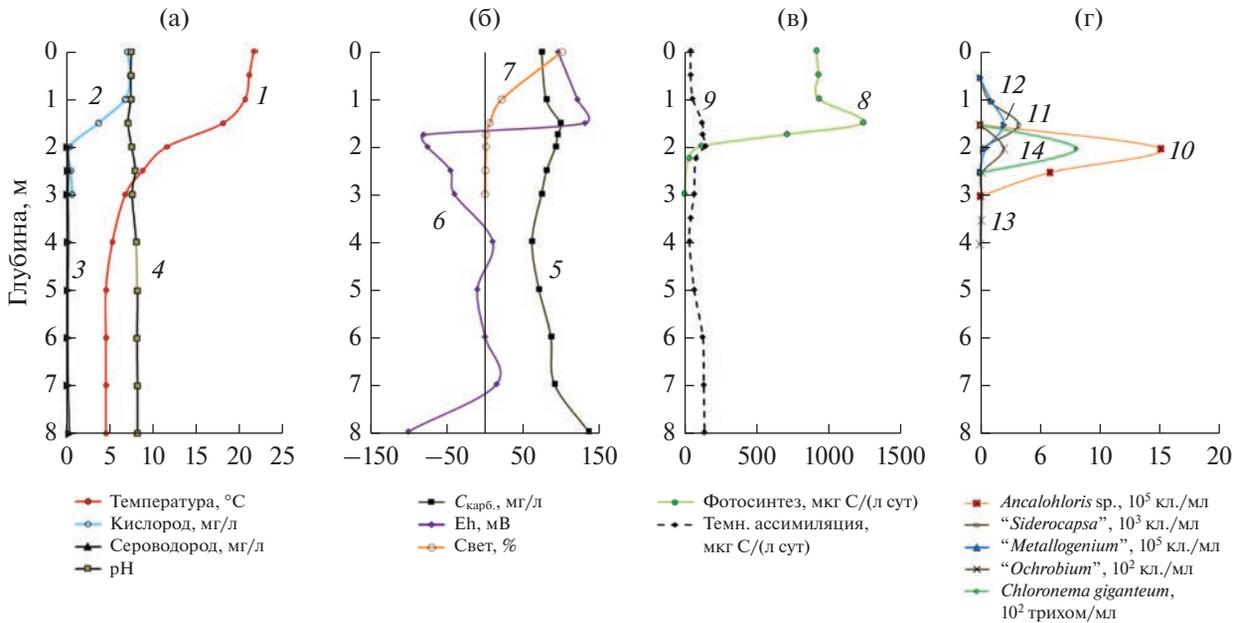


Рис. 1. Гидрохимические характеристики и распределение продукционных процессов и микроорганизмов в водной толще оз. Залив Некрасова. По вертикальной оси – глубина, м. По горизонтальной оси: (а): 1 – температура, °С; 2 – кислород, мг/л; 3 – сероводород, мг/л; 4 – рН; (б): 5 – содержание карбонатов, мг/л; 6 – Eh, мВ; 7 – свет, %; (в): 8 – фотосинтез, мкг С/(л сут); 9 – темновая ассимиляция углерода, мкг С/(л сут); (г): численность бактерий: 10 – *Ancalochloris* sp., 10⁵ кл./мл; 11 – *Siderocapsa*, 10³ кл./мл; 12 – *Metallogenium*, 10⁵ кл./мл; 13 – *Ochrobium*, 10⁵ кл./мл; 14 – *Chloronema giganteum*, 10² трихом/мл.

робной зоны и, вероятно, был обусловлен возрастанием на этом горизонте общей численности микроорганизмов (рис. 1в).

Несмотря на отсутствие свободного сероводорода в воде, на границе мнимоминиона от 1.75 до 2.00 м происходило интенсивное развитие зеленых серобактерий с короткими простеками – *Ancalochloris* sp. – до 1.5 × 10⁶ кл./мл. В меньшем количестве присутствовали агрегированные зеленые бактерии *Chlorobium luteolum* (прежнее название *Pelodictyon luteolum*) и симбиотические консорциумы *Chlorochromatium aggregatum*, нитчатые хлоробактерии *Chloronema giganteum*, а также пурпурные бактерии *Thiocapsa rosea* (прежнее название *Amoebobacter roseus*) (рис. 1г). На верхней границе хемоклина найдены бесцветные серобактерии морфотипов *Macromonas bipunctata* и *Thiospira* sp., а также выявленные на среде Лондона гетеротрофные сероокисляющие бактерии (прежнее название *Thiobacillus trautweini*), у которых окисление тиосульфата сопровождалось подщелачиванием среды. Такое подщелачивание характерно при окислении тиосульфата не до сульфата, а до тетрагидратата и высших политионатов (Hutt, 2017). По морфологическим и физиологическим признакам выделенная нами из воды озера культура *Thiobacillus trautweini* соответствовала псевдомонадам (хемогетеротрофные грамотрицательные бесспорные палочки с одним полярным жгутиком, в среде с нитратами микроорганизм

был способен к анаэробному росту). Было обнаружено, что на среде РПА рост выделенных микроорганизмов происходил с образованием мелких матовых колоний, а на среде Лондона рост с образованием мелких бесцветных, росинчатых колоний.

В микроаэробной зоне хемоклина с концентрацией кислорода около 4 мг/л произошло значительное развитие железобактерий морфотипов *Metallogenium* и *Siderocapsa*. Железобактерии *Ochrobium tectum* и хлоробактерии *Chloronema giganteum* с умеренно ожелезненным чехлом размещались на границе анаэробной и микроаэробной зоны с концентрацией кислорода 0.0–0.4 мг/л (рис. 1г).

Оз. Свято. В конце июня и начале июля 1974 г. наблюдалось резкое падение температуры в толще воды от поверхности до глубины 4 м. Далее уменьшение температуры шло плавно, и с 6.5 м она оставалась неизменной, составляя 4.6°C (рис. 2а). Кислород присутствовал до глубины 6.5 м, при этом его концентрация не снижалась равномерно, но были отмечены три пика: у поверхности (8.16 мг/л) и на глубинах 1.5 и 4.5 м (6.80 и 4.00 мг/л соответственно). В интервале от 5 до 7 м вода содержала кислород и сероводород одновременно. Содержание сульфида у дна достигало 3.4 мг/л. К концу лета содержание сульфида у дна увеличивалось до 11 мг/л, а содержание Fe(II) до 25 мг/л в присутствии 10 мг Mn(II)/л (Лаптева и соавт.,

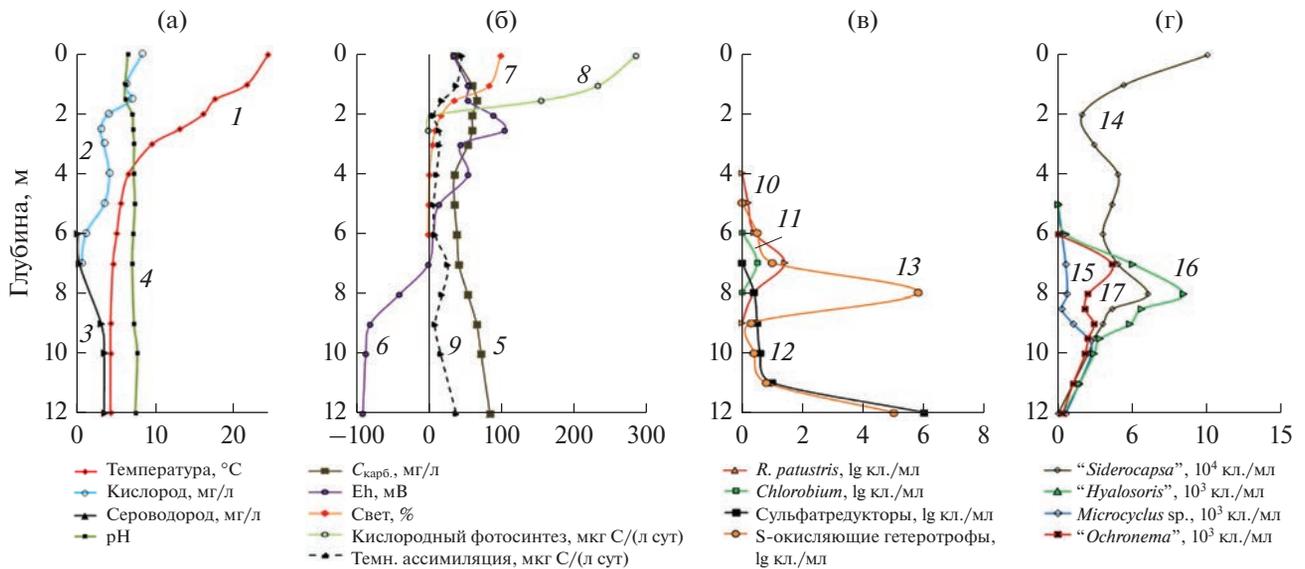


Рис. 2. Гидрохимические характеристики и распределение микроорганизмов в водной толще оз. Свято. По вертикальной оси — глубина, м. По горизонтальной оси: (а): 1 — температура, °С; 2 — кислород, мг/л; 3 — сероводород, мг/л; 4 — рН; (б): 5 — содержание карбонатов, мг/л; 6 — Eh, мВ; 7 — свет, %; 8 — фотосинтез, мкг С л⁻¹ сут⁻¹; 9 — темновая ассимиляция углерода, мкг С/(л сут); (в): численность бактерий: 10 — *R. palustris*, lg кл./мл; 11 — *Chlorobium* sp., lg кл./мл; 12 — сульфатредуцирующие бактерии, lg кл./мл; 13 — сероокисляющие гетеротрофные бактерии, lg кл./мл; (г): численность бактерий: 14 — “*Siderocapsa*”, 10⁴ кл./мл; 15 — *Microcyclus* sp., 10³ кл./мл; 16 — “*Hyalosoris*”, 10³ кл./мл; 17 — “*Ochronema*”, 10³ нитей/мл.

1985). Окислительно-восстановительный потенциал в период наших исследований имел отрицательные значения в анаэробной зоне от 7 м до дна, величина рН повышалась в нижележащих горизонтах до нейтральных и слабощелочных значений (рис. 2а, 2б). Связанная и свободная углекислота в вертикальном распределении имела два пика: в зоне угасания фотосинтеза и у дна (рис. 2б).

Интенсивность фотосинтеза была максимальной у поверхности (286 мкг С л⁻¹ сут⁻¹) и плавно убывала до полного отсутствия на глубине 2.5 м (рис. 2б). Основными первичными продуцентами в исследованный период были диатомеи и одноклеточные цианобактерии. Проникающий в водную толщу свет в середине лета не достигал границы сероводородной зоны, поэтому бактериальный фотосинтез здесь не был зарегистрирован. Из проб этой зоны на элективных средах были обнаружены лишь единичные палочковидные зеленые серобактерии, характерные для некоторых видов рода *Chlorobium*, а также несерные пурпурные бактерии, морфологически сходные с *R. palustris* (50 кл./мл).

Основной группой бактерий, хемотрофно окисляющих сульфид, как и в оз. Свято, в июне–июле 1974 г. были гетеротрофные бактерии, не способные к автотрофному росту на среде Баалсруда по типу классических тионовых (с подкислением среды за счет образования сульфатов и/или внеклеточным отложением элементной серы), но росшие на среде Лондона с окислением тиосульфата с защелачиванием среды, что харак-

терно при образовании полиитионатов. Характеристики выделенной культуры полностью совпадали с приведенными выше для псевдомонад “*Thiobacillus trautweini*”, выделенным из воды оз. Залив Некрасова. Численность этих бактерий в оз. Свято была наивысшей — около 100×10^3 кл./мл — в зоне совместного присутствия H₂S и O₂ на глубине 7–8 м и в иловых отложениях (рис. 2в).

Низкая концентрация сероводорода в молимонии оз. Свято объясняется незначительной численностью сульфатредуцирующих бактерий: в водной толще их обнаружили в количестве не более 10 кл./мл. Однако в поверхностном слое ила численность сульфатредукторов была выше и составляла примерно 100×10^3 кл./см³.

Поверхностные воды оз. Свято содержат гумусовые комплексы железа. Таким образом, на верхней границе анаэробной зоны создаются благоприятные условия для развития железобактерий. По данным микроскопии в процессах окисления железа доминировали бактерии морфотипа “*Siderocapsa*” (рис. 2г). Численность этих железобактерий образовывала три пика в вертикальном распределении: у поверхности, на уровне температурного скачка и на верхней границе анаэробной зоны.

Другой группой железобактерий, численность которых достигала 32×10^3 нитей/мл, были представители “*Ochronema*”, при этом слизистые чехлы клеток были значительно оруднены, а в зоне контакта аэробной и анаэробной зон можно было

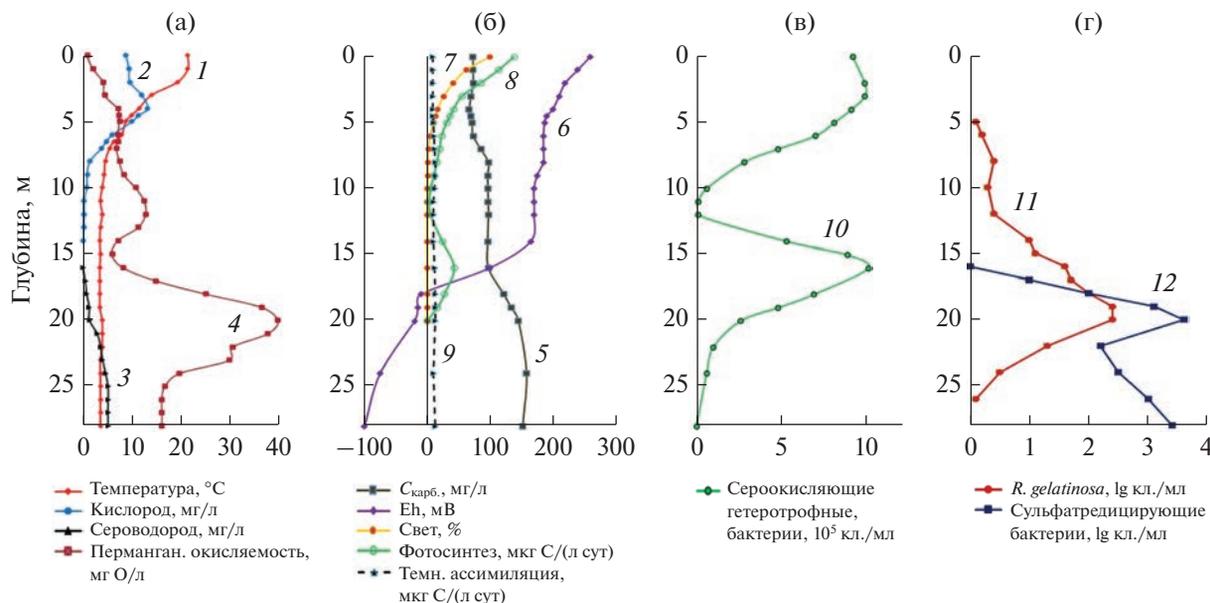


Рис. 3. Гидрохимические характеристики и распределение продукционных процессов и микроорганизмов в водной толще оз. Светлояр. По вертикальной оси – глубина, м. По горизонтальной оси: (а) 1 – температура, °С; 2 – кислород, мг/л; 3 – сероводород, мг/л; 4 – перманганатная окисляемость, мг О/л; (б) 5 – содержание карбонатов, мг/л; 6 – Eh, мВ; 7 – свет, %; 8 – фотосинтез, мкг С/(л сут); 9 – темновая ассимиляция углерода, мкг С/(л сут); (в): 10 – численность сероокисляющих гетеротрофных бактерий, 10⁵ кл./мл; (г): численность бактерий: 11 – *R. gelatinosa*, lg кл./мл; 12 – сульфатредуцирующие бактерии, lg кл./мл.

наблюдать “выползание” нитей из сильно орудненных чехлов. В целом развитие бактерий “*Ochronema*” было приурочено к микроаэробной зоне (рис. 2г). В миксолимнионе были также обнаружены железобактерии “*Spirothrix pseudovaculata*”.

Кроме железобактерий в микроаэрофильных условиях концентрировались одноклеточные кокковидные бактерии с газовыми вакуолями, сходные с “*Hyalosiris*” и “*Plectonema*”. У этой группы бактерий отложение окисного железа в слизистых капсулах не наблюдали. Две другие группы бактерий с газовыми вакуолями, не относящиеся к железобактериям и морфологически сходные с *Microcycilus* и “*Pelonema*”, обнаружили максимумы численности в анаэробной зоне водной толщи (рис. 2г).

Оз. Светлояр. В середине лета 1974 г. свет в водоем проникал до глубины 10 м при прозрачности по диску Секки 3 м, температурный перепад был хорошо выражен и располагался на глубине от 2 до 10 м (рис. 3а, табл. 1). Температура воды гипolimниона составляла 4°С. Кислородная зона распространялась от поверхности до 14 м, при этом максимум содержания O₂ находился на глубине 4 м и совпал с верхней границей температурного скачка. От 14 до 16 м простиралась зона, не содержащая ни кислорода, ни сероводорода. Следы H₂S появлялись ниже, и его концентрация увеличивалась ко дну до 5 мг/л. Резкое снижение окис-

лительно-восстановительного потенциала в воде совпадало с появлением сульфида, достигая в придонной области величины Eh –100 мВ. Содержание карбонатных форм углерода в сульфидсодержащей зоне почти вдвое превышало их концентрации в верхних водных горизонтах. Значения рН в эуфотической зоне колебались от 7.5 до 8.2, в свободной от H₂S зоне гипolimниона были близки 7.0, а в ее сероводородной части – 7.5.

В соответствии со световыми условиями значительный фотосинтез водорослей зарегистрирован до глубины 10 м с максимумом 150 мкг С л⁻¹ сут⁻¹ у поверхности (рис. 3б). Небольшое увеличение фотосинтеза обнаружено также в бескислородной зоне. Добавление в пробы ингибитора второй системы фотосинтеза диурона полностью подавляло световую фиксацию углекислоты. На этом основании сделан вывод, что на глубине 16 м локально происходит, хотя и с небольшой интенсивностью, кислородный фотосинтез. При микроскопии отобранных проб здесь обнаружены одноклеточные цианобактерии. Таким образом, образование кислорода без его существенного накопления происходило и в формально бескислородной зоне. В целом первичная продукция в оз. Светлояр синтезировалась преимущественно в зоне миксолимниона и на границе металимниона.

Перманганатная окисляемость, суммарно регистрирующая как легко окисляемое органическое вещество, так и восстановленные минераль-

Таблица 1. Сравнительная характеристика условий, численности фототрофных, железо и сульфид-окисляющих бактерий в Старопустыньских озерах в летний период (1974 г. — наши данные; 1978 г. — по: Лаптева и соавт., 1985)

Характеристики	Оз. Залив Некрасова		Оз. Свято	
	Июнь 1974	Август 1978	Июнь 1974	Август 1978
Период исследований				
Верхняя граница анаэробной зоны, м	1.75	2.00	6.50	2.00
Прозрачность по диску Секки, м	1.0	1.0	1.2	1.0
Сульфид у дна, мг/л	3.0	4.0	3.6	12.0
Содержание Fe(II), мг/л	0.0	6.0	0.0	25.0
Содержание Mn(II), мг/л	0.0	1.2	0.0	10.0
“ <i>Ancalochloris perfilevii</i> ”, кл./мл	1.5×10^6	0.5×10^6	0.0	6×10^3
“ <i>Ancalochloris</i> sp.”, кл./мл	>10	0.0	0.0	3.3×10^5
<i>Chlorobium luteolum</i> (ранее <i>P. luteolum</i>), кл./мл	>10	>10	0.0	5×10^5
“ <i>Chlorochromatium aggregatum</i> ”, кл./мл	>10	2×10^6	0.0	0.0
“ <i>Chloronema giganteum</i> ”, трихомы/мл	8×10^2	2×10^4	0.0	>10
<i>Thiocapsa rosea</i> , кл./мл	>10	0.0	0.0	0.0
Сульфид/тиосульфат-окисляющие гетеротрофные бактерии, кл./мл	>10	0.0	1×10^5	0.0
<i>Arthrobacter</i> sp., кл./мл	4.5×10^3	8×10^4	0.0	7×10^4
“ <i>Ochrobium tectum</i> ”, кл./мл	2×10^5	8.5×10^4	0.0	3×10^4
“ <i>Siderococcus limoniticus</i> ”, кл./мл	>10	>10	>10	>10
“ <i>Metallogenium</i> ”, кл./мл	2×10^5	0.0	0.0	0.0
“ <i>Ochronema</i> ”, трихомы/мл	0.0	0.0	32×10^3	0.0
Фотосинтез кислородный, мкг С л ⁻¹ сут ⁻¹	1234	50	120	17
Фотосинтез аноксигенный, мкг С л ⁻¹ сут ⁻¹	54	270	286	130
Темновая фиксация CO ₂ в хемоклине, мкг С л ⁻¹ сут ⁻¹	124	15	14	10

ные соединения, была наибольшей под горизонтами фотосинтеза (рис. 3а). Ее нижний пик на глубине 28 м был особенно большим, отражающим присутствие восстановленных соединений, связанных с анаэробными биологическими процессами. В этой области наблюдалась повышенная для данного озера темновая фиксация углекислоты — 15 мкг С л⁻¹ сут⁻¹ (рис. 3б).

Аноксигенные фотосинтезирующие бактерии, ввиду неблагоприятных световых условий, практически отсутствовали в зоне появления сульфида. Небольшое количество несерных пурпурных бактерий, сходных с *Rhodocyclus gelatinosus*, — до 100 кл./мл на глубине 20–22 м, указывает на незначительную роль этих бактерий в круговороте веществ в водоеме.

Хемолитоавтотрофные бактерии, окисляющие серные соединения на среде Баалсруда, обнаружены не были. Основная роль в аэробном окислении сероводорода могла принадлежать бактериям, которые вырастали на среде Лондона с подщелачиванием среды, в количестве до 1.5×10^6 кл./мл

(рис. 3в). По морфологическим и физиологическим признакам выделенная из воды озера культура “*Thiobacillus trautweini*” соответствовала псевдомонадам: грамотрицательные бесспорные палочки с одним полярным жгутиком, в среде с нитратами способны к анаэробному росту. На среде Лондона рост с образованием мелких бесцветных, росинчатых колоний. В отличие от культур, выделенных из воды Старопустыньских озер, мы наблюдали на среде РПА рост с образованием бледно-зеленых колоний. Эти бактерии были сосредоточены на верхней границе распространения H₂S, то есть в зоне, где цианобактерии продуцировали кислород без его накопления.

Численность сульфатредуцирующих бактерий в озере не превышала тысяч клеток в 1 см³ как в воде, так и в иловых отложениях (рис. 3г). По-видимому, главным фактором, ограничивающим численность СРБ, было низкое содержание сульфатов в мнимомлимнионе.

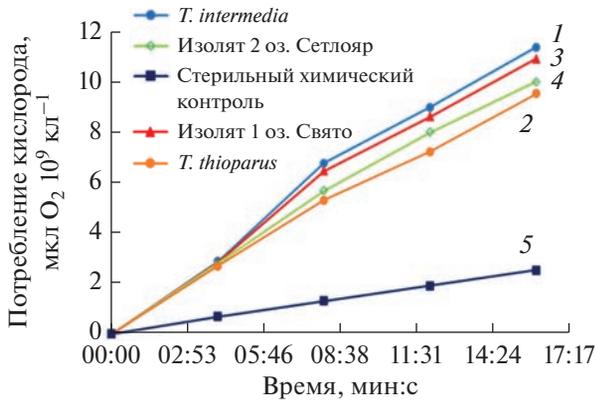


Рис. 4. Окисление сероводорода, измеренное на аппарате Варбурга по потреблению кислорода при 25°C и pH 7 культурами тионовых бактерий *Thiomonas intermedia* (1) и *Thiobacillus thioparus* (2) и двух штаммов выделенных из озера гетеротрофных сероокисляющих бактерий (3 – изолят из оз. Свято и 4 – изолят из оз. Светлояр) в сравнении со стерильным химическим окислением (5) (Вайнштейн, 1977). По вертикальной оси: потребление кислорода, мкл O₂/10⁹ кл.; по горизонтальной оси: время, мин.

ОБСУЖДЕНИЕ

Исследованные карстовые озера Нижегородской области – Свято и Залив Некрасова (Старопустыньские озера), а также оз. Светлояр, характеризуются устойчивой стратификацией с признаками меромиксии. В анаэробной зоне всех исследованных озера содержится сульфид, при этом его концентрация в период исследований даже в придонной области не превышала 5.1 мг/л.

Старопустыньские озера Залив Некрасова и Свято подпитываются стоками из прибрежных болот и торфяников, содержащих гумусовые вещества, хелатирующие железо, что заметно повышает цветность воды. В этих озерах наряду с сульфидом в монимолимнионе накапливалось значительное количество свободного закисного железа, оседающего вместе с орудненными клетками железобактерий. Сульфид связывает железо, с образованием практически нерастворимых сульфидов железа, выпадающих в осадок. Подобные реакции происходили в истории Земли в переходный период в процессе формирования сульфидсодержащего Протерозойского стратифицированного океана (Negler et al., 2008; Poulton, Canfield, 2011).

Отметим, что гидрологические и световые условия в июне–июле 1974 г. были благоприятны для развития анаэробных фототрофных бактерий только в оз. Залив Некрасова, защищенном от ветрового перемешивания. Интенсивность процессов круговорота серы и железа в нем особенно велика из-за высокого трофического уровня водоема. В летний период в нем в хемоклине происходит массовое развитие зеленых серобактерий

и многочисленных морфотипов железобактерий. В окислении сероводорода принимали участие также хемолитотрофные бесцветные серобактерии *Macromonas bipunctatum* и *Thiospira* sp. В озере Свято световые условия становятся благоприятными для развития АФБ в конце лета (табл. 1). В этот период в хемоклине появляются планктонные виды фототрофов, которые были обнаружены в оз. Залив Некрасова.

В окислении железа в Старопустыньских озерах активно участвовали железобактерии, среди которых имеются как хемоорганотрофные, так и хемоавтотрофные виды (Дубинина, Сорокина, 2014). Орудненные клетки железобактерий были отмечены именно в зоне оксиклина. Участие анаэробных фототрофных бактерий в окислении солей закисного железа в исследованных водоемах нами не доказано, однако следует обратить внимание на обнаруженные отложения оксидов железа в чехлах нитчатых хлоробактерий “*Chloronema giganteum*”, обитающих как в оз. Залив Некрасова, так и в оз. Свято. Ранее оруднение чехлов “*Chloronema*” отмечали в дистрофных димиктических озерах Карелии (Дубинина, Горленко, 1975; Gorlenko et al., 1983). Можно предположить, что эти фототрофные бактерии способны к феррофототрофии – использованию Fe⁺² в качестве донора электронов при фотосинтезе.

Несмотря на геологическое единство Старопустыньских озера и выявленное в период исследования расслоение воды, гидрохимический режим оз. Свято близок к димиктическому типу. АФБ в этом озере появлялись позже, в августе, когда граница анаэробной зоны поднималась до уровня проникновения света (табл. 1). В целом видовой состав фототрофных и железобактерий в Старопустыньских озерах типичен для продуктивных полигумозных димиктических озера с высоким содержанием железа (Gorlenko et al., 1983, Дубинина, Сорокина, 2014).

Оз. Светлояр среди исследованных озера имеет самый низкий трофический статус, относительно невысокую цветность и практически не содержит в монимолимнионе закисного железа. Граница распространения сероводорода в этом озере находится ниже эфотической зоны, что обуславливает отсутствие в нем слоя АФБ.

Отметим, что, основными аэробными бактериями, окисляющими сероводород в оксиклине исследованных озера, являлись хемогетеротрофные сероокисляющие бактерии, численность которых в максимальном случае достигала 1.5 × 10⁶, тогда как хемолитоавтотрофные сероокисляющие бактерии, окисляющие серные соединения с преимущественным образованием сульфатов и подкислением среды, отсутствовали. В 90-х годах при исследовании Черного моря (Сорокин, 2003) были получены аналогичные результаты, свидетельству-

ющие, что гетеротрофные бактерии, окисляющие сульфид/тиосульфат до полиитионатов, играют значительную роль в биогеохимическом цикле серы. Наиболее подробно на настоящий момент эта тема рассмотрена в диссертации Л.П. Хатта (Hutt, 2017), но вопрос о возможности получения достаточной для роста энергии при реакции окисления до полиитионатов и механизмы этого процесса остаются неясными (Hutt, 2017). Тем не менее, нами была проведена проверка способности выделенных гетеротрофных серных бактерий к активному окислению сероводорода в культурах: полиитионат-образующие штаммы были сравнены с культурами сульфат-образующих тионовых бактерий: автотрофных *Thiobacillus thioparus* и миксотрофных *Thiomonas intermedia*. Полученные данные (рис. 4) позволяют заключить, что физиологическая группа гетеротрофных бактерий действительно активно окисляет сероводород и может играть важную роль в серном цикле озер.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы приносят благодарность руководителям Биостанции Национального исследовательского Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского за предоставленную возможность использования базы биостанции при проведении полевых работ на Старопустыньских озерах.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эта статья не содержит результатов каких-либо исследований с участием животных или людей, выполненных кем-либо из авторов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Алекин О.А., Семенов А.Д., Скопинцев Б.А. Руководство по химическому анализу вод суши. Л.: Гидрометеоздат, 1973. 272 с.

Alekin O.A., Semenov A.D., Skopintsev B.A. Guide to the Chemical Analysis of Land Waters. Leningrad: Gidrometeoizdat, 1973. 272 p. (in Russian)

Баянов Н.Г., Никишин В.И. Светлояр. По следам былых экспедиций // Нижний Новгород, Комитет охраны природы и управления природопользованием Нижегородской области. 2005. 152 с.

Bayanov N.G., Nikishin V.I. Svetloyar. In the footsteps of erstwhile expeditions // Nizhny Novgorod, Committee for

Nature Protection and Environmental Management of the Nizhny Novgorod Region. 2005. 152 p. (in Russian)

Вайнштейн М.Б. Окисление сероводорода тионовыми бактериями // Микробиология. 1977. Т. 46. С. 1114–1116.

Vainshtein M.B. Oxidation of hydrogen sulfide by thionic bacteria. // Microbiology (Moscow). 1977. V. 46. P. 988–999.

Вайнштейн М.Б. Распространение тионовых бактерий в озерах // Микробиологические и химические процессы деструкции органического вещества в водоемах / Под ред. Романенко В.И., Скопинцева Б.А. Л.: Наука, 1979. С. 115–128.

Vainshtein M.B. Distribution of thionic bacteria in lakes // Microbiological and Chemical Processes of Destruction of Organic Matter in Water Bodies / Eds. Romanenko V.I., Skopintsev B.A. L.: Nauka, 1979. P. 115–128. (in Russian)

Горленко В.М., Вайнштейн М.Б., Чеботарев Е.Н. Бактерии круговорота серы и железа в низкосульфатном меромиктическом озере Кузнециха // Микробиология. 1980. Т. 49. С. 804–812.

Gorlenko V.M., Vainshtein M.B., Chebotarev E.N. Bacteria of the sulfur and iron cycle in the low sulfate meromictic lake Kuznechikha // Microbiology (Moscow). 1980. V. 49. P. 653–659.

Горленко В.М., Локк С.И. Вертикальное распределение и особенности видового состава микроорганизмов некоторых стратифицированных озер Эстонии // Микробиология. 1979. Т. 48. С. 351–359.

Gorlenko V.M., Lokk S.I. Vertical distribution and species composition of microorganisms in some stratified lakes in Estonia // Microbiology (Moscow). 1979. V. 48. P. 283–351.

Дубинина Г.А., Горленко В.М. Новые нитчатые скользящие зеленые бактерии с газовыми вакуолями // Микробиология. 1975. Т. 44. С. 511–517.

Dubinina G.A., Gorlenko V.M. New filamentous gliding green bacteria with gas vacuoles // Microbiology (Moscow). 1975. V. 44. P. 511–517. (in Russian)

Дубинина Г.А., Сорокина А.Ю. Нейтрофильные литотрофные железоокисляющие прокариоты и их участие в биогеохимических процессах цикла железа // Микробиология. 2014. Т. 83. С. 127–142.

Dubinina G.A., Sorokina A.Yu. Neutrophilic lithotrophic iron-oxidizing prokaryotes and their participation in the biogeochemical processes of the iron cycle // Microbiology (Moscow). 2014. V. 83. P. 1–14.

Кузнецов С.И., Дубинина Г.А. Методы изучения водных микроорганизмов. М.: Наука, 1989. 288 с.

Kuznetsov S.I., Dubinina G.A. Methods for Studying Aquatic Microorganisms. M.: Nauka, 1989. 288 p. (in Russian)

Лаптева Н.А., Дубинина Г.А., Кузнецов С.И. Микробиологическая характеристика некоторых карстовых озер Горьковской области // Гидробиол. журн. 1985. Т. 21. № 2. С. 61–68.

Lapteva N.A., Dubinina G.A., Kuznetsov S.I. Microbiological characteristics of some karst lakes in the Gorky region // Hydrobiol. J. 1985. V. 21. № 2. P. 61–68. (in Russian)

Рогозин Д.Ю. Меромиктические озера Северо-Минусинской котловины: закономерности стратификации и экология фототрофных серных бактерий. Красноярск: КНЦ СО РАН, 2019. 241 с.

- Rogozin D.Yu. Meromictic Lakes of the North Minusinsk Basin: Regularities of Stratification and Ecology of Phototrophic Sulfur Bacteria. Krasnoyarsk: KSC SB RAS, 2019. 241 p. (in Russian)
- Сорокин Д.Ю. Окисление неорганических серных соединений облигатно хемолитотрофными бактериями // Микробиология. 2003. Т. 72. С. 725–739.
- Sorokin D.Yu. Oxidation of inorganic sulfur compounds is obligatory by chemolithotrophic bacteria // Microbiology (Moscow). 2003. V. 72. P. 641–653.
- Bura-Nakic E., Viollier E., Jezequel D., Thiam A., Ciglenecki I. Reduced sulfur and iron species in anoxic water column of meromictic crater Lake Pavin (Massif Centre France) // Chem. Geol. 2009. V. 266. P. 320–326.
- Canfield D.E., Poulton S.W., Knoll A.H., Narbonne G.M., Ross G., Goldberg T., Strauss H. Ferruginous conditions dominated later Neoproterozoic deep-water chemistry // Science. New Series. 2008. V. 321. P. 949–952.
- Crowe S.A., Maresca J.A., Jones C., Strum A., Henny C., Fowle D.A., Cox R.P., Delong E.F., Canfield D.E. Deep-water anoxygenic photosynthesis in a ferruginous chemocline // Geobiology. 2014. V. 12. P. 322–339.
- Gorlenko V.M. Ecological niches of green sulfur and gliding bacteria // Green Photosynthetic Bacteria / Eds. Olson J.M., Ormerod J.G., Amesz J., Stackebrandt E., Truper H.G. N.Y.: Plenum, 1988. P. 257–267.
- Gorlenko V.M., Dubinina G.A., Kuznetsov S.I. The Ecology of Aquatic Microorganisms. Stuttgart: E. Schweizerbart-sche Verlagsbuchhandlung, 1983. 252 p.
- Hamilton T.L., Bovee R.J., Thiel V., Sattin R., Mohr W., Schaperdoth I., Vogl K., Gilhooly W.P., Lyons T.W., Tomsho L.P., Schuster S.C., Overmann J., Bryant D.A., Pearson A., Macalady J.L. Coupled reductive and oxidative sulfur cycling in the phototrophic plate of a meromictic lake // Geobiology. 2014. V. 12. P. 451–468.
- Hegler F., Posth N.R., Jiang J., Kappler A. Physiology of phototrophic iron(II)-oxidizing bacteria: implications for modern and ancient environments // FEMS Microbiol. Ecol. 2008. V. 66. P. 250–260.
- Heising S., Richter L., Ludwig W., Schink B. *Chlorobium ferrooxidans* sp. nov., a phototrophic green sulfur bacterium that oxidizes ferrous iron in coculture with a “*Geospirillum*” sp. strain // Arch. Microbiol. 1999. V. 172. P. 116–124.
- Hutt L.P. Taxonomy, physiology and biochemistry of the sulfur Bacteria // Ph.D. Theses. Plymouth: University of Plymouth, 2017. 300 p. <https://pearl.plymouth.ac.uk/handle/10026.1/8612>
- Lambrech N., Stevenson Z., Sheik C.S., Pronschinske M.A., Tong H., Swanner E.D. “*Candidatus Chlorobium masyuteum*”, a novel photoferrotrophic green sulfur bacterium enriched from a ferruginous meromictic lake // Front. Microbiol. 2021. V. 12. Art. 695260.
- Poulton S.W., Canfield D.E. Ferruginous conditions: a dominant feature of the ocean through Earth’s history // Elements. 2011. V. 7. P. 107–112.
- Savichev A.S., Kokryatskaya N.M., Zabelina S.A., Rusanov I.I., Zakharova E.E., Veslopolova E.F., Lunina O.N., Patutina E.O., Bumazhkin B.K., Gruzdev D.S., Sigalevich P.A., Pimenov N.V., Kuznetsov B.B., Gorlenko V.M. Microbial processes of the carbon and sulfur cycles in an ice-covered, iron-rich meromictic Lake Svetloe (Arkhangelsk region, Russia) // Environ. Microbiol. 2017. V. 19. P. 659–672.
- Sorokin Y.I., Kadota H. Techniques for the assessment of microbial production and decomposition in fresh waters // IBP Handbook no. 23. Oxford, UK: Blackwell Scientific Publications, 1972. 112 p.
- Straub K.L., Rainey F.A., Widdel F. *Rhodovulum indosum* sp. nov. and *Rhodovulum robiginosum* sp. nov., two new marine phototrophic ferrous-iron-oxidizing purple bacteria // Int. J. Syst. Bacteriol. 1999. V. 49. P. 729–735.
- Van Gernerden H., Mass J. Ecology of phototrophic sulfur bacteria // Anoxygenic Photosynthetic Bacteria / Eds. Blankenship R.E., Madigan M.T., Bauer C.E. Netherlands, Kluwer Academic Publishers, 1995. P. 49–85.
- Walter X.A., Picazo A., Miracle M.R., Vicente E., Camacho A., Aragno M., Zopfi J. Phototrophic Fe(II)-oxidation in the chemocline of a ferruginous meromictic lake // Front. Microbiol. 2014. V. 5. Art. 713.
- Widdel F., Pfennig N. Studies on dissimilatory sulfate-reducing bacteria that decompose fatty acids // Arch. Microbiol. 1981. V. 129. P. 395–400.
- Widdel F., Schnell S., Heising S., Ehrenreich A., Assmus B., Schink B. Ferrous iron oxidation by anoxygenic phototrophic bacteria // Nature. 1993. V. 362. P. 834–836.

Microbiological Characteristics of Three Stratified Lakes in the Nizhny Novgorod Region

V. M. Gorlenko^{1,*} and M. B. Vainshtein²

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

²Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Pushchino Scientific Center for Biological Research, Russian Academy of Sciences, Pushchino, 142290 Russia
*e-mail: vgorlenko@mail.ru

Received October 20, 2022; revised November 7, 2022; accepted November 8, 2022

Abstract—Three karst lakes were investigated in the Nizhny Novgorod region: Staropustynskie lakes Svyato and Nekrasov Bay and Lake Svetloyar. The studied lakes belonged to the mesotrophic-eutrophic polyhumous type and were characterized by stable stratification with signs of meromixia. Their water columns were divided into aerobic and anaerobic zones, with the bottom water containing sulfide. Fe(II) compounds were also present in the Staropustynskie lakes. In the Lake Nekrasov Bay, the mixolimnion showed a high rate of oxy-

genic photosynthesis, up to $1.2 \mu\text{g C L}^{-1} \text{ day}^{-1}$, as well as a maximum of anoxygenic photosynthesis in the chemocline ($0.030\text{--}0.706 \mu\text{g C L}^{-1} \text{ day}^{-1}$) at a depth of 1.5–2.5 m. The peak of dark CO_2 assimilation ($0.146 \mu\text{g C L}^{-1} \text{ day}^{-1}$) occurred at a depth of 1.5 m in the oxycline zone. Anoxygenic phototrophic bacteria (APB) were found in the Lakes Zaliv Nekrasova and Svyato at the boundary of light penetration. Green sulfur bacteria with short cell prosthecae outgrowths, “*Ancalochloris* sp.,” predominated. Consortia “*Chlorochromatium aggregatum*” and filamentous chlorobacteria “*Chloronema giganteum*” were also found, their cell sheaths accumulated ferric iron salts. In the Staropustynskie lakes, various morphotypes of iron bacteria formed clusters in the microaerobic zone. In Lake Svetloyar the chemocline was located at a depth of 16 m, outside the photic zone, and the conditions were unfavorable for APB growth. In the studied lakes, heterotrophic aerobic bacteria played the main role in the aerobic oxidation of sulfur compounds in the chemocline zone.

Keywords: stratified karst lakes, sulfur and iron cycles, anoxygenic phototrophic bacteria, sulfur-oxidizing heterotrophic bacteria, iron bacteria

СТРУКТУРА И СЕЗОННАЯ ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ ГРУНТОВЫХ ВОД ГОРОДА МОСКВА¹

© 2023 г. Е. В. Груздев^а, Ш. А. Бегматов^а, А. В. Белецкий^а, А. В. Марданов^а,
Н. В. Равин^а, В. В. Кадников^{а, *}

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

*e-mail: vkadnikov@bk.ru

Поступила в редакцию 31.10.2022 г.

После доработки 08.11.2022 г.

Принята к публикации 09.11.2022 г.

Важным экологически значимым элементом водной экосистемы, чувствительным к изменениям условий окружающей среды, являются подземные воды, выходящие на поверхность в виде родников. Связанное с урбанизацией антропогенное воздействие ведет к изменению характеристик грунтовых вод, что, в свою очередь, влияет на состав микробных сообществ вод родников. С помощью высокопроизводительного секвенирования фрагментов генов 16S рибосомной РНК мы охарактеризовали состав микробных сообществ пяти естественных родников на территории Москвы в весенний, летний и зимний сезоны. Микробные сообщества каждого из родников в разные сезоны были близки между собой и четко отличались от микробиомов других родников. Среди архей, составлявших в среднем около 20% микробных сообществ, преобладали аммоний-окисляющие *Crenarchaeota*, а также представители *Nanoarchaeota*. Большинство бактерий относилось к филумам *Proteobacteria*, *Patescibacteria*, *Verrucomicrobiota*, *Chloroflexi* и *Bacteroidota*. В родниках с предположительно более глубоким залеганием источника воды значительные доли в микробных сообществах составляли автотрофные бактерии, в том числе железоокисляющие бактерии семейства *Gallionellaceae*, нитрификаторы и метанотрофы. Химический и молекулярный анализы не выявили загрязнений вод родников токсичными веществами и нефтепродуктами, а также присутствия патогенных микроорганизмов и индикаторов фекального загрязнения. Однако в весенний сезон в микробиомах воды увеличивались доли галофильных и углеводород-окисляющих бактерий, что может отражать поступление в подземные воды после таяния снега антигололедных реагентов и нефтепродуктов, которые успешно биодеградируются в почве.

Ключевые слова: городская экосистема, подземные воды, родники, микробное сообщество, 16S рРНК, высокопроизводительное секвенирование

DOI: 10.31857/S0026365622600717, **EDN:** AUIHZR

Скорость урбанизации постоянно растет, и, по прогнозам, к 2050 г. 60–80% населения мира будет жить в городах и мегаполисах. Городская среда влияет на значительную часть глобальных выбросов парниковых газов, образования отходов, потребления природных ресурсов и вызывает различные виды загрязнения окружающей среды (Grimm et al., 2008). Зеленая инфраструктура города – это один из важнейших инструментов повышения качества жизни в городах и поддержки устойчивого городского развития (McPhearson et al., 2016; Li et al., 2017). Эффективность предоставления важных экосистемных услуг зависит от состояния городских экосистем, определяемых их способ-

ностью противостоять множеству антропогенных стрессоров, связанных с городской средой.

Родники являются важным, экологически значимым элементом водной экосистемы, чувствительным к изменениям условий окружающей среды. Они имеют непосредственную связь с водноболотными угодьями и множеством поверхностных водоемов, вносящих важный вклад в биоразнообразие региона. Важной ролью родников является использование их населением в качестве источников питьевой воды, а так же развитие вокруг них рекреационной инфраструктуры. Формирование родников напрямую связано с грунтовыми водами. Активное использование водоносных слоев ведет к истощению грунтовых вод (Kløveet al., 2011). С другой стороны, строительство покрытий, препятствующих испарению влаги с поверхности земли, обильный полив газонов и

¹ Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0026365622600717 для авторизованных пользователей.

утечки вод из центрального водоснабжения, наоборот, способствуют повышению уровня грунтовых вод (Lerner et al., 1990; Sharp et al., 2010). Подпитка водоносного горизонта с участием антропогенного воздействия часто сопряжена с обильным поступлением неорганических питательных веществ. Например, наблюдается положительная корреляция между повышенным содержанием фосфатов в грунтовых водах и уровнем урбанизации (Huang et al., 2020). Подземные воды в городской черте могут иметь повышенные концентрации соединений азота, тяжелых металлов и летучих органических веществ (Kuroda, Fukushi, 2008). Антропогенное воздействие ведет к изменению характеристик грунтовых вод, что, в свою очередь, влияет на состав микробных сообществ родников.

Классический подход к исследованию микробного состава грунтовых вод и родников заключается в использовании микробиологических методик, основанных на культивировании микроорганизмов (Powell et al., 2003; Paul et al., 2004; Ильинский и соавт., 2010). Например, в качестве микробных индикаторов для оценки качества воды используют количество общих колиформ и фекальных колиформ (Plummer, Long, 2009). Однако полноценное определение состава микробного сообщества микробиологическими методами невозможно, поскольку в природных микробных сообществах, как правило, более 95–99% микроорганизмов не могут быть культивированы в стандартных лабораторных условиях и остаются неизвестными.

Использование современных молекулярно-генетических методов анализа микробиомов, основанных на высокопроизводительном секвенировании одновременно десятков тысяч фрагментов генов 16S рРНК, амплифицированных из метагеномной ДНК (т.е. выделенной непосредственно из анализируемого объекта, без культивирования микроорганизмов), позволяет подробно описать таксономическую структуру микробного сообщества и определить соотношение отдельных видов микроорганизмов, вплоть до минорных компонентов (Szekeres et al., 2018; Sonthiphand et al., 2019; Scharping, Garey, 2021).

В исследовании Scharping и Garey (2021) было показано, что в микробных сообществах подземных вод источника Сульфур-Спрингс в черте города Тампа (штат Флорида, США) преобладали представители порядков *Enterobacteriales*, *Betaproteobacteriales* и *Campylobacteriales*. При этом численность *Enterobacteriales* варьировала с течением времени. Другое исследование посвящено определению микробного состава грунтовых вод в Клуж-Напока (Румыния) (Szekeres et al., 2018). С помощью профилирования по генам 16S рРНК были определены составы сообщества грунтовых

вод г. Парма (Италия), где во всех образцах доминирующей таксономической группой является *Proteobacteria* (Zanini et al., 2019). Однако до настоящего времени микробные сообщества подземных вод Московского мегаполиса и влияние на них антропогенного воздействия не были детально изучены современными молекулярно-генетическими методами.

Большинство вышеупомянутых исследований были сосредоточены либо на культивировании патогенных организмов из грунтовых вод, либо на определении состава микробных сообществ загрязненных вод. Исследований по изучению микробных сообществ грунтовых вод мегаполисов методами высокопроизводительного секвенирования очень мало. В этой работе мы представляем результаты молекулярного профилирования состава прокариотических микробных сообществ 5 родников в городе Москва в различные сезоны года.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования и отбор образцов. Пробы воды отбирали из пяти родников, расположенных на территории города Москва, на протяжении 2021–2022 гг., в весенний (05–06.05.2021), летний (23.08.2021) и зимний период (27–28.01.22). В соответствии с сезоном отбора пробы маркировались sp (весна), sm (лето) и wt (зима). Первый источник (“Ясенево”) расположен на территории природно-исторического парка Битцевский лес, вблизи усадьбы Ясенево (обозначение проб “Ya”, 55.593202° N, 37.558043° E). Второй источник (“Битца”) также расположен в природно-историческом парке Битцевский лес, возле впадения Коньковского ручья в реку Чертановку (обозначение проб “Bi” 55.632274° N, 37.556833° E). Третий источник (“Коломенское”) входит в комплекс родников Кадочка, расположенном в Голосовом овраге парка Коломенское (обозначение проб “Kl” 55.663570° N, 37.663807° E). Четвертый родник (“Воробьевы горы”) расположен на территории природного заказника Воробьевы горы, ниже улицы Косыгина (обозначение проб “Vg” 55.718691° N, 37.538023° E). Проба из пятого родника (“Крылатское”) отбиралась на территории парка Крылатские холмы (обозначение проб “Kr” 55.753744° N, 37.423807° E).

Для отбора проб использовали PET канистры объемом 5 л (для анализа на нефтепродукты вода отбиралась в стеклянную тару объемом 500 мл). На месте отбора определяли температуру, pH и Eh с использованием pH-метра Hanna HI 8314F (“Hanna Instruments”, США).

Ионный состав проб определяли с использованием методов ионной хроматографии. Определение количественного элементного состава проб проводили с помощью метода масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой.

Содержание нефтепродуктов в воде определяли по методике измерений массовой концентрации флуориметрическим методом на анализаторе жидкости “Флюорат-02” (М 01-05-2012) (ПНД Ф 14.1:2:4.128-98). Диапазон измерений массовой концентрации нефтепродуктов составляет от 0.005 до 50 мг/дм³.

Для определения общей численности микроорганизмов (ОЧМ) отбирали 50 мл воды, фиксировали клетки глутаральдегидом (до 2%) и пропускали через фильтр с диаметром пор 0.22 мкм (“Millipore”, США). Затем фильтр окрашивали акридиновым оранжевым (2 мг/мл) и подсчитывали клетки под флуоресцентным микроскопом Olympus BX 41, оснащенный системой визуализации Image Scope Color (M). Клетки считали в 20 полях зрения.

Выделение ДНК, секвенирование и анализ последовательностей генов 16S рРНК. Отобранные пробы воды фильтровали с использованием нитроцеллюлозных фильтров с размером пор 0.22 мкм (“Sartorius”, Германия). Каждый фильтр разделяли на 3 равные части и разрушали перетиранием в жидком азоте в керамической ступке.

Суммарную ДНК из каждого образца выделяли с использованием набора DNeasy PowerSoil pro kit (“Qiagen”, Германия) и хранили при –20°C. ПЦР-амплификацию фрагментов гена 16S рибосомной РНК, включающих вариабельные области V3–V4, проводили с использованием универсальных праймеров 341F (5'-CCTAYGGGDBGCWS-CAG-3') и 806R (5'-GGACTACNVGGGTHTCTA-AT-3') (Frey et al., 2016). ПЦР фрагменты баркодировали, используя набор Nextera XT Index Kit v.2 (“Illumina”, США), и очищали с помощью Agencourt AMPure beads (“Beckman Coulter”, Brea, CA, США). Количество ДНК определяли с помощью Qubit dsDNA HS Assay Kit (“Invitrogen”, Carlsbad, CA, США). Затем пулированные ПЦР фрагменты секвенировали на Illumina MiSeq (в формате парных чтений, 2 × 300 нт). Пересекающиеся чтения объединяли с помощью FLASH v.1.2.11 (Magoc, Salzberg, 2011). Фильтрацию по качеству и кластеризацию последовательностей в оперативные таксономические единицы (ОТЕ) на уровне 97% идентичности последовательностей проводили с помощью программы Usearch (Edgar, 2010). Химерные последовательности и синглтоны удаляли при кластеризации алгоритмом Usearch. Для расчета относительной численности ОТЕ все чтения (включая синглтоны и низкокачественные) с помощью Usearch были картированы на последовательности ОТЕ с порогом идентичности 97%. Таксономическую идентификацию ОТЕ проводили в результате поиска по базе данных последовательностей рРНК SILVA v.138 (Quast et al., 2012) с использованием алгоритма VSEARCH v. 2.14.1 (Rognes et al., 2016).

Расчет индексов сходства и дерева Jaccard производили с помощью команды “beta_div” в USEARCH. Метод главных компонент (principal component analysis) вычислялся на языке программирования R с применением функции cmdscale.

Полученные последовательности фрагментов гена 16S рРНК депонированы в базу данных NCBI и доступны в рамках проекта BioProject PRJNA878171.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Физико-химические характеристики воды и общая численность микроорганизмов. Основные физические и химические характеристики воды, отобранной из исследуемых родников в весенний, летний и зимний сезоны, представлены в табл. 1. Все образцы воды имели нейтральный pH (6–8), значения которого не проявляли выраженных сезонных изменений. По показателю Eh родники четко разделялись на две группы. В родниках “Ясенево” и “Битца” этот показатель превышал +300 мВ, что соответствует полностью аэробным условиям. В родниках “Воробьевы горы” и “Крылатское” значения Eh были существенно ниже (<+109 мВ), что указывает на происхождение вод из более глубоких частично анаэробных горизонтов. На это же указывает значительно меньше, чем в остальных родниках, зависимость температуры от сезона отбора (табл. 1). К сожалению, информация о глубине и геологических характеристиках водоносных горизонтов, питающих исследуемые родники, в литературе отсутствует.

Среди измеренных ионов во всех образцах преобладали хлорид, кальций и натрий (рис. 1). Наиболее высокая минерализация была характерна для родника “Коломенское”, в котором, помимо высоких концентраций этих ионов, было детектировано высокое содержание сульфата и магния. Для родника “Битца” характерна натриево-хлоридная соленость. Родники “Воробьевы горы” и “Крылатское” имеют низкую минерализацию, обусловленную кальцием и магнием из числа катионов, хлоридом и сульфатом – из анионов, а содержание натрия значительно ниже. Низко минерализованной является также вода родника “Ясенево”, в которой преобладали кальций и сульфат. Большие различия наблюдались в концентрациях нитрата, которая составляла 10–20 мг/л в родниках “Ясенево”, “Коломенское” и “Крылатское”, а в двух других – лишь 1–3 мг/л. Особенностью родников “Коломенское” и “Воробьевы горы” (и в меньшей степени “Крылатское”) было более высокое содержание железа (рис. 1). Анализ ионного состава не выявил отчетливых сезонных вариаций.

Таблица 1. Основные характеристики родников

Родник	Сезон отбора	pH	Eh, mV	T, °C	ОЧМ, кл./мл
“Ясенево”	Весна	6.25	+333	5.6	Н.о.
	Лето	6.4	+480	9.8	8.5×10^4
	Зима	6.86	+377	6.6	Н.о.
“Битца”	Весна	6.28	+311	6.2	Н.о.
	Лето	6.02	+360	9.9	2.0×10^4
	Зима	7.38	+341	5.2	Н.о.
“Коломенское”	Весна	6.95	+77	7.3	Н.о.
	Лето	7.2	+260	10.4	3.7×10^4
	Зима	7.4	+161	6.0	Н.о.
“Воробьевы горы”	Весна	7.09	+27	9.7	Н.о.
	Лето	7.02	+14	9.6	17.1×10^4
	Зима	7.48	+70	7.2	Н.о.
“Крылатское”	Весна	7.1	+59	7.8	Н.о.
	Лето	7.06	+98	7.9	1.6×10^4
	Зима	7.89	+109	7.5	Н.о.

Н.о. – не определяли.

Содержание нефтепродуктов во всех образцах воды было ниже детектируемого порога в 0.005 мг/дм^3 , кроме родника “Воробьевы горы” в весенний сезон, в котором содержание нефтепродуктов было незначительно выше порога детекции, $0.0055 \pm 0.0028 \text{ мг/дм}^3$.

Общая численность микроорганизмов в пробах воды, отобранных в летний сезон, составляла от 1.6×10^4 кл./мл (“Крылатское”) до 17.1×10^4 кл./мл (“Воробьевы горы”) (табл. 1).

Разнообразие микробных сообществ и их кластеризация. Для характеристики разнообразия и состава микробных сообществ воды родников для каждого из 45 образцов воды (5 родников, 3 сезона, 3 повторности) было проведено профилирование состава сообществ по вариабельным V3–V4 фрагментам генов 16S рРНК. Полученные последовательности были кластеризованы в 15840 ОТЕ на уровне 97% идентичности. Количество ОТЕ уровня вида в отдельных образцах находилось в диапазоне от 1834 до 5297.

Кластерный анализ, проведенный на основе индексов сходства Jaccard, показал, что реплики (по 3 на каждый сезон) кластеризуются вместе во всех случаях, за исключением родника “Крылатское”, в котором один из трех весенних образцов образовывал отдельную ветвь (рис. S1). Поэтому далее три реплики для каждого родника и сезона были объединены в один набор данных. Анализ сходства микробных сообществ с использованием метода главных компонент показал, что микробные сообщества каждого из родников в разные сезоны

были близки между собой и четко отличались от микробиомов других родников (рис. 2).

Состав микробных сообществ: основные таксономические группы. Археи составляли в среднем около 20% микробных сообществ, причем их доля в различных родниках и сезонах сильно отличалась, в диапазоне от 3 до 50% всех последовательностей генов 16S рРНК (рис. 3). Большинство архей представляли филумы *Crenarchaeota* и *Nanoarchaeota*, в меньших количествах были детектированы *Halobacterota* и *Micrarchaeota*. Обнаруженные *Crenarchaeota* относились к порядкам *Nitrosopumilales* и *Nitrosotales*, представители которых широко распространены в водных экосистемах и являются автотрофами, окисляющими аммоний в аэробных условиях (Stahl, de la Torre, 2012; Cao et al., 2013). Интересно отметить, что в родниках “Ясенево” и “Битца” преобладали *Nitrosotales*, а в трех других – *Nitrosopumilales*. В среднем доля *Crenarchaeota* составляла около 10% сообщества, но в роднике “Воробьевы горы” их было существенно меньше, от 0.8% летом до 4.3% весной. Наиболее многочисленным филумом архей был *Nanoarchaeota*, доля которого достигала 24.8%. Представители этого филума имеют небольшой размер генома и клеток, лишены многих важных биосинтетических путей и, как предполагается, являются симбионтами или паразитами других микроорганизмов (Dombrowski et al., 2019). Функционально важной группой архей являются *Halobacterota*, доля которых была значительной только в роднике “Коломенское” (от 0.4% летом до 2.7% зимой). Большая часть *Halobacterota* относилась к

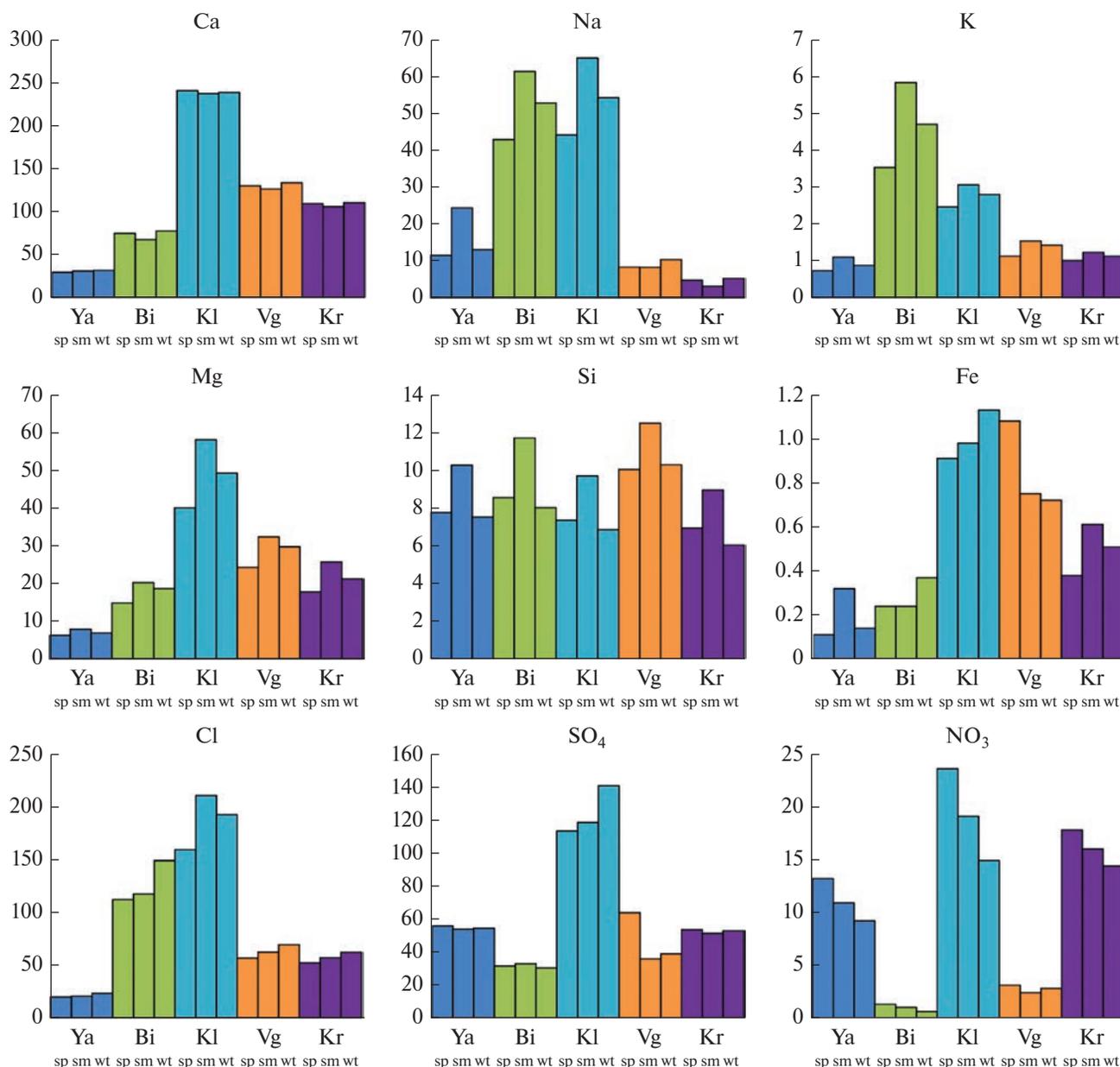


Рис. 1. Химический состав воды. Здесь и далее используются следующие обозначения образцов: Ya – “Ясенево”; Bi – “Битца”; Kl – “Коломенское”; Vg – “Воробьевы Горы”; Kr – “Крылатское”. Сезоны отбора: sp – весна; sm – лето; wt – зима. Концентрации указаны в мг/мл.

семейству *Methanoperedenaceae* (группа ANME-2d), представители которого осуществляют анаэробное окисление метана, сопряженное с восстановлением нитрата или оксидов металлов (Hargoon et al., 2013; Leu et al., 2020).

Среди бактерий в число доминирующих филумов входили *Proteobacteria* (в среднем 27.4%), *Patescibacteria* (17.7%), *Verrucomicrobiota* (4.5%), *Chloroflexi* (3.5%), *Bacteroidota* (3.4%), *Acidobacteriota* (2.9%), *Actinobacteriota* (2.6%), *Methylomirabilota* (2.4%), *Mycobacteriota* (2.2%), *Nitrospirota* (1.9%), *Cyanobacteria* (1.3%), *Elusimicrobiota* (1.2%), *Plancto-*

mycetota (1.2%), *Bdellovibrionota* (1.2%) и *Firmicutes* (1.1%), средние доли остальных филумов не превышали 1% (рис. 3).

Протеобактерии в основном представляли классы α (4.8%) и γ (22.6%). Среди α -протеобактерий были обнаружены в основном представители *Sphingomonadaceae* родов *Novosphingobium*, *Sphingobium* и *Sphingomonas* (до 7.8% в роднике “Коломенское”), *Xanthobacteraceae* и *Thalassospiraceae* (до 1.8 и 1.4% соответственно в роднике “Ясенево”). γ -Протеобактерии относились к семи порядкам, – *Burkholderiales*, *Acidiferrobacterales*,

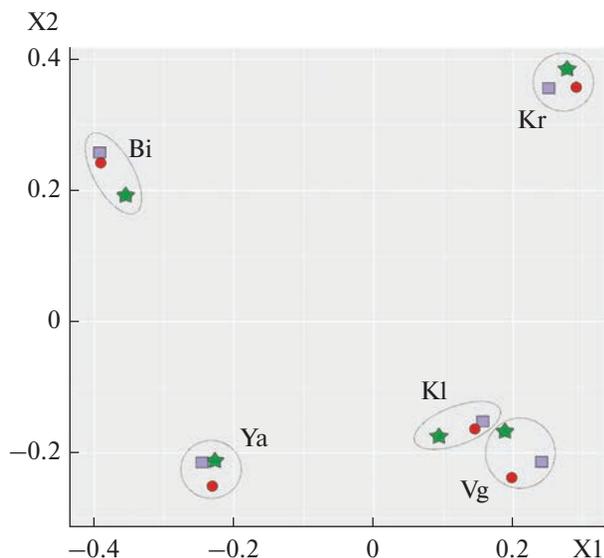


Рис. 2. Сравнение состава микробных сообществ с помощью метода главных компонент. Весенние образцы обозначены звездочками, летние – квадратами, зимние – кругами.

Diplorickettsiales, *Enterobacterales*, JG36-TzT-191, *Methylococcales* и *Pseudomonadales*, из которых первый был наиболее многочисленным (в среднем 13.3%, максимальная доля – 42% в роднике “Воробьевы горы”). Доли многих из них сильно отличались как между разными родниками, так и

по сезонам отбора. Бактерии семейства *Gallionellaceae*, культивируемые представители которого являются умеренными ацидофилами, способны окислять железо и серу (Emerson et al., 2013), составляли до 34% в роднике “Воробьевы горы”, и входили в число доминирующих групп в родниках “Коломенское” (3.0–4.3%) и “Крылатское” (4.4–6.4%), но практически отсутствовали в родниках “Ясенево” и “Битца”. Метилотрофы семейства *Methylophilaceae* (Chistoserdova, 2011) составляли 3.1–3.3% микробного сообщества в “Коломенском” и менее 1% в остальных родниках. В этом же роднике в число доминирующих групп бактерий входили метанотрофы семейства *Methylomonadaceae* (7.1–9.8%) (Orata et al., 2018), доля которых не превышала 2% в остальных родниках. Отметим высокое содержание γ -протеобактерий рода *Rhodoferax* в летнем образце из родника “Крылатское” (15.6%), хотя в остальных образцах их доля не превышала 2%. *Rhodoferax* – психротолерантные бактерии, отдельные представители данного рода способны к фототрофии, восстановлению Fe(III) или нитратов (Finneran et al., 2003).

Вторым по средней численности филумом бактерий является *Patescibacteria*, которые были наиболее многочисленны в источниках “Ясенево” и “Битца”, составляя от 20 до 33% микробных сообществ. Возможно, реальное содержание *Patescibacteria* даже выше, поскольку из-за небольших размеров клеток представителей

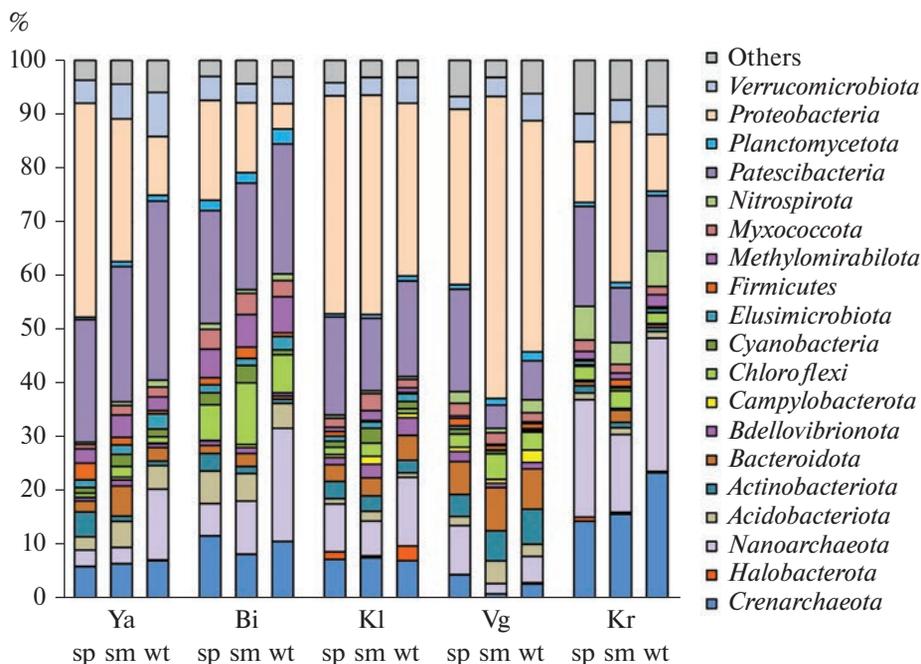


Рис. 3. Составы микробных сообществ в воде родников согласно результатам анализа генов 16S рРНК. Результаты анализа разнообразия представлены на уровне филумов. Показаны проценты от общего числа последовательностей генов 16S рРНК.

этого филума часть их может теряться при использовании для сбора биомассы 0.2 мкм фильтра (Herrmann et al., 2019). Несмотря на значительную долю *Patescibacteria* в исследуемых микробных сообществах выделить отдельные ключевые организмы затруднительно. Из 3971 ОТЕ, относящихся к *Patescibacteria*, только 11 имели долю более 1% хотя бы в одном из образцов. Наибольшее количество *Patescibacteria* в исследованных пробах относится к классу *Parcubacteria*, также были детектированы представители *ABY1*, *Berkelbacteria*, *Gracilibacteria*, *Microgenomatia* и *Saccharimonadia*. Представители *Patescibacteria* характерны для грунтовых вод и преимущественно распространены в бескислородных средах, реже встречаются в подземных водах, содержащих кислород (Nelson, Stegen, 2015). Как и наноархеи, *Patescibacteria* обладают небольшими геномами (обычно менее ~1 м.п.н) и лишены многих ключевых биосинтетических путей (Brown et al., 2015). Предположительно *Patescibacteria* способны существовать только в паразитической и/или симбиотической ассоциации с другими организмами (Kuroda et al., 2022). Однако существует и обратная точка зрения, согласно которой большинство *Patescibacteria* не являются симбионтами или паразитами, а малые размеры генома связаны с особенностями примитивного энергетического метаболизма (Beam et al., 2020). Предполагается, что некоторые *Parcubacteria* способны принимать участие в процессах денитрификации (David et al., 2021).

Бактерии филума *Verrucomicrobiota* были детектированы во всех образцах, их доля составляла от 2.4 до 8.2%. Большая часть *Verrucomicrobiota* представляла семейства *Omnitrophaceae* (*Ca. Omnitrophus*) и *Pedosphaeraceae*. Известные представители *Ca. Omnitrophus* – хемолитоавтотрофные магнетотактические бактерии (Kolinko et al., 2016), которые распространены в подземных водах с высоким содержанием металлов (Bägenstrauch et al., 2022). Филум *Chloroflexi* также был детектирован во всех образцах, причем наибольшую долю он составлял в роднике “Битца” (6.6–11.4%), что обусловлено, в первую очередь, многочисленностью в этом роднике некультивируемой группы SAR202. Эта группа гетеротрофных бактерий распространена в батипелагическом слое Мирового океана и играет важную роль круговороте серы (Mehrshad et al., 2018). *Acidobacteriota* были представлены в основном порядками *Acidobacteriales* и *Vicinamibacteriales*, а также некультивируемыми группами 2, 7 и 22. Среди *Actinobacteriota* преобладали представители порядков *Microtrichales* (*Plumatobacteraceae* и *Microtrichaceae*), *Corynebacteriales* (*Dietziaceae*), *Micrococcales* (*Microbacteriaceae*) и некультивируемой линии PeM15. Доля *Bacteroidota* (класс *Bacteroidia*) в разных образцах составляла от 0.5 до 8.1%, наиболее многочисленными бактерии этого филума, как и

Actinobacteriota, были в роднике “Воробьевы горы” (6–8%). Функционально важной группой, входящей в число доминирующих групп в родниках “Ясенево” (2.5–4.2%) и “Битца” (5.3–6.7%), является филум *Methylomirabilota* (ранее известный как NC10). Бактерии этого филума относились к двум порядкам – *Methylomirabiales* и *Rokubacteriales*. Представители *Methylomirabiales*, составлявшие 1.5–2.1% сообщества в роднике “Битца” и в среднем менее 0.5% в остальных родниках, являются нитрит-зависимыми метанотрофами (Ettwig et al., 2010). Вторая группа, *Rokubacteriales*, на долю которой приходилось 2.5–4.5% сообществ как в роднике “Ясенево”, так и в “Битце” не способны к окислению метана и, по-видимому, являются гетеротрофами, использующими короткоцепочечные углеводороды (Ivanova et al., 2021). Бактерии филума *Nitrospirota*, в основном, рода *Nitrospira*, были многочисленны в родниках “Крылатское” (4.0–6.5%) и “Воробьевы горы” (0.8–2.4%) и присутствовали в минорных количествах в остальных. Бактерии этого рода являются автотрофами, окисляющими нитрит, но некоторые виды могут осуществлять и полный процесс нитрификации (коммаокс) (Van Kessel et al., 2015).

Состав микробных сообществ: сезонная динамика.

Три многочисленные группы γ -протеобактерий имели явно выраженную сезонную динамику – представители родов *Halomonas*, *Alcanivorax* и *Idiomarina*. В родниках “Ясенево”, “Битца” и “Коломенский” в весенний период доли этих родов достигали 5–17%, а в зимний и летний родов не превышали 0.1% (рис. 4). В родниках “Воробьевы горы” и “Крылатское” доли этих семейств значительно ниже, но сезонная динамика аналогична.

Бактерии рода *Halomonas* – характерные обитатели соленых вод, адаптированные к широкому диапазону концентрации NaCl и KCl и условиям повышенной щелочности (Yin et al., 2015). Отмечается способность *Halomonas* участвовать в разложении полициклических ароматических углеводородов (Govarathanan et al., 2020). *Alcanivorax* встречается преимущественно в морской воде, используют в качестве субстрата узкий спектр углеводородов. Реже представители *Alcanivorax* встречаются в наземных средах с высоким содержанием солей и обязательным присутствием углеводородов – в соленых подземных водах и засоленной почве (Yakimov et al., 2007; Rezaei Somee et al., 2018). Еще одним родом галотолерантных бактерий, потенциально способных к разложению углеводородов, является *Marinobacter* (Huu et al., 2003), который также был обнаружен только в весенних образцах. Это космолитный род бактерий, встречающийся как в океанических водах, так и в засоленных почвах и грунтовых водах (Martín et al., 2003; Singer et al., 2011). *Idiomarina*, наряду с *Halomonas* и *Marinobacter*, способны к разложению углеводородов

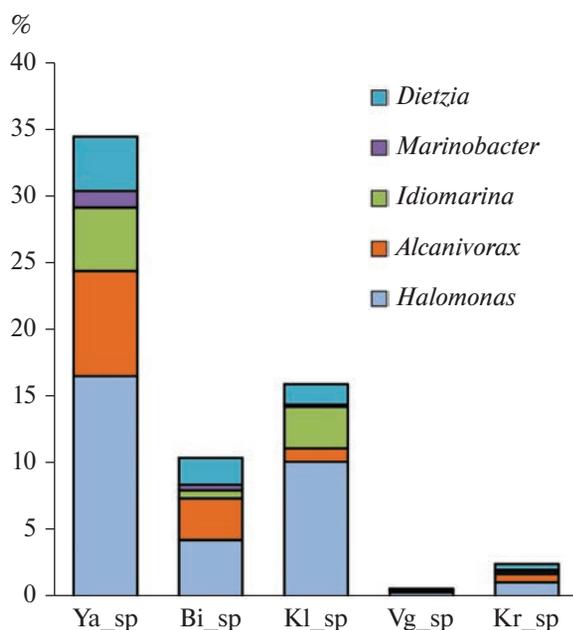


Рис. 4. Относительная численность бактерий, характерных для образцов, отобранных в весенний сезон. Показаны проценты от общего числа последовательностей генов 16S рРНК.

(Fakhrzadegan et al., 2019; Zare et al., 2019). Примечательно, что одновременное присутствие в среде представителей *Halomonas*, *Marinobacter* и *Alcanivorax* характерно для загрязненных нефтепродуктами морских вод (Harayama et al., 2004). Сходный состав микробного сообщества описан для грязевых вулканов в Италии, в которых были обнаружены бактерии родов *Alcanivorax* и *Marinobacter* (Yakimov et al., 2002).

Аналогичное распределение по родникам и сезонам наблюдалось и для некоторых представителей других филумов (рис. 4). Например, бактерии семейства *Dietziaceae* (*Actinobacteriota*, порядок *Corynebacteriales*) были многочисленны в родниках “Ясенево”, “Битца” и “Коломенское” только в весенний период. Многие представители *Dietzia* также способны деградировать углеводороды (Akbari et al., 2021). Другим примером являются фирмикуты рода *Oceanobacillus* (порядок *Bacillales*, семейство *Bacillaceae*), которые были детектированы только в весенний сезон. Некоторые представители этого рода являются умеренными галофилами, встречающимися в почвах и соленых озерах (Zhu et al., 2021).

Интересно, что таксономических групп, которые были бы характерны для зимних или летних образцов в нескольких родниках, обнаружено не было. По-видимому, увеличение численности галофильных углеводородоокисляющих бактерий в весенних пробах (особенно выраженное в родниках с неглубоким залеганием источника воды) отражает

смыв с талыми водами солей и нефтепродуктов, микробная биодеградация которых происходит в почве. Однако отсутствие весеннего “пика” содержания натрия и хлора, а также повышенного содержания нефтепродуктов указывает на разбавление засоленных вод и эффективную биодеградацию углеводов в почве, до поступления подземных вод в родники.

Микроорганизмы циклов метана, азота, железа и серы. Подземные воды, выходящие на поверхность в виде родников, имеют изначально поверхностное происхождение, но проходят через слой почвы, в процессе чего происходит их очистка от биогенных загрязнений. Хотя большинство обнаруженных групп “культивируемых” микроорганизмов являются облигатными или факультативными аэробами, в небольших количествах были детектированы и анаэробы, по-видимому, вымываемые из глубинных слоев почвы.

Прежде всего, это микроорганизмы—участники цикла метана. В небольших количествах были обнаружены метаногенные археи, прежде всего, семейства *Methanosaetaceae*, доля которых была максимальна (до 0.76%) в роднике “Крылатское”, вода в котором, судя по Eh и небольшим сезонным вариациям температуры, поступает из более глубоких слоев почвы, чем в других родниках. Анаэробное окисление метана может осуществляться двумя группами микроорганизмов — археями *Ca. Methanoperedens* и бактериями *Ca. Methyloimrabilis*. Обе группы были обнаружены во всех родниках, но везде составляют минорную часть сообществ. Намного большие доли в сообществах составляют известные аэробные метанотрофы, в первую очередь, γ -протеобактерии семейства *Methylomonadaceae*, относящиеся к родам *Crenothrix*, *Methylobacter*, *Methylomicrobium* и *Methylovulum* которые составляют до 10% микробиома в роднике “Коломенское”. Доля аэробных метанотрофов семейства *Methylomonadaceae* минимальна в роднике “Крылатское” (0.01–0.13%), в котором в больших количествах (0.25–0.76%) были детектированы метаногенные археи.

Рассматривая цикл азота, прежде всего, отметим присутствие во всех образцах родниковой воды большого количества (до 23% сообщества в роднике “Крылатское”) кренархей, способных осуществлять окисление аммония до нитрита. В родниках “Ясенево” и “Битца” преобладали представители семейства *Nitrosotaleaceae*, а в остальных трех — *Nitrosopumilaceae*, причем явно выраженной сезонной динамики не наблюдалось. Окисление аммония может также осуществляться γ -протеобактериями семейства *Nitrosomonadaceae*, доли которых не превышали 2%. За вторую стадию нитрификации, окисление нитрита до нитрата, могут отвечать бактерии филумов *Nitrospinota* (некультивируемые линии) и *Nitrospirota* (в основном род *Nitrospira*). Как и

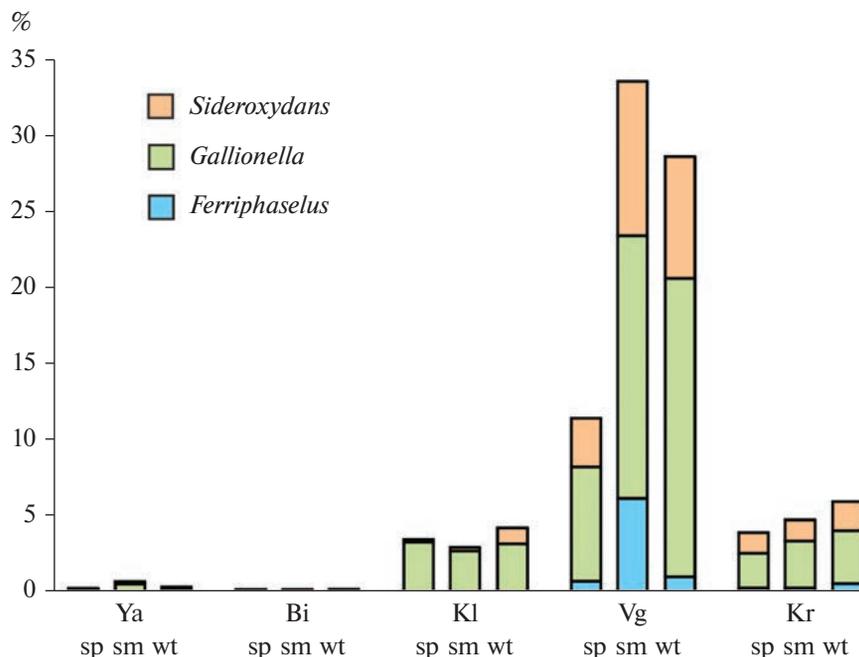


Рис. 5. Относительная численность железокисляющих бактерий родов *Sideroxydans*, *Gallionella* и *Ferriphaseus* семейства *Gallionellaceae*. Показаны проценты от общего числа последовательностей генов 16S рНК.

аммоний-окисляющие кренархеи, эти группы были наиболее многочисленны в роднике “Крылатское”, где их доли достигали 1 и 6.5% сообществ соответственно.

γ -Протеобактерии семейства *Gallionellaceae*, представители родов *Gallionella*, *Ferriphaseus* и *Sideroxydans*, составляли до трети сообщества в роднике “Воробьевы горы”, 3–6% в родниках “Коломенское” и “Крылатское”, и менее 1% в родниках “Ясенево” и “Битца” (рис. 5). Представители этих родов, встречающиеся в водных экосистемах с высоким содержанием железа, могут получать энергию за счет окисления Fe(II) и восстановленных соединений серы (Emerson et al., 2013; Kato et al., 2015; Zhou et al., 2022). Они также распространены в пресных грунтовых водах (Emerson et al., 2010; Kato et al., 2014), например, *Ferriphaseus* был впервые обнаружен в богатых железом просачиваниях грунтовых вод в Токийском парке Охято (Kato et al., 2014). Отметим, что наиболее высокое содержание железа наблюдалось именно в родниках “Коломенское” и “Воробьевы горы”, а минимальным – в “Ясенево” и “Битца”. По-видимому, окисление железа является экологически значимым процессом в городских подземных водах и может обеспечивать развитие сообществ железокисляющих бактерий.

Несмотря на то, что содержание сульфата было относительно высоким во всех родниках, особенно в “Коломенском” (рис. 1), микроорганизмы-участники цикла серы составляли минорные доли в микробных сообществах. Известные суль-

фатредукторы филумов *Desulfobacterota* и *Firmicutes* были обнаружены в небольших количествах, что, вероятно, объясняется преимущественно аэробными условиями. Среди сероокисляющих бактерий были обнаружены представители семейства *Sulfurimonadaceae* (филум *Campylobacterota*), относящиеся к родам *Sulfuricurvum*, *Sulfurimonas*, *Sulfurospirillum* и *Sulfurovum*. На них приходилось 2.2% сообщества в зимней пробе в роднике “Воробьевы горы”, а в остальных образцах их содержание не превышало 0.7%.

ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенный в данной работе анализ состава микробных сообществ вод городских родников Москвы выявил разнообразные микробные сообщества, по составу отличающиеся от типичных микробиомов почв, через которые проходят грунтовые воды до их выхода на поверхность в форме родников. Концентрация микроорганизмов в летних образцах воды находилась в диапазоне 10^4 – 10^5 кл./мл, что намного ниже, чем в почвах и открытых водоемах. По-видимому, этот показатель не отражает реальную численность микроорганизмов в подземных водоносных горизонтах, где они могут развиваться в форме биопленок. Среди типичных почвенных микроорганизмов, обнаруженных в воде родников, можно выделить аммоний-окисляющие кренархеи и многих гетеротрофов, относящихся к *Acidobacteriota*, *Bacteroidota*, α - и γ -протеобактерий. Однако, как показали полученные

результаты, автотрофные бактерии составляют значительные доли в микробных сообществах, особенно в родниках с предположительно более глубоким залеганием источника воды (“Коломенское”, “Воробьевы горы” и “Крылатское”). Помимо метанотрофов семейства *Methylomonadaceae*, которые составляли 7–10% сообщества в роднике “Коломенское”, это, прежде всего, железоокисляющие бактерии семейства *Gallionellaceae*, которые были доминирующей группой в роднике “Воробьевы горы” (12–34%) и в значительных количествах присутствовали в “Коломенском” и “Крылатском”. Содержание железа в воде этих родников также было выше, чем в “Ясенево” и “Битце”. Вероятно, причиной может быть загрязнение подземных вод железом, находящимся в почве, через которую проходит питающая родники вода, или прохождение воды через железные трубы.

Как химический, так и молекулярно-генетический анализы вод родников не выявили очевидных загрязнений токсичными веществами и нефтепродуктами, а также присутствия патогенных микроорганизмов и индикаторов фекального загрязнения (*Escherichia–Shigella* и т.п.). Однако наблюдаемые сезонные изменения состава микробных сообществ, вероятнее всего, являются результатом действия антропогенных факторов. Во всех родниках в пробах, отобранных в весенний сезон, наблюдается резкое увеличение численности галофильных бактерий и видов, способных деградировать углеводороды (*Halomonas*, *Alcanivorax*, *Idiomarina*, *Marinobacter*, *Dietzia* и др.). Этот эффект наиболее ярко выражен в родниках с, предположительно, менее глубоким залеганием источника воды. Вероятно, такая динамика отражает поступление в подземные воды после таяния снега антигололедных реагентов и нефтепродуктов. Однако весеннего увеличения содержания в родниковых водах нефтепродуктов не наблюдалось, что свидетельствует об их эффективной биодegradации, а поступающие в почву засоленные воды “разбавлялись” до поступления в родники. Вероятно, размножение галотолерантных углеводородокисляющих бактерий происходило локально в местах загрязнения почвы, а их присутствие в вытекающей из родника воде может служить молекулярным маркером его наличия, но не признаком неблагоприятного состояния родниковой воды.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Москвы (проект № 21-34-70027) и Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Отбор образцов воды и их физико-химическая характеристика, выделение метагеномной ДНК – Е.В. Груздев и В.В. Кадников; секвенирование библиотек генов 16S рРНК – А.В. Марданов; профилирование микробного сообщества на основе результатов секвенирования – Ш.А. Бегматов и А.В. Белецкий; анализ данных и подготовка статьи – Е.В. Груздев, В.В. Кадников и Н.В. Равин; руководство проектом – В.В. Кадников. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ильинский В.В., Шадрин Н.А., Комарова Т.И.* Гетеротрофные бактерии городских родников: Московский заповедник “Крылатские холмы” // Водные ресурсы. 2010. Т. 37. С. 494–501.
- Akbari A., David C., Rahim A.A., Ghoshal S.* Salt selected for hydrocarbon-degrading bacteria and enhanced hydrocarbon biodegradation in slurry bioreactors // Water. Res. 2021. V. 202. P. 117424.
- Bärenstrauch M., Vanhove A.S., Allégra S., Peuble S., Gallice F., Paran F., Lavastre V., Girardot F.* Microbial diversity and geochemistry of groundwater impacted by steel slag leachates // Sci. Total. Environ. 2022. V. 843. P. 156987.
- Beam J.P., Becraft E.D., Brown J.M., Schulz F., Jarett J.K., Bezuidt O., Poulton N., Clark K., Dunfield P., Ravin N., Spear J., Hedlund B., Kormas K., Sievert S., Elshahed M., Barton H., Stott M., Eisen J., Moser D., Onstott T., Woyke T., Stepanauskas R.* Ancestral absence of electron transport chains in *Patescibacteria* and DPANN // Front. Microbiol. 2020. V. 11. Art. 1848.
- Brown C.T., Hug L.A., Thomas B.C., Sharon I., Castelle C.J., Singh A., Wilkins M., Wrighton K., Williams K., Banfield J.F.* Unusual biology across a group comprising more than 15% of domain Bacteria // Nature. 2015. V. 523. P. 208–211.
- Cao H., Auguet J.C., Gu J.D.* Global ecological pattern of ammonia-oxidizing archaea // PLoS One. 2013. V. 8. P. e52853.
- Chistoserdova L.* Methylophony in a lake: from metagenomics to single-organism physiology // Appl. Environ. Microbiol. 2011. V. 77. P. 4705–4711.
- David G.M., López-García P., Moreira D., Alric B., Deschamps P., Bertolino P., Restoux G., Rochelle-Newall E., Thébaud E., Simon M., Jardillier L.* Small freshwater ecosystems with dissimilar microbial communities exhibit similar temporal patterns // Mol. Ecol. 2021. V. 30. P. 2162–2177.

- Dombrowski N., Lee J.H., Williams T.A., Offre P., Spang A. Genomic diversity, lifestyles and evolutionary origins of DPANN archaea // FEMS Microbiol. Lett. 2019. V. 366. P. fnz008.
- Edgar R.C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST // Bioinformatics. 2010. V. 26. P. 2460–2461.
- Emerson D., Field E.K., Chertkov O., Davenport K.W., Goodwin L., Munk C., Nolan M., Woyke T. Comparative genomics of freshwater Fe-oxidizing bacteria: implications for physiology, ecology, and systematics // Front. Microbiol. 2013. V. 4. Art. 254.
- Emerson D., Fleming E.J., McBeth J.M. Iron-oxidizing bacteria: an environmental and genomic perspective // Annu. Rev. Microbiol. 2010. V. 64. P. 561–583.
- Ettwig K.F., Butler M.K., Le Paslier D., Pelletier E., Mangenot S., Kuypers M.M., Schreiber F., Dutilh B.E., Zedelius J., de Beer D., Gloerich J., Wessels H.J.C.T., van Alen T., Luesken F., Wu M.L., van de Pas-Schoonen K.T., den Camp H.J.M.O., Janssen-Megens E.M., Francoijs K.-J., Stunnenberg H., Weissenbach J., Jetten M.S.M., Strous M. Nitrite-driven anaerobic methane oxidation by oxygenic bacteria // Nature. 2010. V. 464. P. 543–548.
- Fakhrzadegan I., Hassanshahian M., Askari Hesni M., Saadatfar A. A study of crude oil-degrading bacteria from mangrove forests in the Persian Gulf // Mar. Ecol. 2019. V. 40. e12544.
- Finneran K.T., Johnsen C.V., Lovley D.R. *Rhodoferax 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.
- 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. fiw018.
- Govarthanan M., Khalifa A.Y., Kamala-Kannan S., Srinivasan P., Selvankumar T., Selvam K., Kim W. Significance of allochthonous brackish water *Halomonas* sp. on biodegradation of low and high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons // Chemosphere. 2020. V. 243. Art. 125389.
- Grimm N.B., Foster D., Groffman P., Grove J.M., Hopkinson C.S., Nadelhoffer K.J., Pataki D.E., Peters D.P. The changing landscape: ecosystem responses to urbanization and pollution across climatic and societal gradients // Front. Ecol. Environ. 2008. V. 6. P. 264–272.
- Harayama S., Kasai Y., Hara A. Microbial communities in oil-contaminated seawater // Curr. Opin. Biotechnol. 2004. V. 15. P. 205–214.
- Haroon M.F., Hu S., Shi Y., Imelfort M., Keller J., Hugenholtz P., Yuan Z., Tyson G.W. Anaerobic oxidation of methane coupled to nitrate reduction in a novel archaeal lineage // Nature. 2013. V. 500. P. 567–570.
- Herrmann M., Wegner C.E., Taubert M., Geesink P., Lehmann K., Yan L., Lehmann R., Totsche K.U., Küsel K. Predominance of *Cand.* Patescibacteria in groundwater is caused by their preferential mobilization from soils and flourishing under oligotrophic conditions // Front. Microbiol. 2019. V. 10. Art. 1407.
- Huang G., Liu C., Zhang Y., Chen Z. Groundwater is important for the geochemical cycling of phosphorus in rapidly urbanized areas: A case study in the Pearl River Delta // Environ. Pollut. 2020. V. 260. Art. 114079.
- Huu N.B., Nga V.H., Ha D.T.C. Survey of the petroleum hydrocarbon-degrading capacity of three bacteria strains isolated from the oil sludge in Vietnam // Academia J. Biol. 2003. V. 25. № 4. P. 62–68.
- Ivanova A.A., Oshkin I.Y., Danilova O.V., Philippov D.A., Ravin N.V., Dedysh S.N. *Rokubacteria* in northern peatlands: habitat preferences and diversity patterns // Microorganisms. 2021. V. 10. Art. 11.
- Kato S., Krepski S., Chan C., Itoh T., Ohkuma M. *Ferriphaselus amnicola* gen. nov., sp. nov., a neutrophilic, stalk-forming, iron-oxidizing bacterium isolated from an iron-rich groundwater seep // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2014. V. 64. P. 921–925.
- Kato S., Ohkuma M., Powell D.H., Krepski S.T., Oshima K., Hattori M., Shapiro N., Woyke T., Chan C.S. Comparative genomic insights into ecophysiology of neutrophilic, microaerophilic iron oxidizing bacteria // Front. Microbiol. 2015. V. 6. Art. 1265.
- Kløve B., Allan A., Bertrand G., Druzynska E., Ertürk A., Goldscheider N., Henry S., Karakaya N., Karjalainen T.P., Koundouri P., Kupfersberger H., Kværner J., Lundberg A., Muotka T., Preda E., Pulido-Velazquez M., Schipper P. Groundwater dependent ecosystems. Part II. Ecosystem services and management in Europe under risk of climate change and land use intensification // Environ. Sci. Policy. 2011. V. 14. P. 782–793.
- Kolinko S., Richter M., Glöckner F.O., Brachmann A., Schüler D. Single-cell genomics of uncultivated deep-branching magnetotactic bacteria reveals a conserved set of magnetosome genes // Environ. Microbiol. 2016. V. 18. P. 21–37.
- Kuroda K., Fukushi T. Groundwater contamination in urban areas // Groundwater Management in Asian Cities / Ed. Takizawa S. Tokyo: Springer, 2008. V. 2. P. 125–149.
- Kuroda K., Yamamoto K., Nakai R., Hirakata Y., Kubota K., Nobu M.K., Narihito T. Symbiosis between *Candidatus* Patescibacteria and Archaea discovered in wastewater-treating bioreactors // mBio. 2022. e01711-22.
- Lerner D.N. Groundwater recharge in urban areas // Atmos. Environ. 1990. V. 24. P. 29–33.
- Leu A.O., Cai C., McIlroy S.J., Southam G., Orphan V.J., Yuan Z., Hu S., Tyson G.W. Anaerobic methane oxidation coupled to manganese reduction by members of the *Methanoperedenaceae* // ISME J. 2020. V. 14. P. 1030–1041.
- Li F., Liu X., Zhang X., Zhao D., Liu H., Zhou C., Wang R. Urban ecological infrastructure: an integrated network for ecosystem services and sustainable urban systems // J. Clean. Prod. 2017. V. 163. P. S12–S18.
- Magoč T., Salzberg S.L. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies // Bioinformatics. 2011. V. 27. P. 2957–2963.

- Martín S., Márquez M.C., Sánchez-Porro C., Mellado E., Arahal D.R., Ventosa A. Marinobacter lipolyticus* sp. nov., a novel moderate halophile with lipolytic activity // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2003. V. 53. P. 1383–1387.
- McPhearson T., Pickett S.T., Grimm N.B., Niemelä J., Alberti M., Elmqvist T., Weber C., Haase D., Breuste J., Qureshi S.* Advancing urban ecology toward a science of cities // *Bioscience.* 2016. V. 66. P. 198–212.
- Mehrshad M., Rodriguez-Valera F., Amoozegar M.A., López-García P., Ghai R.* The enigmatic SAR202 cluster up close: shedding light on a globally distributed dark ocean lineage involved in sulfur cycling // *ISME J.* 2018. V. 12. P. 655–668.
- Nelson W.C., Stegen J.C.* The reduced genomes of *Parcubacteria* (OD1) contain signatures of a symbiotic lifestyle // *Front. Microbiol.* 2015. V. 6. Art. 713.
- Orata F.D., Meier-Kolthoff J.P., Sauvageau D., Stein L.Y.* Phylogenomic analysis of the gammaproteobacterial methanotrophs (order *Methylococcales*) calls for the reclassification of members at the genus and species levels // *Front. Microbiol.* 2018. V. 9. Art. 3162.
- Paul M., Wolf L., Fund K., Held I., Winter J., Eiswirth M., Gallert C., Hoetzl H.* Microbiological condition of urban groundwater in the vicinity of leaky sewer systems // *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* 2004. V. 32. P. 351–360.
- Plummer J.D., Long S.C.* Identifying sources of surface water pollution: A toolbox approach // *J. Am. Water. Works. Assoc.* 2009. V. 101. № 9. P. 75–88.
- Powell K.L., Taylor R.G., Cronin A.A., Barrett M.H., Pedley S., Sellwood J., Trowsdale S.A., Lerner D.N.* Microbial contamination of two urban sandstone aquifers in the UK // *Water. Res.* 2003. V. 37. P. 339–352.
- 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.* 2013. V. 41 (Database issue). P. D590–D596.
- Rezaei Somee M., Shavandi M., Dastgheib S.M.M., Amoozegar M.A.* Bioremediation of oil-based drill cuttings by a halophilic consortium isolated from oil-contaminated saline soil // *3 Biotech.* 2018. V. 8. Art. 229.
- Rognes T., Flouri T., Nichols B., Quince C., Mahé F.* VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics // *PeerJ.* 2016. V. 4. e2584.
- Scharping R.J., Garey J.R.* Relationship between aquifer biofilms and unattached microbial indicators of urban groundwater contamination // *Mol. Ecol.* 2021. V. 30. P. 324–342.
- Sharp J.M.* The impacts of urbanization on groundwater systems and recharge // *Aqua Mundi.* 2010. P. 51–56. <https://doi.org/10.4409/Am-004-10-0008>
- Singer E., Webb E.A., Nelson W.C., Heidelberg J.F., Ivanova N., Pati A., Edwards K.J.* Genomic potential of *Marinobacter aquaeolei*, a biogeochemical “opportunotroph” // *Appl. Environ. Microbiol.* 2011. V. 77. P. 2763–2771.
- Sonthiphand P., Ruangroengkulrith S., Mhuantong W., Charoensawan V., Chotpantararat S., Boonkaewwan S.* Metagenomic insights into microbial diversity in a groundwater basin impacted by a variety of anthropogenic activities // *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 2019. V. 26. P. 26765–26781.
- Stahl D.A., de la Torre J.R.* Physiology and diversity of ammonia-oxidizing archaea // *Annu. Rev. Microbiol.* 2012. V. 66. P. 83–101.
- Szekeress E., Chiriac C.M., Baricz A., Szőke-Nagy T., Lung I., Soran M.L., Rudi K., Dragos N., Coman C.* Investigating antibiotics, antibiotic resistance genes, and microbial contaminants in groundwater in relation to the proximity of urban areas // *Environ. Pollut.* 2018. V. 236. P. 734–744.
- Van Kessel M.A., Speth D.R., Albertsen M., Nielsen P.H., Op den Camp H.J., Kartal B., Jetten M.S.M., Lüscher S.* Complete nitrification by a single microorganism // *Nature.* 2015. V. 528. P. 555–559.
- Yakimov M.M., Denaro R., Genovese M., Cappello S., D’Auria G., Chernikova T.N., Timmis K.N., Giluliano L.* Natural microbial diversity in superficial sediments of Milazzo Harbor (Sicily) and community successions during microcosm enrichment with various hydrocarbons // *Environ. Microbiol.* 2005. V. 7. P. 1426–1441.
- Yakimov M.M., Timmis K.N., Golyshin P.N.* Obligate oil-degrading marine bacteria // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2007. V. 18. P. 257–266.
- Yin J., Chen J.C., Wu Q., Chen G.Q.* Halophiles, coming stars for industrial biotechnology // *Biotechnol. Adv.* 2015. V. 33. P. 1433–1442.
- Zanini A., Petrella E., Sanangelantoni A.M., Angelo L., Ventosi B., Viani L., Rizzo P., Remelli S., Bartoli M., Bolpagni R., Chelli A., Feo A., Francese R., Iacumin P., Menta C., Raccetti E., Selmo E.M., Tanda M.G., Ghirardi M., Boggio P., Pappalardo F., De Nardo M.T., Segadelli S., Celico F.* Groundwater characterization from an ecological and human perspective: An interdisciplinary approach in the Functional Urban Area of Parma, Italy // *Rend. Lincei. Sci. Fis. Nat.* 2019. V. 30. P. 93–108.
- Zare N., Bonakdarpour B., Amoozegar M.A., Shavandi M., Fallah N., Darabi S., Taromsary N.B.* Using enriched water and soil-based indigenous halophilic consortia of an oilfield for the biological removal of organic pollutants in hypersaline produced water generated in the same oilfield // *Process. Saf. Environ. Prot.* 2019. V. 127. P. 151–161.
- Zhou N., Keffer J.L., Polson S.W., Chan C.S.* Unraveling Fe(II)-oxidizing mechanisms in a facultative Fe(II) oxidizer, *Sideroxydans lithotrophicus* strain ES-1, via culturing, transcriptomics, and reverse transcription-quantitative PCR // *Appl. Environ. Microbiol.* 2022. V. 88. e01595–21.
- Zhu W.Y., Yang L., Zhang Z.T.L., Mu C.G., Wang Y., Kou Y.R., Jiang G.Q., Yin M., Tang S.K.* *Oceanobacillus salinisoli* sp. nov., a bacterium isolated from saline soil of Turpan city in Xinjiang province, north-west China // *Arch. Microbiol.* 2021. V. 203. P. 2919–2924.

Structure and Seasonal Variability of Groundwater Microbial Communities in the City of Moscow

E. V. Gruzdev¹, Sh. A. Begmatov¹, A. V. Beletsky¹, A. V. Mardanov¹, N. V. Ravin¹, and V. V. Kadnikov^{1,*}

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

**e-mail: vkadnikov@bk.ru*

Received October 31, 2022; revised November 8, 2022; accepted November 9, 2022

Abstract—Groundwater, which appears on the surface in the form of springs, is an important ecologically significant component of the aquatic ecosystem, sensitive to changes in environmental conditions. The anthropogenic impact associated with urbanization leads to a change in the characteristics of groundwater, which in turn affects the composition of microbial communities in spring waters. Using high-throughput sequencing of the 16S ribosomal RNA gene fragments, we characterized the composition of microbial communities in five natural springs in the city of Moscow in the spring, summer, and winter seasons. The microbial communities of each spring in different seasons were similar to each other and clearly differed from the microbiomes of other springs. Among the *Archaea*, which averaged about 20% of microbial communities, ammonium-oxidizing *Crenarchaeota* predominated, as well as *Nanoarchaeota*. Most of the *Bacteria* belonged to the phyla *Proteobacteria*, *Patescibacteria*, *Verrucomicrobiota*, *Chloroflexi*, and *Bacteroidota*. Autotrophic bacteria, including iron-oxidizing bacteria of the family *Gallionellaceae* and nitrifiers, as well as methanotrophs, accounted for significant proportions in microbial communities in the springs with a presumably deeper water source. Chemical and molecular analyzes did not reveal contamination of spring waters with toxic substances and oil-derived products, as well as the presence of pathogenic microorganisms and indicators of fecal pollution. However, during the spring season, the proportions of halophilic and hydrocarbon-oxidizing bacteria increased in water microbiomes, which may reflect entry into groundwater after snow thawing of deicin reagents and hydrocarbons, which are successfully biodegraded in the soil.

Keywords: urban ecosystem, groundwater, springs, microbial community, 16S rRNA gene profiling, high-throughput sequencing

RHODOCOCCLUS RHODOCHROUS И ЭГМ 1360 – ЭФФЕКТИВНЫЙ БИОКАТАЛИЗАТОР С3 ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ ОЛЕАНАНОВЫХ ТРИТЕРПЕНОИДОВ¹

© 2023 г. Н. А. Лучникова^{a, b, *}, Е. В. Тарасова^{a, b}, В. В. Гришко^c, И. Б. Ившина^{a, b}

^aИнститут экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал Пермского федерального
исследовательского центра УрО РАН, Пермь, 614081 Россия

^bПермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, 614990 Россия

^cИнститут технической химии УрО РАН – филиал Пермского федерального
исследовательского центра УрО РАН, Пермь, 614013 Россия

*e-mail: luchnikova.n@mail.ru

Поступила в редакцию 08.11.2022 г.

После доработки 27.11.2022 г.

Принята к публикации 29.11.2022 г.

В результате проведенных исследований подобраны оптимальные условия С3 окислительной биотрансформации 1.0 г/л пентациклических тритерпеноидов олеаноловой (ОК) и глицирретовой (ГК) кислот с использованием нерастущих клеток *Rhodococcus rhodochrous* ИЭГМ 1360 из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов. Наибольшую каталитическую активность по отношению к ОК и ГК проявляли суспензии нерастущих клеток с ОП₆₀₀ 2.6 в буфере рН 8.0 и ОП₆₀₀ 2.2 в буфере рН 6.0, что обеспечивало образование 61 и 100% 3-оксо-производных соответственно. С использованием фазово-контрастной, атомно-силовой и конфокальной лазерной сканирующей микроскопии выявлена ответная реакция родококков на воздействие ОК и ГК. *In silico* предположена апоптотическая и антиоксидантная активность 3-оксо-ОК и 3-оксо-ГК соответственно. *In vitro* показана выраженная антибактериальная активность 3-оксо-ОК в отношении тест-культур *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* и *Bacillus subtilis*. Отсутствие токсического действия тритерпеноидов и их 3-оксо-производных на водные и растительные объекты продемонстрировано *in silico* и *in vitro* соответственно.

Ключевые слова: биотрансформация, глицирретовая кислота, олеаноловая кислота, нерастущие клетки, *Rhodococcus rhodochrous*, биологическая активность метаболитов

DOI: 10.31857/S0026365622600742, **EDN:** AVNRKP

На фоне высокой востребованности эффективных фармакологических средств для лечения социально-значимых заболеваний актуальной задачей является синтез новых химических соединений с потенциальной биологической активностью, в том числе на основе растительных терпеноидов (Calixto, 2019). Одной из интенсивно разрабатываемых в данной сфере групп соединений являются растительные пентациклические тритерпеноиды олеананового ряда, в частности олеаноловая (ОК, **1**, 3β-гидроксиолеан-12-ен-28-овая кислота) и глицирретовая (ГК, **3**, 3β-гидрокси-11-оксо-олеан-12-ен-30-овая кислота) кислоты (Kumar, Dubey, 2019). ОК и ГК активно используются для получения полусинтетических производных с выраженной противовирусной, противомикроб-

ной, противовоспалительной, противоопухолевой и гепатопротективной активностью (Capel et al., 2011; Yu et al., 2013; Yan et al., 2018; Alho et al., 2019; Luchnikova et al., 2020). В настоящее время конверсия этих тритерпеноидов в основном осуществляется с помощью методов химического синтеза в условиях экстремальных показателей кислотности и температуры, часто с использованием дорогостоящих катализаторов, а также защитных групп реакционно-активных центров молекулы (Alho et al., 2019). Наряду с химической модификацией предпринимаются попытки биологической трансформации ОК и ГК. По сравнению с традиционным органическим синтезом, применение ферментов и целых клеток микроорганизмов для получения целевых соединений технологически перспективно. Это обусловлено их исключительной хемо- и стереоселективностью, широким кругом метаболизируемых субстратов, отсутствием проблемы минимизации побочных реакций

¹ Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0026365622600742 для авторизованных пользователей.

или необходимости в многочисленных стадиях защиты и снятия защитных групп, а также, что немаловажно, устойчивой активностью в экстремальных условиях внешней среды. Подавляющая часть процессов биологической трансформации ОК и ГК осуществляется с помощью мицелиальных грибов (Capel et al., 2011; Martinez et al., 2013; Gong et al., 2014; Wu et al., 2018), использование которых технологически нецелесообразно и небезопасно вследствие мицелиального характера их роста и способности к выработке микотоксинов. Примеры бактериальной трансформации ОК и ГК единичны и включают процессы, катализируемые представителями родов *Bacillus*, *Nocardia*, *Streptomyces*, проявляющими целевую трансформирующую активность при концентрации тритерпеноидов в среде не более 0.3 г/л (Ludwig et al., 2015; Xu et al., 2017, 2020). Ранее нами был описан непатогенный штамм *Rhodococcus rhodochrous* ИЭГМ 1360, катализирующий направленный трансформации 1.0 г/л ОК и ГК в течение 7 сут (Лучникова и соавт., 2021; Luchnikova et al., 2022).

Одним из эффективных подходов к интенсификации процессов биоконверсии сложных гидрофобных соединений является применение нерастаущих клеток – бактериальных клеток в стационарной фазе роста, отмытых от источников питания и ресуспендированных в буферном растворе (Grishko et al., 2013; Ivshina et al., 2015; Nawawi et al., 2016; Иванова и соавт., 2022). Отсутствие ростовых факторов позволяет регулировать количество биомассы и ее физиологическое состояние, что способствует повышению эффективности и сокращению продолжительности целевого процесса. В то же время использование в качестве среды биотрансформации буферного раствора позволяет снизить риск бактериального загрязнения, ограничить рост посторонней микрофлоры и облегчить процесс выделения метаболитов. Ранее нами уже были продемонстрированы примеры успешной интенсификации процессов биотрансформации других растительных терпеноидов – бетулина и дегидроабетиновой кислоты (Grishko et al., 2013; Иванова и соавт., 2022).

Цель настоящей работы – изучение эффективности использования нерастаущих клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 1360 для возможного усиления процесса биотрансформации ОК и ГК.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Рабочая коллекция. Объектом исследования служил штамм *Rhodococcus rhodochrous* ИЭГМ 1360 – активный биотрансформатор ОК и ГК из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (официальный акроним коллекции ИЭГМ; номер 285 во Всемирной федерации коллекций культур, УНУ 73559, ЦКП 480868, <http://www.iegmcoll.ru>), выделенный

из ризосферы мха (бухта Тихая, остров Гукера, Земля Франца-Иосифа, Архангельская область, Россия). Полный геном штамма *R. rhodochrous* ИЭГМ 1360 секвенирован и представлен в базе данных NCBI под номером JAJNCN0000000001.

Химические реагенты. В экспериментах использовали ОК (CAS 508-02-1) (“Acros Organics”, США) и ГК (CAS 471-53-4) (“TCI”, Бельгия) высокой ($\geq 97\%$) степени чистоты. Химические реагенты, в том числе ацетонитрил, диметилсульфоксид (ДМСО), метанол, хлороформ, этилацетат, *n*-гексан, изопропанол имели квалификацию х. ч., ч. д. а. или ос. ч. (“Криохром”, Россия; “Merck”, Германия; “Sigma-Aldrich”, США). Для получения ультрачистой воды использовали Millipore Simplicity Personal Ultrapure Water System (“Millipore”, США).

Определение растворимости ОК и ГК. Степень растворимости тритерпеноидов изучали микрометодом серийных двукратных разведений с использованием 96-луночных круглодонных полистироловых планшетов. В лунки вносили по 100 мкл фосфатно-щелочного буфера pH 5.0; 6.0; 7.0; 8.0; 9.0. В первую лунку каждого ряда добавляли по 10 мг ОК или ГК, растворенных в 100 мкл ДМСО, смесь тщательно перемешивали, затем отбирали 100 мкл полученного раствора и переносили в следующую лунку. Процедуру повторяли до образования серии двукратных разведений. Концентрация ОК или ГК в одном ряду снижалась от 0.5 г/л до 0.003907 г/л. Растворимость определяли как концентрацию, при которой ОП₆₃₀ экспериментального раствора ОК или ГК была сравнима с ОП₆₃₀ контрольного буфера (спектрофотометр Multiscan Ascent, “Thermo Electron Corporation”, Финляндия).

Получение суспензий нерастаущих клеток. Родокки предварительно выращивали в мясоептонном бульоне (МПБ) в течение 48 ч. В стационарной фазе роста бактериальные клетки осаждали центрифугированием (3000 об./мин, Hermler Z 200 A, Германия) в течение 10 мин и трижды промывали эквивалентным объемом фосфатно-щелочного буфера (pH 7.0). Отмытые клетки ресуспендировали в 25 мл фосфатно-щелочного буфера по Кларку–Лабсу с различным соотношением 0.1 М КН₂РO₄ и 0.1 М NaOH (pH 5.0; 6.0; 7.0; 8.0; 9.0) (Dawson et al., 1986) и доводили оптическую плотность суспензий до значений ОП₆₀₀ 2.0; 2.2; 2.4; 2.6; 2.8 (спектрофотометр Lambda EZ201, “Perkin Elmer”, США). Дополнительно оценивали концентрацию клеток (г/л) путем подсчета веса сухой биомассы.

Условия биотрансформации. Эксперименты проводили в условиях постоянного перемешивания на орбитальном шейкере Certomat IS (“Sartorius”, Германия) при 28°C и 160 об./мин. ОК и ГК растворяли в ДМСО (1 мг : 10 мкл) и вносили в

концентрации 1.0 г/л. В качестве биотического контроля выступала суспензия нерастущих клеток без тритерпеноидов, в качестве абиотического контроля – буферный раствор с тритерпеноидами.

Фазово-контрастная микроскопия. Визуализацию и измерение размеров клеток осуществляли с использованием оптического микроскопа Axio Imager M2 (“Carl Zeiss”, Германия), оснащенного фотокамерой Axioscam 506 Color в режиме фазового контраста с увеличением $\times 1000$. Объем (V) и площадь (S) клеток рассчитывали по формулам (1) и (2) (Neumann et al., 2005):

$$V = r^2 \pi h; \quad (1)$$

$$S = 2r^2 \pi + \pi r h, \quad (2)$$

где r – 1/2 ширины клетки; π – 3.14; h – длина клетки.

Атомно-силовая и конфокальная лазерная сканирующая микроскопия. Для получения изображений бактериальных клеток с помощью системы совмещенного сканирования, состоящей из конфокального лазерного сканирующего микроскопа (КЛСМ) Olympus FV 1000 (“Olympus Corporation”, Япония) и атомно-силового микроскопа (АСМ) Asylum MFP-3D (“Asylum Research”, США), каплю (15–20 мкл) клеточной суспензии помещали на покровное стекло, смешивали с эквивалентным объемом флуоресцентного красителя Live/Dead® BacLight™ Bacterial Viability Kit (“Invitrogen”, США) и подсушивали при комнатной температуре в темноте в течение 10–15 мин. Препарат промывали деионизованной водой и сканировали с помощью КЛСМ. Для возбуждения флуоресценции SYTO9 и пропидиум йодида, входящих в состав красителя Live/Dead®, применяли соответственно, аргоновый лазер ($\lambda = 488$ нм) с 505/525-нм барьерным фильтром и гелий-неоновый лазер ($\lambda = 543$ нм) с 560/660-нм барьерным фильтром. Изображения клеток (размер 0.12×0.12 мм, разрешение 1600×1600 пикселей) получали со скоростью 40 нм/пиксель. Анализ изображений проводили с помощью программы FV10-ASW 3.1 (“Olympus Corporation”, Япония). КЛСМ-изображение импортировали в программное обеспечение АСМ Igor Pro 6/22A (“Wave Metrics”, США). АСМ-сканирование препаратов проводили в полуконтактном режиме на воздухе с использованием кремниевого кантилевера AC240TS с резонансной частотой 50–90 кГц и контактной жесткостью 0.5–4.4 Н/м.

Качественный и количественный анализ ОК, ГК и их производных. Для экстракции остаточного содержания ОК, ГК и продуктов биотрансформации постферментационную среду с клетками подкисляли 10%-ным раствором HCl до pH 3.0–4.0 и трижды экстрагировали эквивалентным объемом

этилацетата. Объединенные этилацетатные экстракты последовательно промывали 1%-ым раствором Na_2CO_3 и дистиллированной водой (до pH 7.0). Полученный экстракт обезвоживали над Na_2SO_4 , растворитель удаляли с помощью роторного испарителя Laborota 4000 (“Heidolph”, Германия). Качественную оценку этилацетатных экстрактов проводили методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) в системе *n*-гексан–этилацетат (1 : 1 или 4 : 1, об./об.) на пластинках Alugram® Xtra SIL G/UV254 (“Macherey-Nagel”, Германия); детекцию соединений – путем обработки пластинок 15% H_2SO_4 с последующим нагреванием при температуре 100–120°C в течение 2–3 мин.

Качественный анализ экстрактов и оценку динамики образования продукта трансформации ГК осуществляли методом газовой хромато-масс-спектрометрии (ГХ-МС) с помощью газового хромато-масс-спектрометра Agilent Technologies 7890B/5977B (“Agilent Technology”, США) с колонкой HP-5ms UI (30 м \times 0.25 мм, 0.25 мкм) в режиме ионизации электронным ударом (70 эВ); газ-носитель – гелий. Температура испарителя составляла 300°C, температура термостата колонки повышалась со 100 до 300°C с шагом 30°C/мин, выдерживание составляло 18.5–23.0 мин. Пробу вводили в объеме 0.1–0.2 мкл с делением потока 1 : 9–1 : 39. Сканирование проводили в диапазоне молекулярных масс m/z 35–535 а. е. м со скоростью 1.5 скана/с. Предварительно пробы обрабатывали (триметилсилил)диазометаном (“Sigma-Aldrich”, США). Полученные масс-спектры сравнивали с известными масс-спектрами из библиотеки NIST08 MS Library.

Динамику образования продукта трансформации ОК оценивали с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с обращено-фазовой колонкой Kromasil 100-5-C18 (C18, размер частиц 5 мкм, размер пор 100 Å, 250 мм \times 4.6 мм; “Eka Chemicals AB”, Швеция). В качестве элюента выступала смесь ацетонитрил–деионизованная вода в процентном соотношении 80 : 20 (об./об.). Скорость потока составляла 1 мл/мин, температура термостата колонки – 40°C, объем вводимой пробы – 20 мкл. Пробы предварительно растворяли в изопропанол (ос. ч., “Криохром”, Россия). Расчет концентраций ОК и продукта конверсии производили на основании уравнения (3), составленного по калибровочной кривой зависимости концентрации аналитического метчика ОК от площади пиков.

$$y = 7E - 06x - 1.2389, \quad (3)$$

где x – площадь пика, mAU, y – концентрация, %.

Выделение и идентификация продуктов трансформации ОК и ГК. Первичную идентификацию продуктов биотрансформации проводили путем сравнения масс-спектров метиловых эфиров по-

лученных соединений (дополнительные материалы, рис. S1) с масс-спектрами метиловых эфиров известных соединений из библиотеки NIST08 Mass Spectral Library (ГХ-МС (m/z): 3-оксо-ОК 468.3 (M+); 3-оксо-ГК 482.4 (M+)). Масс-спектры считали идентифицированными при совпадении масс-спектра исследуемого вещества с библиотечным с коэффициентом подобия, превышающим 90%. Подтверждение структуры продуктов трансформации проводили с использованием ЯМР-спектроскопии. Спектры ^1H , ^{13}C и DEPT ЯМР регистрировали с использованием ЯМР-спектрометра Bruker AVANCE II ("Bruker BioSpin GmbH", Германия) при частоте 400 и 100 МГц соответственно (дополнительные материалы, рис. S2, S3). В качестве растворителя использовали CDCl_3 . Оптическое вращение измеряли на поляриметре Perkin Elmer 341 ("Perkin Elmer", США) при длине волны 589 нм для растворов в CHCl_3 . Точку плавления регистрировали с помощью автоматического прибора измерения температуры OptiMelt MPA100 ("Stanford Research Systems", США) со скоростью нагрева $1^\circ\text{C}/\text{мин}$.

Экстракт (190.5 мг), полученный в процессе биотрансформации ОК нерастущими клетками *R. rhodochrous* ИЭГМ 1360, разделяли с помощью флэш-хроматографа ("Buchii", Швейцария) и картриджа Seracore Silica 40g (26.7 мм × 127 мм) при соотношении вещества и сорбента 1 : 30 (по весу). При использовании в качестве элюента 100% хлороформа последовательно получали 114.4 мг соединения **2** и 40.2 мг остаточной ОК. Перекристаллизацию соединения **2** проводили в системе изопропанол–хлороформ (3 : 1, об./об.).

3-Оксо-олеан-12-ен-28-овая кислота (**2**). Белый порошок, $T_{\text{плав}}$ 202.6°C (лит.: $167\text{--}169^\circ\text{C}$ (Maldonado et al., 2015)), R_f 0.45 (*n*-гексан–этилацетат 1 : 1, об./об.), $[\alpha]_D^{20} = +38.8^\circ$ (c 0.5, CHCl_3) (лит.: $[\alpha]_D^{25} = +73.6^\circ$ (c 0.26, CHCl_3) (Ma et al., 2002); $[\alpha]_D = +93.5^\circ$ (c 0.23, CHCl_3) (Maldonado et al., 2015)). ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3 , δ , ppm, J/Hz): 5.30 (1H, H-12); 2.85 (1H, dd, $J = 4.0, 16.0$ Hz); 2.53 и 2.35 (2H, 2m); 1.14; 1.08; 1.04; 1.02; 0.93; 0.90; 0.81 (каждый 3H, 7s, 7CH_3). ^{13}C ЯМР (100 МГц, CDCl_3 , δ , ppm): 217.47 (C-3); 183.19 (C-28); 143.64 (C-13); 122.42 (C-12); 55.36; 47.40; 46.91; 46.58; 45.86; 41.78; 41.12; 39.32; 39.12; 36.81; 34.11; 33.83; 33.01; 32.42; 32.21; 30.65; 27.71; 26.48; 25.80; 23.54; 23.50; 22.96; 21.42; 19.57; 16.99; 14.99.

Экстракт (180.9 мг), полученный в процессе биотрансформации ГК нерастущими клетками *R. rhodochrous* ИЭГМ 1360, также разделяли с помощью флэш-хроматографа ("Buchii", Швейцария) и картриджа Seracore Silica 40g (26.7 мм × 127 мм) при соотношении вещества и сорбента 1 : 30 (по весу). В качестве элюента использовали смесь

хлороформ–изопропанол с градиентом концентраций от 100 : 0 до 99 : 1 (об./об.). При разделении получали 145.5 мг соединения **4**. Перекристаллизацию соединения **4** проводили в системе изопропанол–хлороформ (3 : 1, об./об.).

3,11-Диоксо-олеан-12-ен-30-овая кислота (**4**). Белый порошок, $T_{\text{плав}}$ 274.4°C (лит.: $311\text{--}313^\circ\text{C}$ (Beseda et al., 2010)), R_f 0.45 (*n*-гексан : этилацетат 4 : 1, об./об.), $[\alpha]_D^{20} = +218.2^\circ$ (c 0.5, CHCl_3) (лит.: $[\alpha]_D^{20} = +184.5$ (c 0.4, CHCl_3) (Beseda et al., 2010)). ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3 , δ , ppm, J/Hz): 5.74 (1H, H-12); 2.96 (1H, m); 2.63 (1H, m); 2.44 (1H, s, H-9); 2.35 (1H, m); 2.22 (1H, dd, $J = 4.0, 16.0$ Hz); 1.37; 1.27; 1.22; 1.17; 1.10; 1.06; 0.85 (каждый 3H, 7s, 7CH_3). ^{13}C ЯМР (100 МГц, CDCl_3 , δ , ppm): 217.07 (C-3); 199.56 (C-11); 181.21 (C-30); 169.66 (C-13); 128.48 (C-12); 61.08; 55.52; 48.29; 47.76; 45.30; 43.79; 43.37; 41.01; 39.76; 37.73; 36.75; 34.21; 32.19; 31.89; 30.95; 28.57; 28.39; 26.58; 26.44 (2C); 23.34; 21.43; 18.83; 18.56; 15.61.

In silico анализ ОК, ГК и их производных. Экоотоксичность и растворимость ОК, ГК и их производных рассчитывали с помощью компьютеризированной прогностической системы ECOSAR (Ecological Structure Activity Relationship, EPA, США), доступной в программном пакете EPI Suite TM (The Estimation Programs Interface, EPA, США). Оценку потенциальной острой и хронической токсичности в отношении водных организмов прогнозировали на основании доступных данных по токсическим эффектам органических соединений различных химических классов с использованием анализа структурно-функциональных взаимосвязей в молекулах.

Оценку биологической активности полученных производных ОК и ГК прогнозировали на основе их структурных формул с использованием онлайн-сервиса PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances, <http://www.pharmaexpert.ru/passonline/index.php>). Результат исследования биопотенциала веществ представлял собой список прогнозируемых видов биологической активности с оценкой вероятности обнаружения (P_a) и не обнаружения (P_i) последней. Наибольшая вероятность проявления биологической активности принималась за 1.

Определение фитотоксичности ОК, ГК и их производных. Определение фитотоксичности в отношении овса посевного *Avena sativa* L. проводили согласно Методическим рекомендациям МР 2.1.7.2297-07 (2007). В эксперименте использовали семена, всхожесть которых составляла 95%. Семена проращивали в течение 3 сут в стерильных чашках Петри с фильтровальной бумагой, пропитанной дистиллированной водой (5 мл). Затем проросшие семена обрабатывали супернатантами, полу-

ченными в результате 3 сут процесса биотрансформации ОК и ГК. Степень фитотоксичности определяли по истечении 7 сут по величине эффекта торможения роста корневой системы по формуле (4):

$$E_T = (L_K - L_{ОП}) / L_K \times 100\%, \quad (4)$$

где E_T – эффект торможения, %; $L_{ОП}$ – средняя длина корней в опыте, см; L_K – средняя длина корней в контроле, см.

Фитотоксическое действие считалось доказанным, если фитoeffekt E_T составлял 20% и более.

Определение антимикробной активности ОК, ГК и их производных. Минимальные подавляющие концентрации (МПК) ОК, ГК и продуктов их биотрансформации в отношении бактериальных тест-культур *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Micrococcus luteus* NCIMB 196, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 определяли методом двукратных серийных разведений (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2022) с использованием 96-луночных полистироловых планшетов. Растворенные в ДМСО (1 мг : 10 мкл) ОК, ГК и продукты их биотрансформации вносили в лунки, содержащие МПБ, в начальной концентрации 50 мг/мл с последующим серийным двукратным разведением. В лунки добавляли по 10 мкл бактериальной суспензии (2×10^6 кл./мл). Планшеты выдерживали при оптимальной для тест-культур температуре 28 или 37°C в течение 24 ч. Жизнеспособность бактериальных клеток оценивали путем окрашивания йодонитротетразолия хлоридом. Образование нерастворимого формазана и соответствующего пурпурного окрашивания свидетельствовало о наличии в лунках активно реплицирующихся клеток. В качестве контроля влияния растворителя использовали ДМСО в аналогичной концентрации, препаратами сравнения служили антибиотические вещества (ампициллин и канамицин).

Статическая обработка данных. Эксперименты проводили в трех-, пяти- или десятикратной повторности. Для статистического анализа данных использовали программу STATISTICA (StatSoft Россия, 2015).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Биотрансформация ОК и ГК нерастущими клетками *R. rhodochrous* ИЭГМ 1360. Ранее нами было показано (Лучникова и соавт., 2021), что в ростовых условиях штамм *R. rhodochrous* ИЭГМ 1360 катализировал направленную конверсию 1.0 г/л ОК и ГК с образованием 0.9 и 26% 3-оксо-производных в течение 7 сут соответственно (рис. 1). В рамках данного исследования изучено влияние кислотности буферного раствора и количества

биомассы нерастущих клеток на процесс биотрансформации тритерпеноидов. Известно, что родококки способны выживать при экстремальных значениях pH от 1.0 до 11.0, при этом оптимальными являются нейтральные значения pH (Pátek et al., 2021). По нашим данным, среди протестированных условий кислотности только использование буферных растворов с pH 8.0 и 6.0 способствовало значительному сокращению (до 3 сут) продолжительности процесса биотрансформации ОК и ГК с образованием 14 и 31% окисленных производных соответственно (данные не представлены).

Одним из преимуществ использования нерастущих клеток является возможность строгого регулирования количества исходной биомассы на протяжении всего процесса биотрансформации. Отсутствие активного роста родококков в процессе конверсии ОК и ГК подтверждено путем измерения оптической плотности суспензий нерастущих клеток ($ОП_{600}$), которая статистически значимо не изменялась в течение всего эксперимента (рис. 2). Повышение $ОП_{600}$ клеточной суспензии (рис. 2; 0 сут) по сравнению с биотическим контролем связано с внесением гидрофобных ОК или ГК в трансформационную среду.

В ранних исследованиях по биоконверсии различных органических соединений с использованием нерастущих клеток *Rhodococcus* была показана взаимосвязь между каталитической активностью и оптической плотностью биомассы (Grishko et al., 2013; Nawawi et al., 2016; Иванова и соавт., 2022). Полученные нами данные по биотрансформации ОК и ГК подтвердили выявленную ранее зависимость (рис. 3). Установлено, что конверсия ОК происходит наиболее эффективно (выход производного 61%) при использовании суспензии с $ОП_{600}$ 2.6 (концентрация клеток 19 г/л), тогда как конверсия ГК (выход производного 100%) – при использовании суспензии с $ОП_{600}$ 2.2 (концентрация клеток 13 г/л). Тот факт, что для более эффективной биоконверсии ГК, по сравнению с ОК, необходимо меньшее количество клеток на единицу субстрата, по-видимому, связан с повышенной устойчивостью бактериальных клеток к данному тритерпеноиду. Стоит отметить, что последующее увеличение количества биомассы до $ОП_{600}$ 2.8 (концентрация клеток 31 г/л; рис. 3) приводило к снижению выхода производных, как ОК, так и ГК, что соотносится с полученными ранее результатами по биотрансформации бегулина нерастущими клетками *R. rhodochrous* ИЭГМ 66 (Grishko et al., 2013). Наблюдаемый эффект, по-видимому, обусловлен снижением массопереноса при увеличении плотности биомассы клеток и перераспределением субстрата в буферной системе.

Таким образом, в результате проведенных экспериментов показано, что наиболее эффективная

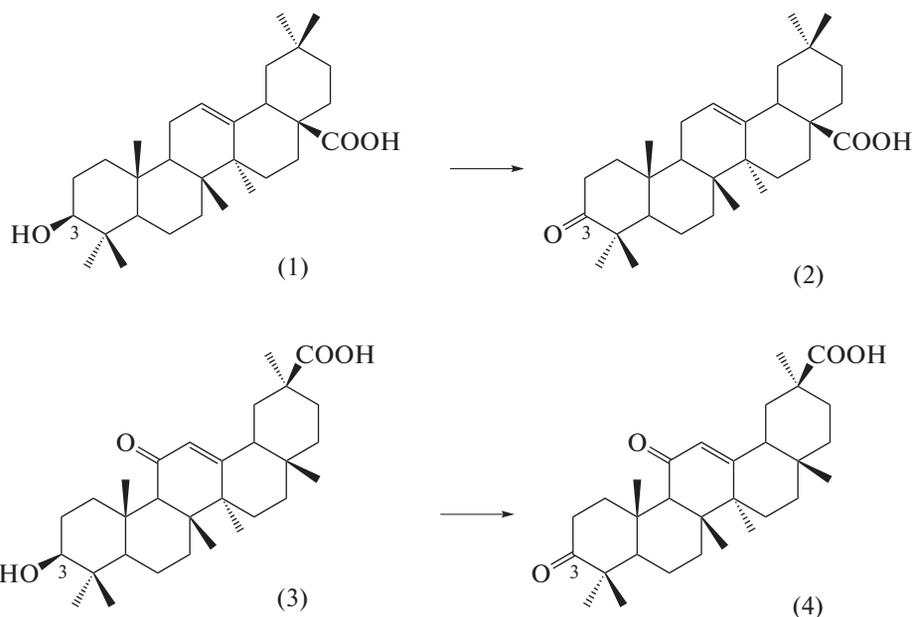


Рис. 1. Схема биотрансформации ОК (1) и ГК (3) клетками *R. rhodochrous* ИЭГМ 1360 с образованием 3-оксо-ОК (2) и 3-оксо-ГК (4) соответственно.

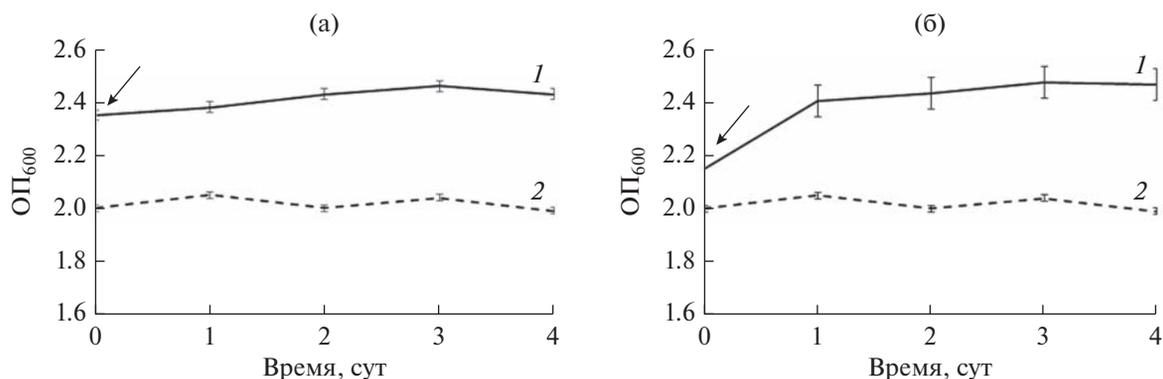


Рис. 2. Изменение оптической плотности (ОП₆₀₀) суспензии не растущих клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 1360 в процессе биотрансформации (1): ОК (а) и ГК (б); (2) – биотический контроль. Стрелками обозначено внесение ОК и ГК.

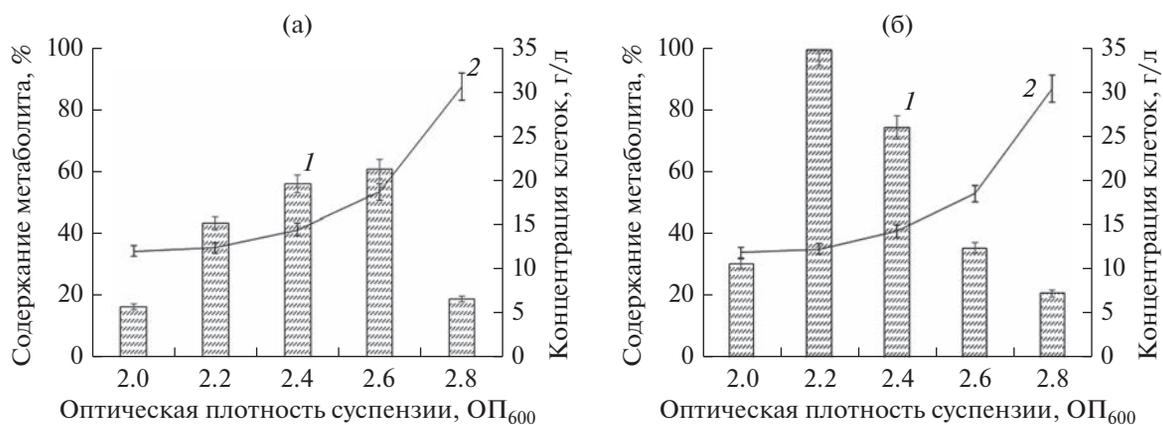


Рис. 3. Зависимость образования (1) 3-оксо-ОК (а) и 3-оксо-ГК (б) от количества биомассы не растущих клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 1360 (2) в буферах pH 8.0 (а) и pH 6.0 (б). Приведены данные 3 сут процесса биотрансформации.

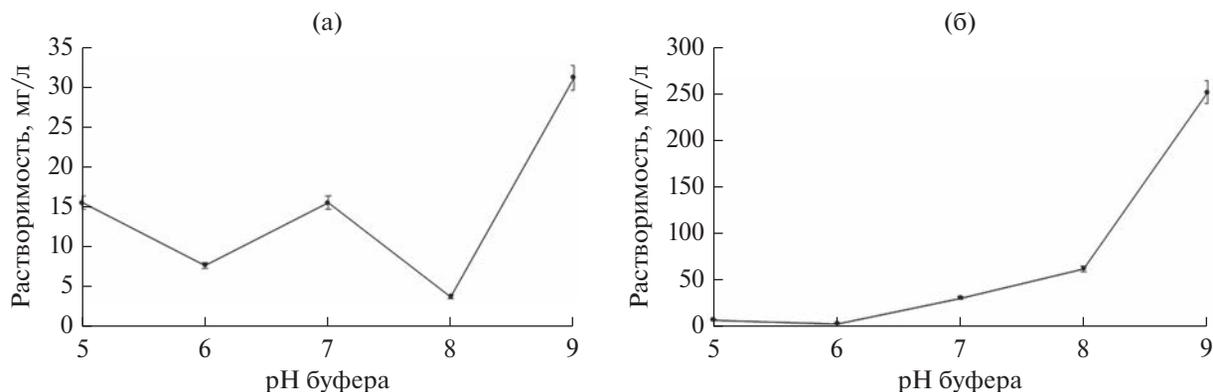


Рис. 4. Растворимость ОК (а) и ГК (б) в буферных растворах с различной рН.

конверсия ОК и ГК обеспечивается с использованием суспензий нерастаущих клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 1360 с ОП₆₀₀ 2.6 в буфере рН 8.0 и ОП₆₀₀ 2.2 в буфере рН 6.0 соответственно (дополнительные материалы, рис. S4).

Влияние ОК и ГК на нерастаущие клетки *R. rhodochrous* ИЭГМ 1360. Следует отметить, что ОК обладает более низкой растворимостью в буфере рН 8.0 (4 мг/л) по сравнению с буферами рН 5.0; 6.0; 7.0; 9.0, а ГК – в буфере рН 6.0 (4 мг/л) по сравнению с буферами рН 5.0; 7.0; 8.0; 9.0 (рис. 4). Возможно, высокая каталитическая активность бактериальных клеток в отношении ОК и ГК в условиях использования буферов рН 8.0 и рН 6.0 соответственно обусловлена характером взаимодействия родококков с кристаллическим субстратом, а именно возможностью образования агрегатов на поверхности частиц ОК и ГК. По данным Atrat et al. (1991), механизм взаимодействия клеток *Mycobacterium fortuitum* с частицами ситостерола характеризовался так называемой “иммобилизацией клеток на частицах субстрата”, образованием стабильных многоклеточных агрегатов на поверхности частиц. С использованием электронной микроскопии авторы показали, что потребление субстрата идет благодаря непосредственному контакту между клетками и частицами субстрата, где образуется многокомпонентная подвижная мезофаза, состоящая из гликолипидов, синтетических детергентов, стерола и воды, функция которой состоит в постепенном растворении субстрата, запуске механизма его трансформации и транспорта в клетку (Atrat et al., 1991). Известно, что актинобактерии, взаимодействуя с гидрофобными соединениями, синтезируют гликолипидные биосурфактанты, функция которых также состоит в растворении субстрата и запуске механизма транспорта его в клетку (Ivshina et al., 1998). Ранее было показано, что процесс биотрансформации терпеноидов бетулина и дегидроабетиновой кислоты сопровождается адгезией клеток на поверхности субстратов и образованием

внеклеточной липофильной жидкости – биосурфактанта (Tarasova et al., 2017; Cheremnykh et al., 2018; Иванова и соавт., 2022). Если предположить, что трансформация ОК и ГК родококками протекает аналогичным образом, то высокая каталитическая активность по отношению к кристаллическим частицам ОК и ГК может быть обусловлена образованием многокомпонентной подвижной мезофазы или биосурфактантов, детектируемых с использованием АСМ и совмещенного АСМ-КЛСМ сканирования (рис. 5).

Проведение морфометрических исследований позволило выявить, что воздействие ОК на нерастаущие клетки, в отличие от активно растущей культуры (Лучникова и соавт., 2021; Luchnikova et al., 2022), индуцировало снижение соотношения площади поверхности клеток к их объему и повышение шероховатости клеточной стенки (табл. 1). Повышение степени шероховатости клеточной поверхности может являться следствием секреции внеклеточных полимеров (см. рис. 5) и изменения липидного состава клеточной стенки, что повышает Ван-дер-Ваальсовы силы, способствующие лучшей адгезии клеток к субстрату (Uzoehi, Abu-Lail, 2019). По-видимому, выявленные изменения морфометрических показателей обеспечивают более эффективный контакт клеток с субстратом и тем самым обуславливают повышенный уровень его биоконверсии.

Определение биоактивности и токсичности производных ОК и ГК. Известно, что 3-оксо-ОК обладает выраженным *in vivo* антимеланомным (Huang et al., 2006) и *in vitro* антилейшманийным и анти трипаносомным действием (Funari et al., 2016). Тогда как 3-оксо-ГК *in vitro* проявляет ингибирующую активность в отношении липоксигеназ, продукты биосинтеза которых могут способствовать развитию воспалительных, аутоиммунных заболеваний, бронхиальной астмы и рака (Choudhary et al., 2009). Методом *in silico* молекулярного докинга документирована потенциальная ингиби-

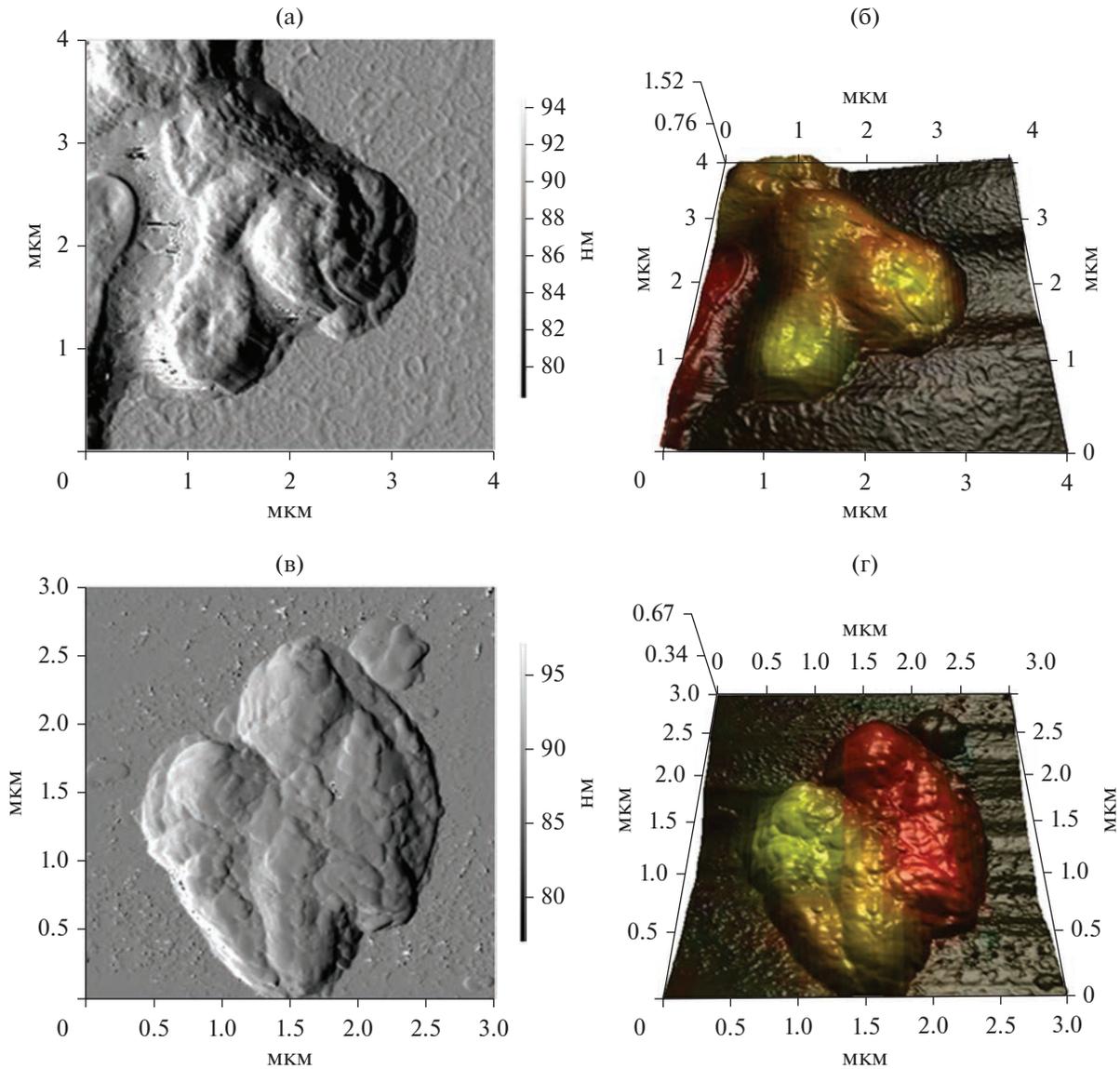


Рис. 5. АСМ и совмещенные АСМ-КЛСМ изображения не растущих клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 1360 в присутствии ОК (а, б) и ГК (в, г).

Таблица 1. Морфометрические показатели не растущих клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 1360

Условия	Длина, мкм	Ширина, мкм	Площадь, мкм ²	Объем, мкм ³	Относительная площадь, мкм ⁻¹	Шероховатость, нм
Биотический контроль	1.54 ± 0.14	1.12 ± 0.05	7.33 ± 0.43	1.49 ± 0.13	4.90 ± 0.14	151.41 ± 10.32
ОК	1.65 ± 0.17	1.20 ± 0.07	8.49 ± 0.77	1.87 ± 0.25	4.56 ± 0.20*	232.63 ± 18.42*
ГК	1.44 ± 0.08	1.11 ± 0.10	6.98 ± 0.80	1.40 ± 0.25	5.02 ± 0.36	170.04 ± 55.31

* Данные достоверно ($p < 0.05$) отличаются от контрольных значений.

Таблица 2. Прогнозируемая биологическая активность ОК, ГК и их производных

Предполагаемая активность	ОК		3-оксо-ОК		ГК		3-оксо-ГК	
	P _a	P _i						
Агонист апоптоза	—	—	0.822	0.007	0.878	0.005	0.896	0.004
Стимулятор фактора 2, связанный с NF-E2	—	—	—	—	—	—	0.726	0.002
Противовирусная (грипп)	0.816	0.003	0.795	0.003	0.881	0.002	0.855	0.002
Ингибитор оксидоредуктазы	0.885	0.003	0.847	0.004	0.954	0.001	0.916	0.002
Стимулятор транскрипционного фактора NFκB	0.908	0.001	0.901	0.001	0.900	0.001	0.900	0.001
Противовоспалительная	0.714	0.014	0.734	0.012	0.850	0.005	0.866	0.005
Противоопухолевая	0.810	0.010	0.810	0.010	0.861	0.006	0.861	0.006
Гепатопротекторная	0.889	0.003	0.735	0.006	0.916	0.002	0.773	0.005

Таблица 3. Антимикробная активность (МПК, мг/мл) ОК, ГК и их производных

Соединение	Микроорганизм			
	<i>Micrococcus luteus</i> NCIMB 196	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633
ОК	12.5	>100	>100	12.5
3-Оксо-ОК	3.125	12.5	50	0.098
ГК	>100	25	>100	0.195
3-Оксо-ГК	>100	25	>100	50
Ампициллин	25	>100	>100	12.5
Канамицин	0.39	<0.024	>100	<0.024

рующая активность 3-оксо-ГК в отношении протеазы M^{pro} SARS-CoV-2 (Florez, Singh, 2020). В результате проведенных нами исследований потенциальной биоактивности соединений с использованием компьютерной программы PASS Online показано, что 3-оксо-ОК и 3-оксо-ГК с высокой степенью вероятности (0.822 и 0.726 соответственно) могут выступать в качестве агониста апоптоза и антиоксидантного агента соответственно (табл. 2).

Ранее была показана ингибирующая активность нативных ОК и ГК в отношении патогенных штаммов *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* и *Pseudomonas aeruginosa* соответственно (Duric et al., 2013; Kannan et al., 2019). Несмотря на то, что с использованием программы PASS Online нами не выявлен антимикробный потенциал в отношении 3-оксо-производных **3** и **4**, проведенное экспериментальное определение *in vitro* антимикробной активности полученных метаболитов показало, что процесс С3 окисления ОК способствует повышению ингибирующей активности в отношении патогенных бактерий *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *S. aureus* и *B. subtilis*, которая превосходит ак-

тивность широко используемого антибиотика ампициллина (табл. 3).

Проведенный *in silico* анализ полученных 3-оксо-производных с использованием программы ECOSAR показал, что, по сравнению с исходными соединениями, данные тритерпеноиды могут обладать сниженной острой и хронической токсичностью по отношению к водным организмам (табл. 4). При этом как исходные ОК и ГК, так и их производные предположительно характеризуются крайне низкой растворимостью в воде.

Токсичность ОК, ГК и их метаболитов по отношению к растительным объектам определяли с использованием семян овса посевного. При измерении длины их корней после обработки исследуемыми соединениями статистически значимых различий, свидетельствующих о фитотоксическом эффекте, не было выявлено (табл. 5, рис. 6).

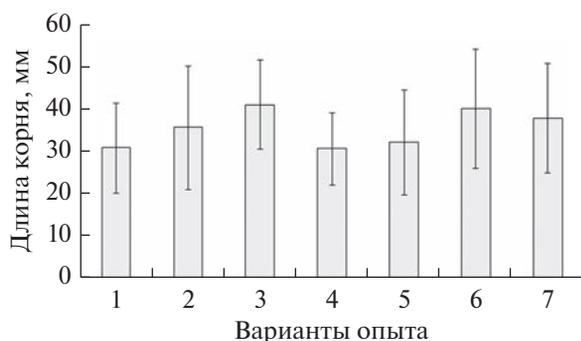
Таким образом, в результате проведенных исследований определены оптимальные условия С3 окислительной биотрансформации ОК и ГК (1.0 г/л) с использованием нерастущих клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 1360. Бактериальные суспензии с ОП₆₀₀ 2.6 в буфере pH 8.0 и с ОП₆₀₀ 2.2 в буфере pH 6.0 в течение 3 сут катализировали об-

Таблица 4. Прогнозируемая экотоксичность и растворимость ОК, ГК и их производных

Тест-объект (показатель, экспозиция)	Концентрация, мг/л			
	ОК	3-оксо-ОК	ГК	3-оксо-ГК
Растворимость в воде при 25°C ECOSAR класс	0.0018 Нейтральные органические вещества – кислоты	0.0016 Нейтральные органические вещества – кислоты	0.0023 Нейтральные органические вещества – кислоты	0.0029 Винил/аллил кетоны – кислоты
Острая токсичность				
Рыбы (ЛД ₅₀ , 96 ч)	0.018	0.052	0.171	4.624
Дафнии (ЛД ₅₀ , 48 ч)	0.018	0.049	0.019	0.904
Зеленые водоросли (ЭД ₅₀ , 96 ч)	0.127	0.286	0.035	1.166
Хроническая токсичность				
Рыбы (ЭД ₅₀ , 30 сут)	0.003	0.009	0.004	0.260
Дафнии (ЭД ₅₀ , 21 сут)	0.008	0.019	0.010	0.319
Зеленые водоросли (ЭД ₅₀ , 16 сут)	0.112	0.227	0.131	1.976

Таблица 5. Фитотоксичность ОК, ГК и их производных

Условия	Средняя длина корня, мм	Фитозэффект, %
Абиотический контроль (вода)	40.49 ± 14.15	0
Контроль среды	38.24 ± 12.95	5.56
Биотический контроль	32.48 ± 12.43	19.78
ОК	31.12 ± 10.71	23.14
ГК	36.00 ± 14.67	11.09
Продукты биотрансформации ОК	41.39 ± 10.69	-2.23
Продукты биотрансформации ГК	30.90 ± 8.59	23.68

**Рис. 6.** Изменение длины корня овса посевного *Avena sativa* L. под воздействием ОК, ГК и продуктов их трансформации: 1 – ОК, 2 – ГК, 3 – продукты биотрансформации ОК, 4 – продукты биотрансформации ГК, 5 – биотический контроль, 6 – абиотический контроль (вода), 7 – контроль среды.

разование 61% 3-оксо-ОК и 100% 3-оксо-ГК соответственно. В экспериментах *in silico* и *in vitro* показана безопасность полученных производных по отношению к водным и растительным объектам соответственно. В экспериментах *in vitro* документировано выраженное антибактериальное действие 3-оксо-ОК. Полученные данные расширяют представление о каталитическом потенциале актинобактерий рода *Rhodococcus* и возможности их использования для направленной конверсии сложных гидрофобных соединений с целью получения биологически активных производных.

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследования проведены с использованием оборудования ЦКП “Региональная профилированная коллек-

ция алканотрофных микроорганизмов” и “Исследование материалов и веществ” Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 20-34-90104) и Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (госзадание АААА-А19-119112290008-4, 122010800029-1).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Иванова К.М., Гришко В.В., Ившина И.Б. Высокоэффективная биодеструкция экотоксичной дегидроабетиновой кислоты нерастущими клетками *Rhodococcus rhodochrous* ИЭГМ 107 // Микробиология. 2022. Т. 91. С. 419–432.
<https://doi.org/10.31857/S002636562230022X>
- Ivanova K.M., Grishko V.V., Ivshina I.B. Highly efficient biodegradation of ecotoxic dehydroabietic acid by resting cells of *Rhodococcus rhodochrous* IEGM 107 // Microbiology (Moscow). 2022. V. 91. P. 364–377.
- Лучникова Н.А., Иванова К.М., Тарасова Е.В., Гришко В.В., Ившина И.Б. Биоконверсия тритерпеноидов олеанового типа актинобактериями. IX Информационная школа молодого ученого. Россия. Екатеринбург. 2021. Сборник научных трудов. С. 15–26.
<https://doi.org/10.32460/ishmu-2021-9-0002>
- Alho D.P.S., Salvador J.A.R., Cascante M., Marin S. Synthesis and antiproliferative activity of novel heterocyclic glycyrrhetic acid derivatives // Molecules. 2019. V. 24. Art. 766.
<https://doi.org/10.3390/molecules24040766>
- Atrat P., Hosel P., Richter W., Meyer H.W., Horhold C. Interactions of *Mycobacterium fortuitum* with solid sterol substrate particles // J. Basic Microbiol. 1991. V. 31. P. 413–422.
<https://doi.org/10.1002/jobm.3620310605>
- Beseda I., Czollner L., Shah P.S., Khunt R., Gaware R., Kosma P., Stanetty C., del Ruiz-Ruiz M.C., Amer H., Mereiter K., Da Cunha T., Odermatt A., Claßen-Houben D., Jordis U. Synthesis of glycyrrhetic acid derivatives for the treatment of metabolic diseases // Bioorg. Med. Chem. 2010. V. 18. P. 433–454.
<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2009.10.036>
- Calixto J.B. The role of natural products in modern drug discovery // An. Acad. Bras. Cienc. 2019. V. 91. e20190105.
<https://doi.org/10.1590/0001-3765201920190105>
- Capel C.S., De Souza A.C.D., De Carvalho T.C., De Sousa J.P.B., Ambrósio S.R., Martins C.H.G., Cunha W.R., Galán R.H., Furtado N.A.J.C. Biotransformation using *Mucor rouxii* for the production of oleanolic acid derivatives and their antimicrobial activity against oral pathogens // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2011. V. 38. P. 1493–1498.
<https://doi.org/10.1007/s10295-010-0935-y>
- Cheremnykh K.M., Luchnikova N.A., Grishko V.V., Ivshina I.B. Bioconversion of ecotoxic dehydroabietic acid using *Rhodococcus actinobacteria* // J. Hazard. Mater. 2018. V. 346. P. 103–112.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.12.025>
- Choudhary M.I., Siddiqui Z.S., Nawaz S.A. Microbial transformation of 18 β -glycyrrhetic acid by *Cunninghamella elegans* and *Fusarium lini*, and lipoxigenase inhibitory activity of transformed products // Nat. Prod. Res. 2009. V. 23. P. 507–513.
<https://doi.org/10.1080/14786410500463536>
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing M100. 32nd edn. Malvern: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2022. 362 p.
- Dawson R. Elliott D.C., Elliott W.H., Jones K.M. Data for Biochemical Research. 3rd edn. Oxford: Oxford University Press, 1986. 580 p.
- Duric K., Kovac-Besovic E., Niksic H., Sofic E. Antibacterial activity of methanolic extracts, decoction and isolated triterpene products from different parts of birch, *Betula pendula*, Roth // J. Plant Stud. 2013. V. 2. № 2. P. 61–70.
<https://doi.org/10.5539/jps.v2n2p61>
- Funari C.S., de Almeida L., Passalacqua T.G., Martinez I., Ambrosio D.L., Cicarelli R.M.B., Silva D.H.S., Graminha M.A.S. Oleanonic acid from *Lippia lupulina* (Verbenaceae) shows strong *in vitro* antileishmanial and antitrypanosomal activity // Acta Amazon. 2016. V. 46. P. 411–416.
<https://doi.org/10.1590/1809-4392201600204>
- Gong T., Zheng L., Zhen X., He H.X., Zhu H.X., Zhu P. Microbial transformation of oleanolic acid by *Trichothecium roseum* // J. Asian Nat. Prod. Res. 2014. V. 16. P. 383–386.
<https://doi.org/10.1080/10286020.2014.884564>
- Grishko V.V., Tarasova E.V., Ivshina I.B. Biotransformation of betulin to betulone by growing and resting cells of the actinobacterium *Rhodococcus rhodochrous* IEGM 66 // Process Biochem. 2013. V. 48. P. 1640–1644.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.08.012>
- Huang D., Ding Y., Li Y., Zhang W., Fang W., Chen X. Antitumor activity of a 3-oxo derivative of oleanolic acid // Cancer Lett. 2006. V. 233. P. 289–296.
<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2005.03.019>
- Ivshina I.B., Kuyukina M.S., Philp J.C., Christofi N. Oil desorption from mineral and organic materials using biosurfactant complexes produced by *Rhodococcus* species // World J. Microbiol. Biotechnol. 1998. V. 14. P. 711–717.
<https://doi.org/10.1023/A:1008885309221>
- Ivshina I.B., Mukhutdinova A.N., Tyumina H.A., Vikhareva H.V., Suzina N.E., El'-Registan G.I., Mulyukin A.L. Drotaverine hydrochloride degradation using cyst-like dormant cells of *Rhodococcus ruber* // Curr. Microbiol. 2015. V. 70. P. 307–314.
<https://doi.org/10.1007/s00284-014-0718-1>
- Kannan S., Sathasivam G., Marudhamuthu M. Decrease of growth, biofilm and secreted virulence in opportunistic

- nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25619 by glycyrrhetic acid // *Microb. Pathog.* 2019. V. 126. P. 332–342.
<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.11.026>
- Kumar D., Dubey K.K. Hybrid Approach for Transformation for Betulin (an Anti-HIV Molecule) / Eds. Gupta V., Pandey A. Amsterdam: Elsevier, 2019. P. 193–203.
- Luchnikova N.A., Grishko V.V., Ivshina I.B. Biotransformation of oleanane and ursane triterpenic acids // *Molecules*. 2020. V. 25. Art. 5526.
<https://doi.org/10.3390/molecules25235526>
- Luchnikova N.A., Grishko V.V., Kostrikina N.A., Sorokin V.V., Mulyukin A.L., Ivshina I.B. Biotransformation of oleanolic acid using *Rhodococcus rhodochrous* IEGM 757 // *Catalysts*. 2022. V. 12. Art. 1352.
<https://doi.org/10.3390/catal12111352>
- Ludwig B., Geib D., Haas C., Steingroewer J., Bley T., Muffler K., Ulber R. Whole-cell biotransformation of oleanolic acid by free and immobilized cells of *Nocardia iowensis*: characterization of new metabolites // *Eng. Life Sci.* 2015. V. 15. P. 108–115.
<https://doi.org/10.1002/elsc.201400121>
- Ma C., Nakamura N., Hattori M. Chemical modification of oleanene type triterpenes and their inhibitory activity against HIV-1 protease dimerization // *Chem. Pharm. Bull.* 2002. V. 48. P. 1681–1688.
- Maldonado E., Amador S., Juárez-Jaimes V. Secondary metabolites from *Asclepias otarioides* // *J. Mex. Chem. Soc.* 2015. V. 59. P. 50–52.
<https://doi.org/10.29356/jmcs.v59i1.14>
- Martinez A., Rivas F., Perojil A., Parra A., Garcia-Granados A., Fernandez-Vivas A. Biotransformation of oleanolic and maslinic acids by *Rhizomucor miehei* // *Phytochemistry*. 2013. V. 94. P. 229–237.
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2013.05.011>
- Nawawi N.M., Ahmad S.A., Maniyam M.N., Ibrahim A.L. Biotransformation of phenol by the resting cells of *Rhodococcus* sp. NAM 81 // *Indian J. Fundam. Appl. Life Sci.* 2016. V. 6. P. 101–107.
- Neumann G., Veeranagouda Y., Karegoudar T.B., Sahin Ö., Mäusezahl I., Kabelitz N., Kappelmeyer U., Heipieper H.J. Cells of *Pseudomonas putida* and *Enterobacter* sp. adapt to toxic organic compounds by increasing their size // *Extremophiles*. 2005. V. 9. P. 163–168.
<https://doi.org/10.1007/s00792-005-0431-x>
- Pátek M., Grulich M., Nešvera J. Stress response in *Rhodococcus* strains // *Biotechnol. Adv.* 2021. Art. 107698.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107698>
- Singh S., Florez H. Bioinformatic study to discover natural molecules with activity against COVID-19 // *F1000Research*. 2020. V. 9. Art. 1203
<https://doi.org/10.12688/f1000research.26731.1>
- Tarasova E.V., Grishko V.V., Ivshina I.B. Cell adaptations of *Rhodococcus rhodochrous* IEGM 66 to betulin biotransformation // *Process Biochem.* 2017. V. 52. P. 1–9.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.10.003>
- Uzoечи S.C., Abu-Lail N.I. The effects of β -lactam antibiotics on surface modifications of multidrug-resistant *Escherichia coli*: a multiscale approach // *Micros. Microanal.* 2019. V. 25. P. 135–150.
<https://doi.org/10.1017/S1431927618015696>
- Wu S.Y., Cui S.C., Wang L., Zhang Y.T., Yan X.X., Lu H.L., Xing G.Z., Ren J., Gong L.K. 18 β -Glycyrrhetic acid protects against alpha-naphthylisothiocyanate-induced cholestasis through activation of the Sirt1/FXR signaling pathway // *Acta Pharmacol. Sin.* 2018. V. 39. P. 1865–1873.
<https://doi.org/10.1038/s41401-018-0110-y>
- Xu S.H., Chen H.L., Fan Y., Xu W., Zhang J. Application of tandem biotransformation for biosynthesis of new pentacyclic triterpenoid derivatives with neuroprotective effect // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2020. V. 30. Art. 126947.
<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2019.126947>
- Xu S.H., Wang W.W., Zhang C., Liu X.F., Yu B.Y., Zhang J. Site-selective oxidation of unactivated C–H sp³ bonds of oleanane triterpenes by *Streptomyces griseus* ATCC 13273 // *Tetrahedron*. 2017. V. 73. P. 3086–3092.
<https://doi.org/10.1016/j.tet.2017.04.036>
- Yan S., Lin H., Huang H., Yang M., Xu B., Chen G. Microbial hydroxylation and glycosidation of oleanolic acid by *Circinella muscae* and their anti-inflammatory activities // *Nat. Prod. Res.* 2018. V. 33. P. 1849–1855.
<https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1477150>
- Yu F., Wang Q., Zhang Z., Peng Y., Qiu Y., Shi Y., Zheng Y., Xiao S., Wang H., Huang X., Zhu L., Chen K., Zhao C., Zhang C., Yu M., Sun D., Zhang L., Zhou D. Development of oleanane-type triterpenes as a new class of HCV entry inhibitors // *J. Med. Chem.* 2013. V. 56. P. 4300–4319.
<https://doi.org/10.1021/jm301910a>

***Rhodococcus rhodochrous* IEGM 1360, an Efficient Biocatalyst of C3 Oxidative Transformation of Oleanane Triterpenoids**

N. A. Luchnikova^{1, 2, *}, E. V. Tarasova^{1, 2}, V. V. Grishko³, and I. B. Ivshina^{1, 2}

¹*Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, 614081 Russia*

²*Perm State University, Perm, 614990 Russia*

³*Institute of Technical Chemistry, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, 614013 Russia*

*e-mail: luchnikova.n@mail.ru

Received November 8, 2022; revised November 27, 2022; accepted November 29, 2022

Abstract—The optimal conditions for C3 oxidative biotransformation of 1.0 g/L pentacyclic triterpenoids oleanolic (OA) and glycyrrhetic (GA) acids were determined using the resting cells of *Rhodococcus rhodochrous*

IEGM 1360 from the Regional Specialised Collection of Alkanotrophic Microorganisms. Suspensions of the resting cells with OD_{600} 2.6 in pH 8.0 buffer and OD_{600} 2.2 in pH 6.0 buffer showed the highest catalytic activity against OA and GA, which ensured the formation of 61 and 100% of their 3-oxo derivatives, respectively. Using phase contrast, atomic force, and confocal laser scanning microscopy, an adaptive response of rhodococci to the effects of OA and GA was revealed. *In silico*, the apoptotic and antioxidant activities of 3-oxo-OA and 3-oxo-GA, respectively, have been assumed. *In vitro*, a pronounced antibacterial activity of 3-oxo-OA against *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Bacillus subtilis* was shown. The absence of toxic effects of the triterpenoids and their 3-oxo derivatives on aquatic and plant objects was demonstrated *in silico* and *in vitro*, respectively.

Keywords: biotransformation, glycyrrhetic acid, oleanolic acid, resting cells, *Rhodococcus rhodochrous*, biological activity of metabolites

ИНГИБИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНОГО ХИТОЗАНА НА РОСТ БАКТЕРИЙ С РАЗЛИЧНЫМИ ТИНКТОРИАЛЬНЫМИ СВОЙСТВАМИ

© 2023 г. В. П. Коробов^a, Б. Ц. Шагдарова^b, В. П. Варламов^{b, c}, А. Л. Есаев^a, Т. В. Полудова^{d, *}

^aИнститут экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН, Пермь, 614081 Россия

^bИнститут биоинженерии им. К.Г. Скрябина, Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” РАН, Москва, 119071 Россия

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

^dПермский государственный аграрно-технологический университет
им. ак. Д.Н. Прянишникова, Пермь, 614990 Россия

*e-mail: polyudova@iegm.ru

Поступила в редакцию 11.11.2022 г.

После доработки 22.11.2022 г.

Принята к публикации 23.11.2022 г.

Выявлено ингибирующее действие хитозана с молекулярной массой 28 кДа, степенью деацетилирования 94% и его кватернизированного производного со степенью замещения 60% на бактерии разных систематических групп. Показано, что бактерии, обладающие разными поверхностными характеристиками клеточной стенки и сродством к красителям, различаются по степени чувствительности к хитозану. Между антибактериальной активностью кватернизированного хитозана и поверхностными характеристиками клеточной стенки выявлены корреляции, зависящие от степени гидрофобности и величины суммарного отрицательного заряда бактерий.

Ключевые слова: антибактериальная активность, гидрофобность, деацетилированный хитозан, кватернизированный хитозан

DOI: 10.31857/S0026365622600754, **EDN:** AVQTEW

Поиск и разработка новых препаратов для борьбы с бактериями-возбудителями опасных инфекций не теряют своей актуальности на протяжении многих десятилетий. Существует множество веществ природного происхождения, которые можно рассматривать в качестве аналогов традиционным антибиотикам. Одним из таких соединений является хитозан – производное хитина, получаемое путем его деацетилирования (Красавцев и соавт., 2013). Известно, что хитозан и его модифицированные формы могут проявлять антибактериальную, фунгицидную, противовирусную и антитоксическую активности, что делает этот комплекс соединений актуальным и перспективным объектом исследования (Шагдарова и соавт., 2016).

Уровень проявления тех или иных биологически активных свойств хитозана зависит от химической структуры макромолекул этого полисахарида, которые могут сильно различаться по длине глюкозаминовой цепочки (молекулярной массы – ММ), а также по характеру и степени ее деацетилирования (СД) (Хитин и хитозан: получение, свойства и применение, 2002). Основным недо-

статком немодифицированного хитозана является его ограниченная растворимость в водных растворах. Однако наличие в молекуле хитозана реакционноспособных аминогрупп, а также первичных и вторичных гидроксильных групп в звеньях полимерной цепи позволяет проводить синтез производных, получая множество модификаций, которые существенно расширяют спектр его свойств и сферу применения. Одним из перспективных методов химической модификации хитозана является кватернизация – введение в структуру молекулы четвертичной соли аммония. Кватернизированная молекула хитозана приобретает дополнительный положительный заряд и соединение становится водорастворимым при физиологических значениях pH, что существенно облегчает его биомедицинское применение, в том числе и в качестве антибактериального средства (Shagdarova et al., 2019).

Поверхности микробных клеток разнообразны по строению и составу, неоднородны по глубине слоя и изменяются в процессе роста микроорганизмов. Химический состав структурных элементов бактериальных клеток определяет их тинкто-

риальные особенности – способность бактерий воспринимать и удерживать красители. Эти свойства зависят от организации клеточных стенок бактерий и их проницаемости. Красители с основными свойствами, как правило, связываются с отрицательно заряженными структурами клетки – клеточной стенкой и нуклеоидом. Кислые красители сорбируются на положительно заряженных молекулах, а при проникновении в клетку окрашивают цитоплазму (Зайцева и соавт., 2015). В процесс адсорбции веществ на поверхности бактериальных клеток вовлечены различные по природе типы взаимодействий, среди которых преобладают электростатические и силы Ван-дер-Ваальса (Юсупова и соавт., 2013). Эти взаимодействия намного слабее ковалентных связей и не приводят к существенной перестройке электронной структуры взаимодействующих частиц. Отдельно следует отметить наличие водородных связей, которые возникают на малом расстоянии между атомом водорода одной молекулы и электроотрицательным атомом другой, в том случае, если эти атомы несут достаточно большой эффективный заряд (Долгоносков, 2020). Отличия в поверхностных структурах клеток бактерий разных групп определяют их различную чувствительность и устойчивость к антимикробным соединениям. Поверхность бактерий играет особую важную роль в их тропности и адгезии к различным веществам (Ерошенко, Коробов, 2017).

Несмотря на то, что хитозан и его производные интенсивно изучаются на протяжении последнего десятилетия, механизмы его действия на бактерии изучены недостаточно.

Целью работы был поиск зависимостей между антибактериальной активностью низкомолекулярного хитозана и его кватернизированной формы и различными поверхностными характеристиками бактериальной клетки.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследования явились образцы хитозана, полученного из хитина крабов: хитозан с молекулярной массой 28 кДа, степенью дезацетилирования (СД) 94% и индексом полидисперсности 1.75 (ООО “Биопрогресс”, Россия) и хитозан кватернизированный с молекулярной массой 28 кДа и степенью замещения 60%, полученные по методикам, описанным ранее (Шагдарова и соавт., 2016). Образцы хитозана растворяли в стерильной деионизованной воде (1 мг/мл) с добавлением уксусной кислоты до концентрации 0.1%.

Антибактериальную активность растворов хитозана исследовали на тест-бактериях: *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* M-17, *Enterococcus faecalis* NCIMB 13280, *Mycobacterium smegmatis* mc² 155, *Pseudomonas fluorescens* ATCC 948, *Staphylococ-*

cus epidermidis ATCC 29887. Бактерии выращивали до поздней логарифмической фазы на питательной среде Luria-Bertani (LB), содержащей (г/л дистиллированной воды): триптон – 10, дрожжевой экстракт – 5, KCl – 6.4. Культивирование проводили на орбитальном шейкере (160 об./мин) при 37°C в течение 16–18 ч. Готовили суспензии бактерий в свежей питательной среде LB, содержащие 10⁶ колониеобразующих единиц в 1 мл среды (КОЕ/мл).

Для работы использовали растворы красителей: основного и кислого фуксинов, кристаллического фиолетового, конго красного. Стоковые 1% растворы готовили по стандартной методике (Теплер и соавт., 1972), а затем разводили в 500 раз в буфере (pH 7.1) следующего состава (г/л): K₂HPO₄ · 3H₂O – 22.2, KH₂PO₄ – 7.26, NH₄NO₃ – 1.8, MgSO₄ · 7H₂O – 0.2 (Rosenberg, 1984).

Антибактериальную активность растворов хитозана определяли методом двукратных серийных разведений в стерильных полистироловых планшетах (“Медполимер”, Россия). В качестве инокулума использовали суспензии тестируемых бактерий, содержащие 10⁶ КОЕ/мл. Планшеты инкубировали в термостате при оптимальной для каждого вида бактерий температуре в течение 18–20 ч. За минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) принимали минимальную концентрацию хитозана, при которой не наблюдалось заметного невооруженным глазом роста тест-бактерий.

Для определения минимальной бактерицидной концентрации (МБК) хитозана из лунок, в которых не наблюдалось роста бактерий, удаляли содержимое, и вносили в них по 100 мкл свежей питательной среды LB. Планшеты вновь помещали в термостат с оптимальной для роста температурой и инкубировали не менее 48 ч. Бактерии оставшиеся живыми, после удаления антибактериального агента, возобновляли свой рост. Концентрация раствора хитозана, при удалении которого рост бактерий в свежей среде не возобновлялся, принималась за МБК.

Для оценки уровня гидрофобности бактерий, их клетки дважды промывали и ресуспендировали в указанном выше буфере до оптической плотности (ОП₆₀₀) 0.2–0.4 (спектрофотометр PD-303; “Arel”, Япония). Гидрофобность бактерий определяли по их сродству к растворителю *n*-гексадекану (“Вектон”, Санкт-Петербург), используя МАТН-метод (Microbial Adhesion to Hydrocarbons) (Rosenberg, 1984). Для этого в стеклянные обезжиренные пробирки вносили 1 мл бактериальной суспензии в буфере и наслаивали 200 мкл *n*-гексадекана. Содержимое пробирок интенсивно встряхивали с помощью вихревого встряхивателя Vortex FS 16 (“BioSan”, Латвия) в течение 2 мин. После 20 мин отстаивания смеси измеряли оптическую плотность водной фазы при 600 нм (PD-

Таблица 1. МИК и МБК хитозана и кватернизированного хитозана в отношении тест-бактерий, мкг/мл

Бактерии	Хитозан		Хитозан кватернизированный	
	МИК	МБК	МИК	МБК
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	125	>500	31	31
<i>Ent. faecalis</i> NCIMB 13280	250	500	64	64
<i>E. coli</i> M-17	31	250	500	>500
<i>P. fluorescens</i> ATCC 948	31	250	500	>500
<i>M. smegmatis</i> mc ² 155	31	64	4	8
<i>S. epidermidis</i> ATCC 29887	31	31	31	64

303; “Arel”, Япония). Процент гидрофобности определяли, умножая на 100 разницу между оптической плотностью исходной суспензии и такой после смешивания с углеводородом и деля на оптическую плотность исходной суспензии.

Для определения интенсивности связывания красителей с бактериями использовали бактериальные суспензии с $ОП_{600} = 1.2-1.3$. По 0.5 мл суспензии каждого вида бактерий в 5 повторах вносили в пробирки для центрифугирования. Клетки осаждали при 12000 об./мин в течение 3 мин (Microspin 12; “BioSan”, Латвия). Осадок клеток ресуспендировали в 1 мл красителя, разбивали на вихревом встряхивателе и продолжали перемешивать с красителем в течение 15 мин, а затем вновь осаждали на центрифуге. По 100 мкл надосадочной жидкости переносили в 96-луночные планшеты. Оптическую плотность исходных растворов красителей и растворов, полученных после сорбции красителей на клетках, измеряли на планшетном спектрофотометре Benchmark Plus (“BioRad”, США). Оптическую плотность растворов фуксина определяли при длине волны (λ) 545 нм, конго красного – при $\lambda = 490$ нм, кристаллического фиолетового – при $\lambda = 585$ нм. Полученные значения оптической плотности растворов в каждой пробе усредняли, рассчитывали среднеквадратичное отклонение и доверительный интервал (при $\alpha = 0.05$). По разнице оптической плотности исходных растворов красителей и плотности растворов после взаимодействия с клетками рассчитывали процент связывания красителя с бактериями.

Все эксперименты были проведены не менее чем в 3-х повторностях. Статистическую и графическую обработку данных проводили с использованием компьютерной программы MS Excel 2010.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Под тинкториальными свойствами бактерий, грибов и простейших понимают их способность вступать в реакцию с красителями и окрашиваться определенным образом (Красильников, 1999). Исследованные в настоящей работе бактерии об-

ладали различными тинкториальными свойствами. Так *B. subtilis* ATCC 6633, *S. epidermidis* ATCC 29887, *Ent. faecalis* NCIMB 13280 и *M. smegmatis* mc² 155 являются грамположительными бактериями, а *E. coli* M-17 и *P. fluorescens* ATCC 948 – грамотрицательными. В то же время, бактерии *M. smegmatis* mc² 155 обладают кислотоустойчивостью, благодаря наличию в их клеточной стенке миколовых кислот, а бактерии *B. subtilis* ATCC 6633 формируют споры, обладающие особыми поверхностными характеристиками и отношением к красителям. Таким образом, в работе были использованы представители бактерий, имеющих принципиальные различия в строении клеточных стенок и обладающие разным средством к красителям.

При изучении антибактериальных эффектов двух образцов хитозана было установлено, что бактерии разных видов обладают неодинаковой чувствительностью к исследуемым соединениям. Так, наименьшие значения МИК и МБК хитозана были выявлены для бактерий *M. smegmatis* mc² 155 и *S. epidermidis* ATCC 29887. Высокая чувствительность (низкие значения МИК) к хитозану была обнаружена у грамотрицательных бактерий *E. coli* M-17 и *P. fluorescens* ATCC 948, однако бактерицидные концентрации были в 8 раз выше, чем МИК. Кватернизированный хитозан практически не проявлял ингибирующей активности в отношении грамотрицательных бактерий (табл. 1).

Исследование антибактериальной активности хитозана и его кватернизированной формы показали существенные различия в характере их действия на тестируемые бактерии. Антибактериальная активность кватернизированной модификации оказалась несколько выше, чем у исходного хитозана. Низкие концентрации кватернизированного хитозана оказывали подавляющее и бактерицидное действие на исследованные грамположительные бактерии: *B. subtilis*, *Ent. faecalis*, *M. smegmatis*, *S. epidermidis*. Причем наиболее выраженный антибактериальный эффект был отмечен в отношении *M. smegmatis*. Однако в отношении грамотрицательных бактерий кватернизированный хитозан обладал наиболее слабым ингибирующим дей-

Таблица 2. Гидрофобность бактерий по МАНН-тесту с *n*-гексадеканом

Бактерии	Гидрофобность, %
<i>M. smegmatis</i> mc ² 155	84.8 ± 6.34
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	64.0 ± 3.97
<i>Ent. faecalis</i> NCIMB 13280	63.2 ± 7.68
<i>S. epidermidis</i> ATCC 29887	60.6 ± 2.52
<i>E. coli</i> M-17	0
<i>P. fluorescens</i> ATCC 948	0

ствием. Только высокие концентрации данного соединения были способны подавлять рост *E. coli* и *P. fluorescens*, при этом бактерицидного действия не отмечалось совсем.

Что касается исходного хитозана с высокой СД, то малые его концентрации оказывали ингибирующие и бактерицидные эффекты только для *M. smegmatis* и *S. epidermidis*. В отношении *E. coli* и *P. fluorescens* хитозан в малых концентрациях был способен подавлять рост, однако для бактерицидного воздействия на эти бактерии необходимы были гораздо более высокие концентрации хитозана. Наименьшее антибактериальное действие хитозан оказывал на *B. subtilis* и *Ent. faecalis*, которые были высоко чувствительными к хитозану в кватернизированной форме.

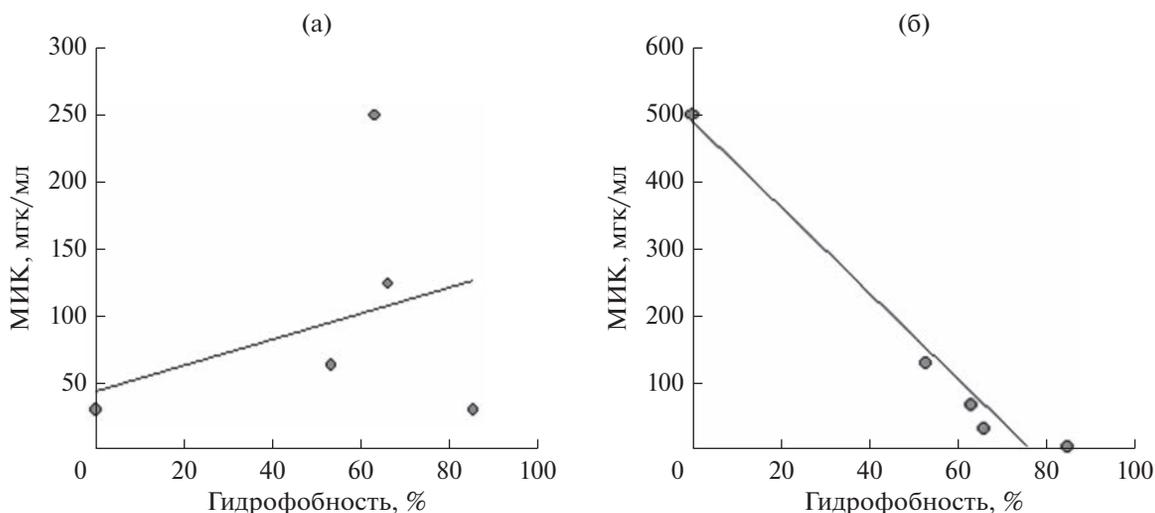
Поверхностные свойства бактериальных клеток определяют их сродство к различным соединениям – антибиотикам, красителям, питательным субстратам. Связывание хитозана с бактериями-мишенями также может зависеть от природы их поверхностей. Одной из важных поверхностных характеристик бактериальной клетки являет-

ся степень ее гидрофобности (Панькова и соавт., 2011).

Проведенные исследования показали, что наиболее гидрофобной поверхностью обладали микобактерии, что характерно для их оболочек, содержащих большое количество липидов, составляющих до 60% от массы клеточной стенки (Шульгина и соавт., 2018). Равной степени гидрофобности обладали бактерии *B. subtilis*, *Ent. faecalis* и *S. epidermidis*, свойства поверхности которых в большей степени определяются поверхностно-ассоциированными белками (Vadyvaloo, Otto, 2005). Грамотрицательные бактерии, исследованные в работе, обладали выраженными гидрофильными свойствами (табл. 2).

Анализ корреляционной зависимости между МИК хитозана и степенью гидрофобности тест-бактерий показал для исследуемых соединений разнонаправленные результаты. Для исходного хитозана была выявлена слабая положительная корреляция с коэффициентом $r = 0.35$. МИК кватернизированного хитозана, напротив, оказалась в сильной обратной зависимости ($r = -0.98$) от уровня гидрофобности бактерий (рис. 1). Выявленная корреляция и слабое воздействие кватернизированного хитозана на “гидрофильные” грамотрицательные бактерии указывают на то, что его антибактериальные эффекты могут развиваться с образованием гидрофобных связей с поверхностными структурами бактерий.

Известно, что сродство бактерий к красителям во многом зависит от заряда поверхности клеток, а разные типы красителей связываются с отрицательно или положительно заряженными локусами бактериальной клетки. В этой связи были проведены исследования по выявлению закономерности

**Рис. 1.** Корреляционная зависимость МИК хитозана (а) и кватернизированного хитозана (б) от уровня гидрофобности бактерий.

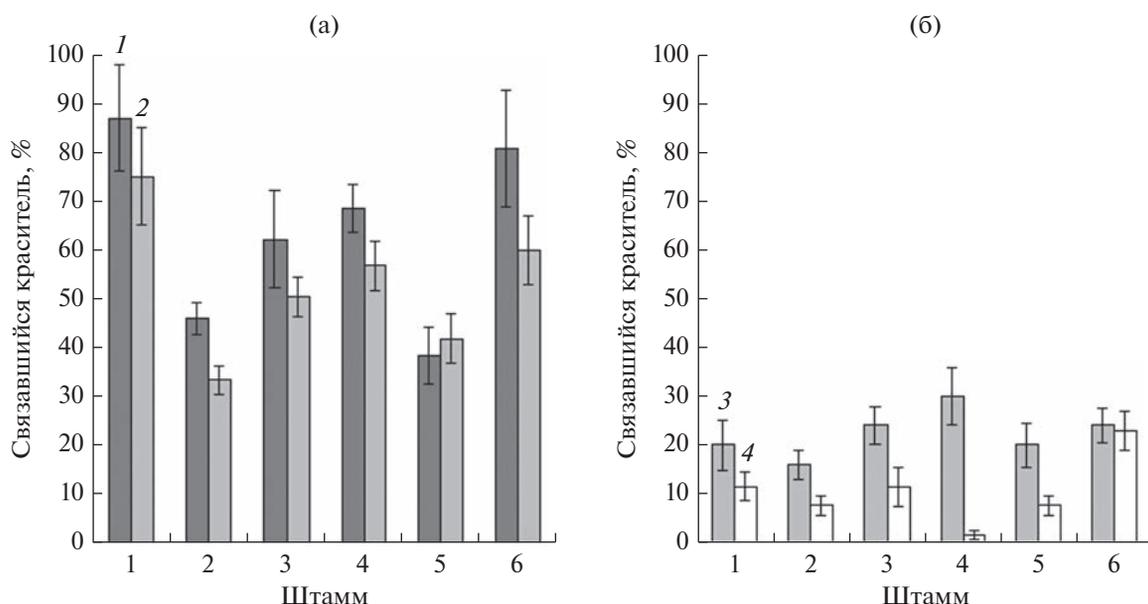


Рис. 2. Связывание основных (1 – кристаллический фиолетовый; 2 – основной фуксин) (а) и кислых (3 – кислый фуксин; 4 – конго красный) (б) красителей с клетками бактерий. По оси абсцисс: 1 – *B. subtilis* ATCC 6633; 2 – *E. coli* M-17; 3 – *Ent. faecalis* NCIMB 13280; 4 – *M. smegmatis* mc² 155; 5 – *P. fluorescens* ATCC 948; 6 – *S. epidermidis* ATCC 29887.

действия хитозана от заряда клеточной поверхности, который определяли путем оценки уровня сорбции различных красителей на бактериях.

Основные красители связываются с отрицательно заряженными структурами микробной клетки – тейхоевыми кислотами стафилококков и энтерококков, карбоксильными группами пептидогликана, липидом II (Юсупова и соавт., 2013; Schneewind, 2014). Сорбция основных красителей особенно эффективно происходила на клетках бактерий *B. subtilis*, *M. smegmatis* и *S. epidermidis*. Эти бактерии связали более 50% красителя. Около 40% основных красителей связывали клетки грамотрицательных бактерий (рис. 2а).

Связывание кислых красителей с бактериальными клетками происходит также путем электростатических взаимодействий, но только с положительно заряженными структурами на поверхности клеток. Таких структур на поверхности бактерий немного, в основном, это лишь некоторые оксифильные белки и бактериальные амилоиды, роль которых особенно важна в адгезии и биопленкообразовании (Ewans et al., 2018). В наших экспериментах активной сорбции кислых красителей на планктонных бактериях не наблюдалось (рис. 2б).

Таким образом, существенные различия сорбции красителей на разных бактериях были выявлены при связывании с клетками кристаллического фиолетового и основного фуксина, сродство которых может зависеть от суммарного отрицательного заряда клеток.

Анализ корреляции между МИК исследуемых соединений и степенью связывания бактериями основных красителей вновь показал разные результаты. Для ингибирующего действия хитозана не было выявлено зависимости от суммарного отрицательного заряда тестируемых бактерий ($r = 0.2$). Однако действие кватернизированной хитозана вновь коррелировало с уровнем отрицательного заряда бактериальных поверхностей ($r = -0.88$) (рис. 3).

Проведенные исследования показали, что хитозан с высокой СД и его кватернизированная модификация различаются по характеру и активности антибактериального действия. Хитозан ингибировал рост тестируемых бактерий при концентрациях, варьирующих в пределах от 31 до 250 мкг/мл. При анализе закономерностей антибактериального действия хитозана не было выявлено зависимостей ни от степени гидрофобности бактериальной поверхности, ни от уровня ее отрицательного заряда. Вероятно, связывание хитозана с атакуемыми бактериями происходит не только по механизмам электростатических и/или гидрофобных взаимодействий, но и посредством специфических сайтов связывания.

Антимикробное действие кватернизированной формы хитозана отличалось и по характеру, и по активности. Ингибирующий рост бактерий эффект модифицированного хитозана был выше, однако он проявлялся лишь в отношении грамположительных бактерий, клеточные поверхности которых обладали выраженной гидрофобностью. Рост же грамотрицательных бактерий, обладаю-

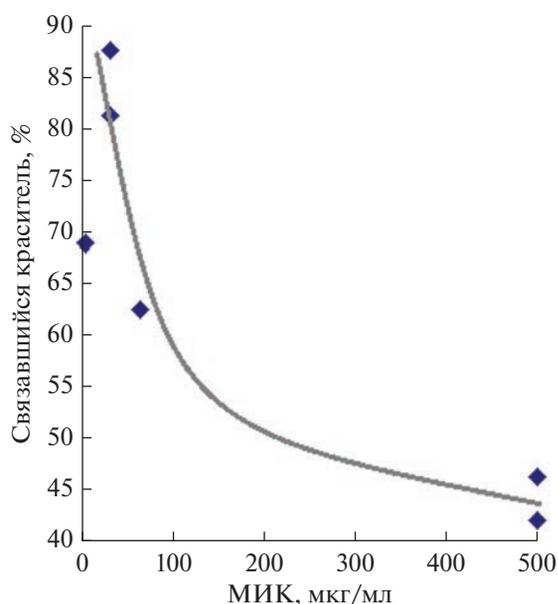


Рис. 3. Корреляционная зависимость МИК кватернизированного хитозана от суммарного отрицательного заряда клетки (по связыванию кристаллического фиолетового).

щих гидрофильными оболочками, ингибировался лишь в присутствии высокой концентрации хитозана (500 мкг/мл), а его МБК для этих бактерий не была выявлена.

Указанные наблюдения и выявленная высокая корреляционная зависимость между антибактериальной активностью и степенью гидрофобности поверхности тестируемых бактерий указывают на то, что гидрофобные неполярные взаимодействия играют важную роль в связывании молекул модифицированного хитозана с клеткой-мишенью. Однако полярные электростатические взаимодействия, судя по всему, также вносят свой вклад в биологическую активность этого соединения. Показанная корреляция между степенью антибактериального эффекта и уровнем отрицательного заряда бактериальной поверхности хорошо согласуется с тем фактом, что кватернизация значительно повышает уровень положительного заряда макромолекулы хитозана (Shagdarova et al., 2019).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации: государственные задания “Молекулярные механизмы адаптации микроорганизмов к факторам среды”, регистрационный номер НИОКТР АААА-А19-119112290009-1 и “Получение и изучение физиологически активных соединений, биополимеров, их производных и композитов медицинского и сельскохозяйственного назна-

чения”, регистрационный номер НИОКТР 122041100009-4.

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

- Долгоносоев А.М.* Модель межмолекулярного взаимодействия общего типа между молекулой и жидкой фазой, основанная на теории обобщенных зарядов // Сорбционные и хроматографические процессы. 2020. Т. 20. № 3. С. 343–361.
- Ерошенко Д.В., Коробов В.П.* Адгезия стафилококков: первый шаг к образованию биопленок // Успехи современной биологии. 2017. Т. 137. № 1. С. 100–112.
- Зайцева Е.А., Шаркова В.А., Дуго Р.Н., Воропаева Н.М., Бронников Ю.Н.* Морфологические и тинкториальные свойства бактерий. Владивосток: Медицина ДВ, 2015. 81 с.
- Красавцев В.Е., Куприна Е.Э., Маслова Г.В., Албулов А.И.* Хитин и хитозан. Сырьевые источники, основные методы переработки // Хитозан / Под ред. Скрябина К.Г., Михайлова С.Н., Варламова В.П. М.: Центр “Биоинженерия”, 2013. С. 18–48.
- Красильников А.П., Романовская Т.Р.* Микробиологический словарь-справочник. 2-е изд. Мн.: “Асар”, 1999. 400 с.
- Панькова Н.В., Полодова Т.В., Лемкина Л.М., Коробов В.П.* Гидрофобные и донорно-акцепторные свойства поверхности клеток стафилококков, чувствительных и устойчивых к варнерину // Микробиология. 2011. Т. 80. С. 568–570.
- Pan'kova N.V., Polyudova T.V., Lemkina L.M., Korobov V.P.* Hydrophobic and donor-acceptor properties of the surface of warnerin-sensitive or resistant staphylococcus cells // Microbiology (Moscow). 2011. V. 80. P. 573–575.
- Теплер Е.З., Шильникова В.К., Переверзева Г.И.* Практикум по микробиологии. М.: “Колос”, 1972. 199 с.
- Хитин и хитозан: получение, свойства и применение / Под ред. Скрябина К.Г., Вихоревой Г.А. Варламова В.П. М.: Наука, 2002. 368 с.
- Шагдарова Б.Ц., Ильина А.В., Варламов В.П.* Антибактериальная активность алкилированных и ацилированных производных низкомолекулярного хитозана // Прикл. биохимия и микробиология. 2016. Т. 52. С. 237–241.
- Shagdarova B.T., P'ina A.V., Varlamov V.P.* Antibacterial activity of alkylated and acylated derivatives of low-molecular weight chitosan // Appl. Biochem. Microbiol. 2016. V. 52. P. 222–225.
- Шульгина М.В., Нарвская О.В., Мокроусов И.В.* Патогенные и условно-патогенные микобактерии. М.: ООО “НЬЮ ТЕРРА”, 2018. 104 с.

Юсупова Р.И., Курмаева А.И., Потанова М.В., Кулагина Е.М., Барабанов В.П. Суспензия клеток микроорганизмов как коллоидная система. Часть 2. Поверхностный заряд и электрокинетические свойства дрожжевых и бактериальных суспензий // Вестник Казанского технологического университета. 2013. Т. 16. № 4. С. 189–191.

Evans M.L., Gichana E., Zhou Y., Chapman M.R. Bacterial amyloids // *Methods Mol. Biol.* 2018. V. 1779. P. 267–288.

Rosenberg M. Bacterial adherence to hydrocarbons: a useful technique for studying cell surface hydrophobicity // *FEMS Microbiol. Lett.* 1984. V. 22. P. 289–295.

Schneewind O., Missiakas D. Lipoteichoic acids, phosphate-containing polymers in the envelope of gram-positive bacteria // *J. Bacteriol.* 2014. V. 196. P. 1133–1142.

Shagdarova B., Lunkov A., Il'ina A., Varlamov V. Investigation of the properties of N-[(2-hydroxy-3-trimethylammonium) propyl] chloride chitosan derivatives // *Int. J. Biol. Macromol.* 2019. V. 124. P. 994–1001.

Vadyvaloo V., Otto M. Molecular genetics of *Staphylococcus epidermidis* biofilms on indwelling medical devices // *Int. J. Artif.* 2005. V. 28. P. 1069–1078.

Inhibitory Action of Low-Molecular Chitosan on Growth of Bacteria with Different Tinctorial Properties

V. P. Korobov¹, B. Ts. Shagdarova², V. P. Varlamov^{2, 3}, A. L. Esaev¹, and T. V. Polyudova^{4, *}

¹*Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, 614081 Russia*

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

³*Kazan Federal University, Kazan, 420008 Russia*

⁴*Perm State Agro-Technological University, Perm, 614990 Russia*

**e-mail: polyudova@iegm.ru*

Received November 11, 2022; revised November 22, 2022; accepted November 23, 2022

Abstract—Inhibitory effect of chitosan (molecular mass 28 kDa, deacetylation 94%) and of its quaternized derivative with 60% substitution on bacteria of various taxonomic groups was investigated. Bacteria differing in the cell wall surface characteristics and affinity to dyes were found to differ in their sensitivity to chitosan. Correlation dependencies between antibacterial activity of quaternized chitosan and the surface characteristics of bacterial cell walls were revealed.

Keywords: antibacterial activity, hydrophobicity, deacetylated chitosan, quaternized chitosan

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ
АНАЛИЗ ГЕНОВ БАКТЕРИЙ РОДА *RHODOCOCCLUS*, КОДИРУЮЩИХ
СИНТЕЗ АЛКАН-1-МОНООКСИГЕНАЗ© 2023 г. А. А. Букляревич^а, А. С. Гуринович^а, А. Е. Филонов^б, М. А. Титок^{а, *}^аБелорусский государственный университет, Минск, 220030 Беларусь^бИнститут биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина, ФИЦ Пушчинский научный центр биологических исследований РАН, Пушкино, Московская обл., 142290 Россия

*e-mail: ma_titok@bsu.by

Поступила в редакцию 17.10.2022 г.

После доработки 22.11.2022 г.

Принята к публикации 23.11.2022 г.

Выявлены особенности в организации и локализации генов *alkB* и кодируемых ими алкан-1-монооксигеназ у бактерий рода *Rhodococcus*. Установлено, что для всех представителей одной филогенетической группы характерен определенный тип генов *alkB* (тип *alkB1* в составе оперонов, содержащих гены, кодирующие рубредоксины, рубредоксинредуктазу и регуляторный белок, и/или тип *alkB2* в составе оперонов без гена, кодирующего рубредоксинредуктазу, и дополнительно отдельно локализованные детерминанты типа *alkB3–alkB8*). Гены *alkB1*-типа присутствовали в хромосомах бактерий групп В1 (*R. aetherivorans*, *R. ruber*), С (*R. opacus*, *R. jostii*, *R. wratislaviensis*, *R. koreensis*), D (*R. erythropolis*, *R. qingshengii*), G (*R. triatomae*) и E (*R. fascians*). Гены *alkB2*-типа находились в строго определенных локусах хромосом бактерий филогенетических групп А (*R. hoagii/R. equi*), В2 (*R. coprophilus*, *R. pyridinivorans*, *R. rhodochrous*) и D (*R. erythropolis*, *R. qingshengii*). Отдельно локализованные гены *alkB3–alkB5* обнаруживались в хромосомах бактерий группы D (*alkB5* только у представителей вида *R. qingshengii*), гены *alkB6* – бактерий группы В1 и В2, гены *alkB7–alkB8* – бактерий группы E. Белки, кодируемые генами *alkB1* и *alkB2*, представлены тремя филогенетическими группами. Первая из них включала белки AlkB1-типа бактерий группы В1 и С, а также белки AlkB2-типа бактерий группы D и А; вторая – белки AlkB2-типа бактерий группы В2; третья – белки AlkB1-типа бактерий группы G и D. Алкан-1-монооксигеназы, кодируемые отдельно локализованными генами *alkB3–alkB8*, представлены тремя филогенетическими линиями: первая – AlkB3–AlkB5, вторая – AlkB6 третья – AlkB7 и AlkB8. В геноме бактерий *R. pyridinivorans* 5Ar выявлены характерные для представителей группы В1 гены *alkB2* и *alkB6*. Показано, что данные детерминанты необходимы для синтеза биоПАВ. У мутанта с нарушенным геном *alkB2* эмульгирующая активность уменьшалась при 28 и 42°C, соответственно, в 16 и 3 раза, а количество содержащих трегалозу сурфактантов – в 7 и 3 раза. У мутанта с нарушенным геном *alkB6* вне зависимости от температуры культивирования регистрировали снижение эмульгирующей активности в 1.2 раза и уменьшение синтеза содержащих трегалозу сурфактантов более чем в 2 раза. Полученные результаты свидетельствовали о ключевой роли гена *alkB2* в синтезе биоПАВ при разных температурных режимах. В то же время роль гена *alkB6* возрастала при температуре 42°C, что могло быть обусловлено его повышенной транскрипционной активностью.

Ключевые слова: гены *alkB*, алкан-1-монооксигеназы, биоПАВ**DOI:** 10.31857/S0026365622600687, **EDN:** ATIXSO

Сырая нефть и продукты ее переработки широко используются в качестве основных источников энергии. В результате утечек при добыче, транспортировке и несоблюдения условий хранения углеводороды природного и антропогенного происхождения накапливаются в окружающей среде и негативно влияют на жизнедеятельность всех живых организмов. Наиболее распространенными загрязнителями являются алканы, составляющие от 20 до 50% сырой нефти, а также входящие

в состав нефтепродуктов и отходов переработки нефти (нефтешламы) (Liu et al., 2014). Кроме того, алканы могут выделяться в окружающую среду в результате жизнедеятельности бактерий, водорослей и грибов (Schirmer et al., 2010). Такие свойства, как неполярность, низкая растворимость в воде, высокая степень накопления в клеточных мембранах, большие энергетические затраты на окисление делают эти молекулы инертными и сложными для микробного метаболизма (Rojo,

2009; Liu et al., 2014). Тем не менее, широкий круг микроорганизмов (бактерии, одноклеточные грибы и водоросли) способны утилизировать алифатические углеводороды за счет присутствия в их хромосомах генов, кодирующих синтез гидроксилаз (алкан-1-моноксигеназы, цитохромы P450), обеспечивающих окисление алканов (van Beilen, Funhoff, 2007; Rojo, 2009; Nie et al., 2014). Алкан-1-моноксигеназы, содержащие гистидин в функционально значимых доменах Hist1 [HELGHK]; Hist2 [EHNXGHN], Hist3 [LQRHSDHNA] и HYG [NYLEHYGI] (Shanklin et al., 1994; Smits et al., 1999; Whyte et al., 2002), могут входить в состав ферментативных комплексов, функциональная активность которых зависит от переносчиков электронов (рубредоксины и рубредоксинредуктазы) (van Beilen et al., 2002; Nie et al., 2014).

Среди деструкторов особое место принадлежит бактериям рода *Rhodococcus*, способным использовать в качестве единственного источника углерода и энергии широкий спектр алифатических, ароматических и полициклических углеводородов природного и антропогенного происхождения (Larkin et al., 2005; Martínková et al., 2009; Kim et al., 2018). Практически неограниченные метаболические возможности данных микроорганизмов, большинство видов которых не являются патогенными для растений и животных (патогены растений представлены штаммами вида *R. fascians*, патогены животных — *R. hoagii/R. equi*), во многом обусловлены особенностями генетической организации (Sepiceros et al., 2017). Они не только содержат сложно организованные системы деградации, но и способны синтезировать поверхностно-активные вещества (биоПАВ) с уникальными свойствами (Kügler et al., 2015). Эти соединения, обладая высокой функциональной активностью в небольших концентрациях, снижают поверхностное и межфазное натяжение жидкостей и эмульгируют гидрофобные субстраты, повышая их доступность для микробной деградации (da Rosa et al., 2015; Eras-Muñoz et al., 2022). Для отдельных представителей данной таксономической группы достаточно подробно охарактеризованы системы деградации и установлен химический состав поверхностно-активных соединений. При этом наиболее детально изучены гликолипиды, продуцируемые бактериями *R. erythropolis* (Kuyukina et al., 2015; Luong et al., 2018). Показано, что оптимальным индуктором синтеза данных соединений является гексадекан (Mutalik et al., 2008). Первый этап окисления гексадекана обеспечивается алкан-1-моноксигеназами, а в результате последующих химических реакций образуются продукты (ацетилКоА, жирные кислоты), способные в ходе глюконеогенеза включаться в синтез углеводов (например, триозы) и синтез жирных кислот, входящих в состав клеточной стенки (миколаты) (Kuyukina, Ivshina, 2010). Для штамма *Rhodococcus*

sp. SD-74 показано, что при нарушении гена *alkB* не происходило синтеза биоПАВ (сукцинилтретгалозолипидов) (Inaba et al., 2013).

В силу практической значимости идентификации бактерий рода *Rhodococcus* уделяется достаточно большое внимание. Тем не менее, ряд практически важных штаммов не определены до вида даже при наличии полной нуклеотидной последовательности их геномов. Дело в том, что таксономический статус филогенетически близких видов бактерий рода *Rhodococcus* затруднен в силу генетического полиморфизма и сходства генов, кодирующих синтез 16S РНК (Majidzadeh, Fatahi-Bafghi, 2018). На основании сравнения геномов, жизненно важных генов, консервативных белков, ДНК–ДНК гибридизации и физиолого-биохимических особенностей выделено 7 основных филогенетических групп бактерий рода *Rhodococcus* (A, B, C, D, E, F и G), наиболее полиморфными из которых являются группы B (B1 и B2) и E (E1 и E2) (Gürtler et al., 2004; Sangal et al., 2016). Типичными представителями группы А являются бактерии *R. hoagii/R. equi*; группы B1 — *R. aetherivorans*, *R. ruber*; группы B2 — *R. coprophilus*, *R. pyridinivorans*, *R. rhodochrous*; группы C — *R. opacus*, *R. jostii*, *R. wratislaviensis*, *R. koreensis*; группы D — *R. erythropolis*, *R. qingshengii*; группы E — *R. fascians*; F — *R. corynebacterioides*, *R. kroppenstedtii*; группы G — *R. triatomae*. Для идентификации бактерий рода *Rhodococcus* использовали, в том числе, последовательности генов *alkB* (Táncsics et al., 2015). Однако систематический анализ данных детерминант и кодируемых ими белков в зависимости от филогенетического статуса содержащих их бактерий не проводился.

Целью данной работы являлся молекулярно-генетический анализ *alkB*-генов и кодируемых ими белков бактерий рода *Rhodococcus* в зависимости от их филогенетического статуса, а также установление роли генов, кодирующих алкан-1-моноксигеназы, в синтезе биоПАВ бактериями *R. pyridinivorans* 5Ap.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Штаммы, плазмиды и условия культивирования бактерий. В работе использовали штамм *R. pyridinivorans* 5Ap (депонирован в Белорусскую коллекцию непатогенных микроорганизмов Института микробиологии НАН Беларуси под номером БИМ В-939 Г), *E. coli* BW19851 (Metcalf et al., 1994) и плазмиду pK18mob (Schäfer et al., 1994). Бактерии культивировали при температуре 28 и 42°C в полной пептонно-дрожжевой среде (г/л: пептон ферментативный — 10, дрожжевой экстракт — 5, NaCl — 8) с добавлением гексадекана (2%) в качестве индуктора и минеральной модифицированной среде Мюнца (Pirog et al., 2010), содержащей сукцинат натрия (0.4%) или гексадекан (2%) в качестве

источников углерода. Агаризованные среды содержали 1.5% агара.

Выделение ДНК. Тотальную ДНК выделяли саркозиловым методом (te Riele et al., 1986). Плазмидную ДНК выделяли с использованием набора реактивов Fast-n-Easy Plasmid Mini-Prep Kit (“Jena Bioscience”, Германия).

Аmplификация и клонирование генов. Для амплификации использовали Pfu ДНК-полимеразу производства “Thermo Scientific” (ЕС) и праймеры производства ОДО “Праймтех” (Беларусь). Реакционная смесь для ПЦР (50 мкл) содержала около 100 нг ДНК-матрицы, 0.2 ммоль/л каждого дНТФ, 0.5 мкмоль/л каждого праймера, 5% DMSO, 3% глицерина, 2.5 ед. ДНК-полимеразы и соответствующий буфер. Для амплификации фрагмента гена *alkB2* размером 550 п.н. использовали праймеры *alk-H1F* (5'-cigiicacgaittigicaaagaagg-3') и *alk-H3R* (5'-igcitgitgatciiigtgicgctgiag-3') (Chénier et al., 2003) при режиме: 95°C – 5 мин (1 цикл); 95°C – 30 с, 55°C – 1 мин, 68°C – 40 с (30 циклов); 68°C – 10 мин (1 цикл). Для амплификации гена *alkB6* размером 660 п.н. использовали праймеры *alkB1-F* (5'-cttctacgtcgaacasaatcg-3') и *alkB1-R* (5'-tgaatcgcattctgttctcag-3') при режиме: 95°C – 5 мин (1 цикл); 95°C – 30 с, 60°C – 1 мин, 68°C – 30 с (30 циклов); 68°C – 10 мин (1 цикл).

Продукты амплификации генов *alkB2* и *alkB6* очищали с помощью набора Agarose Gel Extraction Kit производства “Jena Bioscience” (Германия) и лигировали с суицидальным вектором pK18mob, предварительно обработанным рестриктазой *SmaI*.

Введение плазмид в клетки бактерий. Трансформацию бактерий *E. coli* осуществляли согласно методу, приведенному в работе (Wood, 1983).

Плазмиды pK18mob с клонированными фрагментами генов *alkB2* и *alkB6* в клетки *R. pyridinivorans* 5Ar вводили методом конъюгации, описанным в работе (van der Geize et al., 2001). В качестве доноров в конъюгационных скрещиваниях для введения гибридных плазмид использовали штамм бактерий *E. coli* BW19851. В качестве реципиентов использовали рифампицинрезистентные варианты бактерий *R. pyridinivorans* 5Ar, отобранные в результате спонтанного мутагенеза. Для получения спонтанных мутантов бактерий *R. pyridinivorans* 5Ar устойчивых к рифампицину, бактерии культивировали в 5 мл жидкой полноценной пептонно-дрожжевой среды в течение 24 ч при 28°C, 140 об./мин. Центрифугировали 5 мин при 6500 об./мин. Осадок высевали на плотную среду с рифампицином (100 мг/мл) и инкубировали при 28°C до появления устойчивых к антибиотику колоний.

Анализ инсерционных мутантов. Интеграцию гибридных плазмид в хромосому бактерий *R. pyridinivorans* 5Ar устанавливали с помощью полимеразной цепной реакции. В результате с исполь-

зованием праймера M13F (5'-actggccgctgctttaca-3'), отжигающегося на последовательности вектора pK18mob, и праймеров FAlkB2-r (5'-tgatgctgaagatcggactc-3') и RAlkB6-out (5'-ctaactcgcaccacsgtatc-3'), отжигающихся, соответственно, вне области встраивания гибридных векторов в ген *alkB2* и *alkB6*, были получены фрагменты искомого размера 663 и 743 п.н. В обоих случаях амплификацию проводили при режиме 95°C – 5 мин (1 цикл); 95°C – 30 с, 52°C – 30 с, 72°C – 50 с (25 циклов); 72°C – 10 мин (1 цикл).

Анализ синтеза биоПАВ. Для определения содержания гликолипидов бактерий *R. pyridinivorans* 5Ar культивировали в полноценном пептонно-дрожжевом бульоне с добавлением 2% гексадекана в течение 72 ч с аэрацией (140 об./мин). Экстракцию сурфактанта осуществляли с использованием метилтретбутилового эфира (Kuyukina et al., 2001) с последующим разведением полученного препарата в 10 раз. С использованием фенол-сернокислого метода (DuBois et al., 1956) определяли содержание трегалозы, являющейся частью гликолипида, на спектрофотометре Metertech SP-8001 (Тайвань). Концентрацию сахара устанавливали согласно построенному градуировочному графику зависимости оптической плотности раствора от концентрации трегалозы (0–130 мг/л) при длине волны 483 нм.

Индекс эмульгирования определяли по методике, описанной в работе (Cooper, Goldenberg, 1987), и рассчитывали как отношение объема эмульсии, образующейся при перемешивании культуральной жидкости с гексадеканом, к общему объему раствора.

ПЦР в реальном времени. Для определения экспрессии генов *alkB* использовали культуру бактерий *R. pyridinivorans* 5Ar на поздней экспоненциальной фазе роста после культивирования в модифицированной среде Мюнца с гексадеканом 2%, либо 0.4% сукцината натрия в качестве единственного источника углерода. Для получения препаратов тотальной РНК использовали набор Aurum™ Total RNA Mini Kit (“Bio-Rad”, США), концентрацию РНК определяли спектрофотометрически, качество препаратов оценивали с помощью электрофореза в агарозном геле. Для удаления примесей геномной ДНК выделенную РНК (1 мкг) обрабатывали ДНКазой (“Thermo Fisher Scientific”, США). Для синтеза кДНК использовали набор RevertAid RT Reverse Transcription Kit (“Thermo Fisher Scientific”, США). Реакцию амплификации проводили с использованием набора реагентов для проведения ПЦР в реальном времени в присутствии красителя SYBR Green I (“Синтол”, Россия) при режиме: 95°C – 3 мин; 95°C – 20 с, 60°C – 20 с, 72°C – 5 с (40 циклов). Контаминация геномной ДНК во всех исследуемых образцах не превышала 3%. В качестве референсного использовали ген 16S

рПНК ($SD = 0.82$; $CV = 8.5\%$). Относительное количество мПНК определяли по формуле Pfaffl (Pfaffl, 2001). Для статистического анализа данных использовали непарный критерий Стьюдента для сравнения данных с помощью программы RStudio версии 4.0.0. Все результаты получены из пяти независимых повторностях.

Для амплификации фрагмента генов *alkB2* в режиме реального времени использовали праймеры F-*alkB2*-r (5'-tgatgtcgaagatcggactc-3') и R-*alkB2*-g (5'-tagaagtgtccgtagaacgac-3'). Для амплификации гена *alkB6*: F-*alkB1*-r (5'-tattgatcatcctggctctgttc -3') и R-*alkB1*-rn (5'-tgaatcgattctgtttctcag-3'), для референсного гена 16S: 5Ap_835f (5'-gccgtagccaacgcattaag-3') и 5Ap_1163r (5'-caccttctccgagttgacc-3'). Для каждой пары праймеров эффективность амплификации определяли по значению угла наклона калибровочной кривой. Специфичность реакции подтверждали анализом кривой плавления и электрофорезом в агарозном геле.

Информативный анализ. С помощью программы SyntTax (сайт: <https://archaea.i2bc.paris-saclay.fr/synttax/Default.aspx>) проводили анализ детерминант, локализованных выше и ниже по течению от оперонов с генами *alkB1–alkB2* и отдельно расположенными генами *alkB3–alkB8* в 122 геномах бактерий рода *Rhodococcus*. Для анализа генов *alkB* использовали полные нуклеотидные последовательности геномов или отдельные контиги из ГенБанка NCBI.

Для анализа нуклеотидных последовательностей использовали программы BLASTN2.8.0 (сайт: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Поиск гомологичных алкан-1-монооксигеназ бактерий рода *Rhodococcus* осуществляли в базе данных NCBI с использованием программы psi-blast. Для поиска гомологичных алкан-1-монооксигеназ использовали типовые аминокислотные последовательности белков AlkB2 (BCN60035) бактерий *R. hoagii* JCM94-27 (группа А); AlkB1 (UGQ42164), AlkB6 (UGQ42459) бактерий *R. aetherivorans* CVO21-1; AlkB2 (AHD20546), AlkB6 (AHD21141) бактерий *R. pyridinivorans* SB3094 (группа В); AlkB1 (UDG96167) бактерий *R. opacus* PD630 (группа С); AlkB1 (AUS30370), AlkB2 (AUS31590), AlkB3 (AUS34488), AlkB4 (AUS31854), AlkB5 (AUS30751) бактерий *R. qingshengii* djl-6-2 и AlkB1 (ALU73034), AlkB2 (ALU71748), AlkB3 (ALU68780), AlkB4 (ALU71564) бактерий *R. erythropolis* R138 (группа D); AlkB1 (AMY52517), AlkB7 (AMY52949), AlkB8 (AMY51400) бактерий *R. fascians* D188 (группа E) и AlkB1 (QNG18787) бактерий *R. triatoma* DSM 44893 (группа G). Аминокислотные последовательности гомологичных алкан-1-монооксигеназ выравнивали с помощью программы ClustalX version 2.1 и использовали для поиска функциональных доменов с приме-

нием программы MEME (сайт: <http://meme-suite.org/index.>, версия 5.1.1).

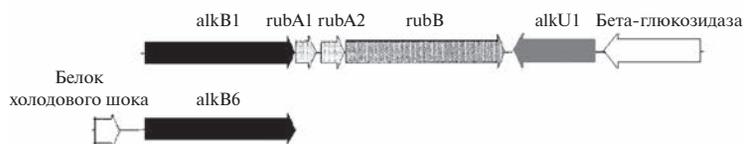
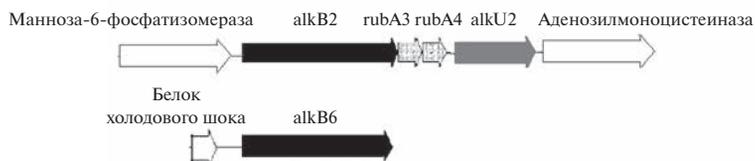
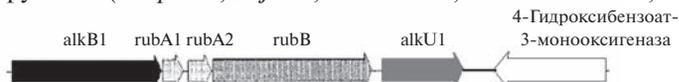
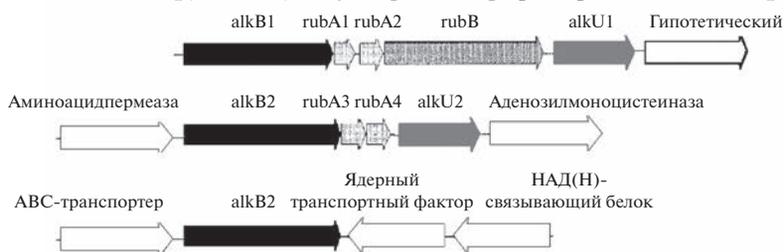
Построение филогенетического дерева полно-размерных аминокислотных последовательностей алкан-1-монооксигеназ осуществляли методом ближайших соседей (1000 бутстрепов) в программе MEGA7 (Kumar et al., 2016).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Особенности генетической организации генов, кодирующих синтез алкан-1-монооксигеназ. В состав всех известных алкан-1-монооксигеназ входят функциональные домены Hist1 [HELGHK]; Hist2 [EHNXGHN], Hist3 [LQRHSDHHA] и HYG [NYLEHYGI], наиболее консервативным из которых является аминокислотная последовательность HYG-домена, присутствующая в родственных монооксигеназах, таких как три ксилолмонооксигеназы (*XylM*), нитротолуолмонооксигеназа (*NtnMa*) и две цименмонооксигеназы (*CymAa*) (Whyte et al., 2002). Анализ генов *alkB* бактерий рода *Rhodococcus*, кодирующих содержащие данные функциональные домены белки (исключение составили бактерии группы F, для которых отсутствовали данные о полногеномном секвенировании), позволил установить, что их количество и генетическая организация зависела от принадлежности к определенной филогенетической группе (рис. 1).

На основании генетической организации можно выделить три типа генов, кодирующих синтез алкан-1-монооксигеназ у бактерий рода *Rhodococcus*. Гены *alkB1* и *alkB2* входили в состав оперонов. При этом опероны, содержащие гены *alkB1*, представлены пятью генами (*alkB1*, *rubA1*, *rubA2*, *rubB* и *alkU1*), три из которых, определяли синтез переносчиков электронов (рубредоксины, кодируемые генами *rubA1*, *rubA2* и рубредоксин-редуктазы, кодируемые генами *rubB*), необходимых для функциональной активности алкан-1-монооксигеназ (van Beilen et al., 2002; Nie et al., 2014). Последний ген в оперонах являлся регуляторным. Гены *alkB2* локализованы в оперонах (*alkB2*, *rubA3*, *rubA4* и *alkU2*), в которых отсутствовали детерминанты, кодирующие рубредоксин-редуктазы. Все остальные гены (обозначены как *alkB3–alkB8*) были представлены отдельными транскрипционными единицами, локализованными в разных участках хромосом.

В результате анализа геномов было установлено, что в хромосомах бактерий филогенетических групп В1, С, D, E и G в составе оперонов выявлялись гены *alkB1*. При этом у бактерий группы В1 регуляторный ген *alkU1* не входил в состав оперона, а присутствовал в виде детерминанты, расположенной в конце оперона (за геном *rubB*), и транскрибировался в противоположном направлении

Филогенетическая группа А (*R. hoagii*)Филогенетическая группа В1 (*R. aetherivorans*, *R. ruber*, *Rhodococcus* sp.)Филогенетическая группа В2 (*R. coprophilus*, *R. pyridinivorans*, *R. rhodochrous*)Филогенетическая группа С (*R. opacus*, *R. jostii*, *R. koreensis*, *R. wratislaviensis*, *Rhodococcus* sp.)Филогенетическая группа D (*R. erythropolis*, *R. qingshengii*, *Rhodococcus* sp.)

Фумарилацетоацетатгидролаза alkB4 Глутамат-тРНК-синтаза



Сортаза класса F alkB5* Гипотетический

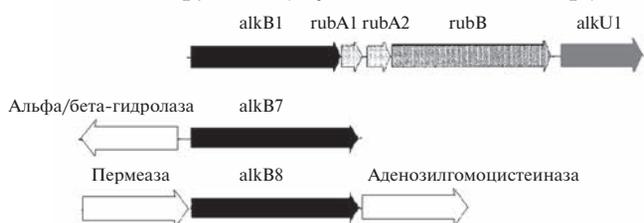
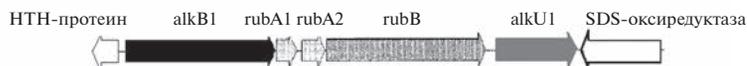
Филогенетическая группа Е (*R. fascians*, *Rhodococcus* sp.)Филогенетическая группа G (*R. triatomae*)

Рис. 1. Схема генетической организации локусов, содержащих гены *alkB* бактерий рода *Rhodococcus* филогенетических групп А, В1, В2, С, D, Е, G.

В геномах бактерий филогенетической группы А (*R. hoagii/R. equi*) и В2 (*R. coprophilus*, *R. pyridinivorans*, *R. rhodochrous*) гены *alkB1*-типа отсутствовали, но выявлялись *alkB2*-гены, входящие в состав оперонов (*alkB2*, *rubA3*, *rubA4* и *alkU2*), в которых отсутствовали детерминанты, кодирующие рубредоксинредуктазы. Такой же тип детерминант выявлен в хромосомах бактерий группы D, в которой также присутствовали гены *alkB1*-типа.

В хромосомах бактерий группы В, D и E дополнительно выявлено от одного до пяти отдельно локализованных генов *alkB* (*alkB3–alkB8*). В то же время отдельные детерминанты не выявлены в геномах бактерий филогенетических группы А, С и G. Наибольшее число отдельных генов *alkB* (*alkB3*, *alkB4*, *alkB5*) обнаружено в хромосомах бактерий филогенетической группы D (*R. erythropolis*, *R. qingshengii*). При этом гены *alkB3* и *alkB4* присутствовали у всех представителей этой филогенетической группы, тогда как гены *alkB5* выявлялись только в хромосомах представителей вида *R. qingshengii* (рис. 1).

Разнообразие в организации генов *alkB* в геномах бактерий рода *Rhodococcus* свидетельствует в пользу установленных ранее закономерностей, выявленных при анализе алкан-1-монооксигеназ бактерий разных систематических групп (Nie et al., 2014; Williams, Austin, 2022).

Во-первых, для функциональной активности алкан-1-монооксигеназы могут использовать разные и взаимозаменяемые белки-переносчики электронов (рубредоксины и ферредоксины, рубредоксинредуктазы и ферредоксинредуктазы), кодируемые генами, локализованными отдельно от генов *alkB*. Системы переноса электронов, необходимые для первых реакций аэробного окисления углеводов, в достаточно большом количестве представлены в геномах бактерий-деструкторов, в том числе бактерий рода *Rhodococcus*. Предполагается, что такая организация является наиболее лабильной и расширяет спектр функциональных возможностей алкан-1-монооксигеназ, в том числе, для генно-инженерных манипуляций (Williams, Austin, 2022). Исходя из вышесказанного, можно предположить, что разные типы генов *alkB* (отдельно локализованные и в составе оперонов) обладают функциональной активностью, а увеличение их количества либо страхует жизненно важные процессы, либо увеличивает спектр функциональных возможностей. В этом плане определенный интерес представляют бактерии *R. qingshengii*, в геноме которых выявляется пять *alkB*-генов (*alkB1–alkB5*).

Во-вторых, становление генетических систем, определяющих деградацию алканов, могло происходить до процессов видообразования (Nie et al., 2014). Выявленные в данной работе закономерности подтверждают данное предположение, по-

скольку виды, образующие одну филогенетическую группу, характеризуются одинаковой организацией генов *alkB*. Например, в филогенетически гетерогенной группе В выявлялись гены *alkB1*, присутствующие у всех представителей подгруппы В1 (*R. aetherivorans*, *R. ruber*) и *alkB2*, характерные для бактерий подгруппы В2 (*R. coprophilus*, *R. pyridinivorans*, *R. rhodochrous*). Однако в хромосомах всех представителей этой разнородной филогенетической группы выявлены одиночно локализованные гены *alkB6*, имеющие достаточно консервативную локализацию (перед генами *alkB6* расположены детерминанты, кодирующие синтез белков холодового шока). Данный факт может однозначно свидетельствовать в пользу монофилиетического происхождения бактерий группы В. Исходя из вышесказанного, можно предположить, что при становлении геномов одними из первых могли появиться одиночные детерминанты *alkB*, использующие для своей функциональной активности переносчики электронов, кодируемые генами, локализованными в других локусах хромосом. В то же время для более эффективной деградации определенных типов алканов появлялись *alkB*-гены в составе оперонов, кодирующих часть (рубредоксины) или комплексные системы переноса электронов (рубредоксины и рубредоксинредуктазы), имеющие собственные системы регуляции (соответственно, гены типа *alkB2* и *alkB1*) (Nie et al., 2014). В пользу этого предположения свидетельствует консервативная локализация генов *alkB2* в составе оперонов и отдельно локализованных генов *alkB3*, *alkB4*, *alkB5* и *alkB8*. Генетические детерминанты, окружающие данные опероны и отдельные гены, определяли синтез функционально схожих белков у всех представителей группы А, В2, D и E, независимо от их видового статуса (штаммы бактерий *R. hoagii/equi*, *R. coprophilus*, *R. pyridinivorans*, *R. rhodochrous*, *R. erythropolis*, *R. qingshengii* и *R. fascians*). Опероны, содержащие гены *alkB1*, имели менее консервативную локализацию, тем не менее, ниже по течению содержали функционально сходные детерминанты у всех представителей филогенетических групп В1 (*R. aetherivorans*, *R. ruber*), С (*R. opacus*, *R. jostii*, *R. wratislaviensis*, *R. koreensis*) и D (*R. erythropolis*, *R. qingshengii*). Только у представителей группы E (*R. fascians*) *alkB1*-гены в составе оперонов располагались в разных локусах хромосом. При этом в геномах этих патогенных для растений бактерий выявлялись гены *alkB7* и *alkB8*, которые, в отличие от генов *alkB1*, имели более консервативную локализацию. В геномах разных штаммов *R. fascians* гены *alkB8* окружены детерминантами, определяющими белки с одинаковой функциональной активностью. Гомологичные гены присутствовали и перед детерминантами *alkB7* (рис. 1).

Факт наличия генов *alkB* в геномах патогенных бактерий является весьма примечательным.

Известно, что в хромосомах представителей рода *Mycobacterium*, в том числе патогенных (например, *M. tuberculosis*), присутствуют только гены *alkB2*-типа (в составе оперонов отсутствует ген, кодирующий рубредоксинредуктазу). Подобным образом организованы гены *alkB2* в геномах бактерий *Rhodococcus* группы А, представленной патогенами животных *R. hoagii*/*R. equi*, а также бактерий деструкторов группы В2 и D. В то же время патогенные для растений бактерии *R. fascians* содержали помимо генов *alkB1*-типа, расположенных в разных участках хромосом, генетические детерминанты типов *alkB7* и *alkB8* с достаточно консервативной локализацией. Поскольку алканы широко распространены в естественной среде, наличие в геноме генов *alkB* у патогенных бактерий может обеспечивать защитную функцию, либо являться ключевой детерминантой, определяющей окисление алканов, с последующим образованием липидов и углеводов, которые включаются в поверхностные структуры бактериальной клетки в виде поверхностно-активных соединений, обладающих широким спектром функциональной активности.

Таким образом, на основании проведенного анализа можно заключить, что наибольшее число *alkB*-генов локализовано в хромосомах бактерий группы D (4 и 5 генов в хромосомах *R. erythropolis* и *R. qingshengii* соответственно). В то же время бактерии *R. opacus*, *R. jostii*, *R. wratislaviensis*, *R. koreensis*, способные окислять алканы, содержат один ген *alkB1*-типа. Поскольку все исследованные филогенетические группы содержали определенные типы генов *alkB*, можно предположить, что становление данных детерминант происходило до процесса видообразования за счет дубликации и горизонтального переноса генов (Nie et al., 2014). В настоящее время в силу возрастающей антропогенной нагрузки на экосистемы горизонтальный перенос *alkB*-генов может играть важную роль в изменчивости геномов бактерий рода *Rhodococcus*. В качестве переносчиков генов *alkB* могут выступать внехромосомные генетические элементы. Анализ нуклеотидных последовательностей секвенированных плазмид позволил выявить в их составе гены *alkB*. Например, в крупной плазмиде pROB01 размером 558 192 п.н. бактерий *R. opacus* B4 локализован оперон, характерный для генов *alkB1*-типа (координаты 414120–417617), в непосредственной близости от которого (ниже по течению) располагался ген, кодирующий транспозазу семейства IS6 (нуклеотидная последовательность плазмиды депонирована в ГенБанк NCBI под номером NC_012520.1). В составе плазмиды pdjl-6-1 размером 108 815 п.н. бактерий *R. qingshengii* JCM 15477 присутствовал одиночный ген *alkB*, перед которым локализовались детерминанты, определяющие синтез транспозазы семейства IS21 (нуклеотидная последовательность плазмиды депонирована

на в ГенБанк NCBI под номером CP096564). В плазмиде 1 размером 179 109 п.н. бактерий *R. ruber* R1 выявлен одиночный *alkB*-ген (нуклеотидная последовательность плазмиды депонирована в ГенБанк NCBI под номером NZ_CP038031). Безусловно, по мере увеличения числа секвенированных геномов бактерий рода *Rhodococcus*, не исключается возможность обнаружения разных по организации генов *alkB* в составе внехромосомных генетических элементов. Следует отметить, что присутствие определенных комбинаций генов *alkB* плазмидного и хромосомного происхождения может обеспечить расширение спектра или увеличение эффективности утилизируемых углеводородных субстратов.

Филогенетический анализ алкан-1-монооксигеназ.

Анализ белков, кодируемых генами *alkB*, показал, что их условно можно разбить на три филогенетические группы. Первая группа являлась достаточно разнородной и представлена белками AlkB1-типа бактерий *R. aetherivorans*, *R. ruber* (группа В1) и *R. opacus*, *R. jostii*, *R. wratislaviensis*, *R. koreensis* (группа С), а также белками AlkB2-типа бактерий *R. erythropolis* и *R. qingshengii* (группа D) и *R. hoagii/equi* (группа А). Вторая филогенетическая группа включала только белки AlkB2-типа бактерий *R. coprophilus*, *R. pyridinivorans*, *R. rhodochrous* (группа В2). Третью группу составляли наиболее отдаленные от остальных в филогенетическом отношении белки AlkB1-типа бактерий *R. triatomae* (группа G) и *R. erythropolis*, *R. qingshengii* (группа D) (рис. 2).

Следует отметить, что ферменты типа AlkB1 характерны для непатогенных бактерий-деструкторов филогенетических групп В1, С и G и патогенных для растений бактерий группы E. Ферменты второго типа AlkB2 синтезируются в клетках бактерий-деструкторов группы В2 и патогенных для животных бактерий группы А. Особое положение занимает группа D, представленная бактериями-деструкторами и наиболее изученными продуцентами биоПАВ (*R. erythropolis*, *R. qingshengii*), которые синтезируют два типа филогенетически отдаленных алкан-1-монооксигеназ. При этом тип AlkB1 наиболее близок к таковому бактерий G (*R. triatomae*), а тип AlkB2 проявляет наибольшее сходство с таковым патогенных для животных бактерий группы А (*R. hoagii/R. equi*).

Анализ алкан-1-монооксигеназ, кодируемых генами *alkB3–alkB8*, расположенными отдельно в достаточно определенных локусах хромосом, показал, что они образуют отдельные филогенетические группы. В первую группу входили белки AlkB3–AlkB5. При этом белки AlkB5 синтезировались только бактериями *R. qingshengii*. Алкан-1-монооксигеназы AlkB6 отличались по аминокислотной последовательности у бактерий группы В1 и В2. Наибольшим отличием характеризовались

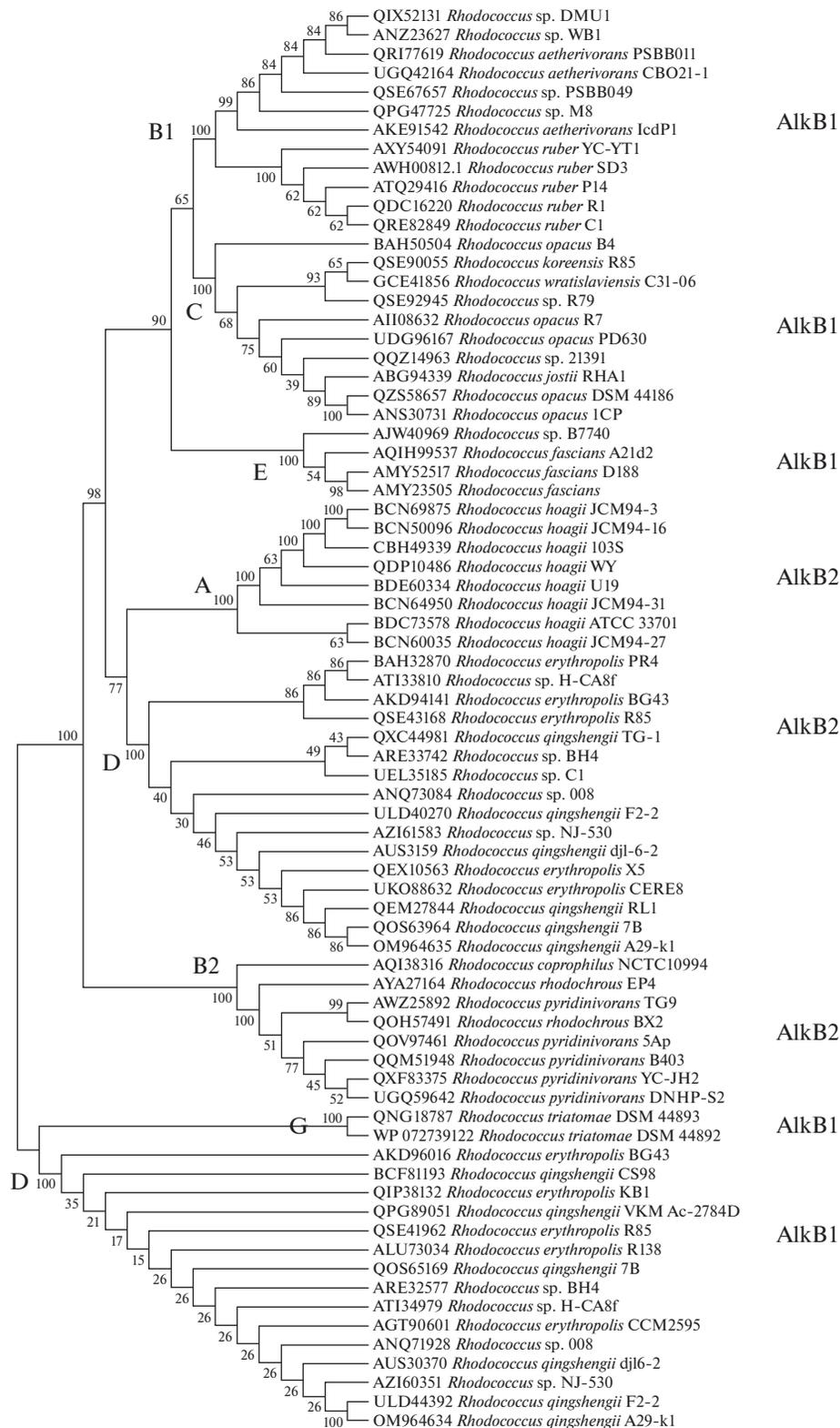


Рис. 2. Филогенетическое дерево алкан-1-монооксигеназ, детерминированных генами *alkB1* и *alkB2* бактерий рода *Rhodococcus*.

белки AlkB7 и AlkB8, синтез которых обеспечивался фитопатогенами *R. fascians* (рис. 3).

Выявленные закономерности представляются важными для изучения функциональной роли отдельных алкан-1-монооксигеназ в жизнедеятельности бактерий рода *Rhodococcus* и открывают новые возможности для установления/уточнения их таксономического статуса. Как указывалось ранее, систематике родококков уделяется большое внимание, поскольку большинство видов этого обширного рода являются эффективными деструкторами органических и неорганических соединений, а два вида вызывают заболевания животных (*R. hoagi*) и растений (*R. fascians*). Знание видовой принадлежности практически значимых микроорганизмов является неотъемлемой частью их детального генетического анализа и абсолютно необходимо для дальнейшего практического использования. Выявленные в ходе данного исследования закономерности дополняют имеющиеся данные и могут учитываться при анализе полногеномного секвенирования, а также при диагностике близкородственных видов. Например, с использованием праймеров, обеспечивающих амплификацию генов *alkB5*, достаточно быстро можно отличить *R. qingshengii* от близкородственного вида *R. erythropolis* (Ратникова, Титок, 2020). Весьма показательным может быть пример бактерий с неустановленным видовым статусом. Например, в хромосомах охарактеризованных штаммов *Rhodococcus* sp. Q15 и *R. erythropolis* NRRL B-16531 выявлено 4 гена, кодирующих алкан-1-монооксигеназы (Whyte et al., 2002). Проведенный анализ генов *alkB* этих бактерий показал, что они содержат ген *alkB5* и, следовательно, могут быть отнесены к виду *R. qingshengii*. Наличие детерминанты *alkB5* в геноме штаммов с неустановленной видовой принадлежностью позволяет уточнить их таксономический статус (Ратникова, Титок, 2020). При этом, необходимо учитывать, что природные бактерии даже одного вида, несмотря на присутствие в их геномах систем, обеспечивающих генетическую стабильность, могут достаточно быстро изменяться за счет мутационного процесса и горизонтального переноса генов, что вызывает сложности не только в систематике, но и при проведении генетического анализа. Тем не менее, наличие особенностей в организации генов *alkB* в зависимости от таксономического статуса может лежать в основе понимания становления геномов этой практически значимой группы микроорганизмов, а наличие сходства белков, кодируемых данными генетическими детерминантами, позволяет целенаправленно изучать их роль в метаболизме бактерий.

Гены, кодирующие алкан-1-монооксигеназы у природных бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap. Анализ генома исследуемых бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap показал, что в хромосоме этих микроорганизмов

локализовано два *alkB*-гена, один из которых имел организацию, сходную с детерминантами *alkB2*-типа бактерий филогенетических групп группы А, представленной патогенами животных *R. hoagii*/*R. equi*, бактерий деструкторов группы В2 (*R. coprophilus*, *R. pyridinivorans*, *R. rhodochrous*) и D (*R. erythropolis* и *R. qingshengii*). Данные гены кодируют белки с одинаковыми аминокислотными последовательностями в области функциональных доменов. Однако N- и C-концевые участки данных белков содержали разные по составу и количеству аминокислотные последовательности. Достаточно большое количество несинонимических отличий, приводящих к консервативным заменам, приходилось на участки, расположенные между функционально значимыми доменами (обозначены на рис. 4 двумя точками) (рис. 4).

Вторая отдельно локализованная детерминанта *alkB6* определяла синтез белка, который отличался не только от удаленных в филогенетическом отношении белков AlkB3, AlkB4, AlkB5, AlkB7 и AlkB8, но и от филогенетически близкого белка, кодируемого геном *alkB6* бактерий группы В1. Кроме консервативных несинонимических замен в N-, C-концевых и промежуточных участках данных белков, одиночные аминокислотные замены выявлялись в белке AlkB8 бактерий *R. fascians* в области всех функциональных доменов кроме Hist3 (рис. 5). Приведенные данные согласуются с результатами филогенетического анализа (рис. 2, 3).

Роль генов, кодирующих алкан-1-монооксигеназы, в синтезе биоПАВ бактериями *R. pyridinivorans* 5Ap. Перед проведением функционального анализа генов *alkB* был осуществлен поиск генетических детерминант, способных определять синтез биоПАВ бактериями *R. pyridinivorans* 5Ap. В результате в хромосоме данных микроорганизмов выявлены детерминанты, способные определять синтез трегалозы (наиболее часто входит в состав гликолипидов). Данный дисахарид образуется в результате превращения молекул глюкозы во фруктозу с последующим расщеплением на триозы, которые в ходе основного (определяется продуктами генов *ostA* и *ostB*) и альтернативного (определяется продуктами генов *treY* и *treZ*) путей превращаются в трегалозу. При этом глюкоза, являющаяся исходным субстратом для образования трегалозы, образуется в ходе глюконеогенеза. В ходе двух первых необратимых реакций глюконеогенеза (всего включает 10 реакций, 3 из которых необратимы) пируват превращается оксалоацетат, который под действием фосфоенолпируват киназы (фосфоенолпируват синтазы) превращается фосфоенолпируват. Данные реакции являются ключевыми в глюконеогенезе. Фосфоенолпируват киназа кодируется геном *ppsA*. В геноме бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap ген *ppsA* представлен тремя копиями (*ppsA1*, *ppsA2* и *ppsA3* с координатами 1629179–1631701, 2838142–2840427 и 3924850–

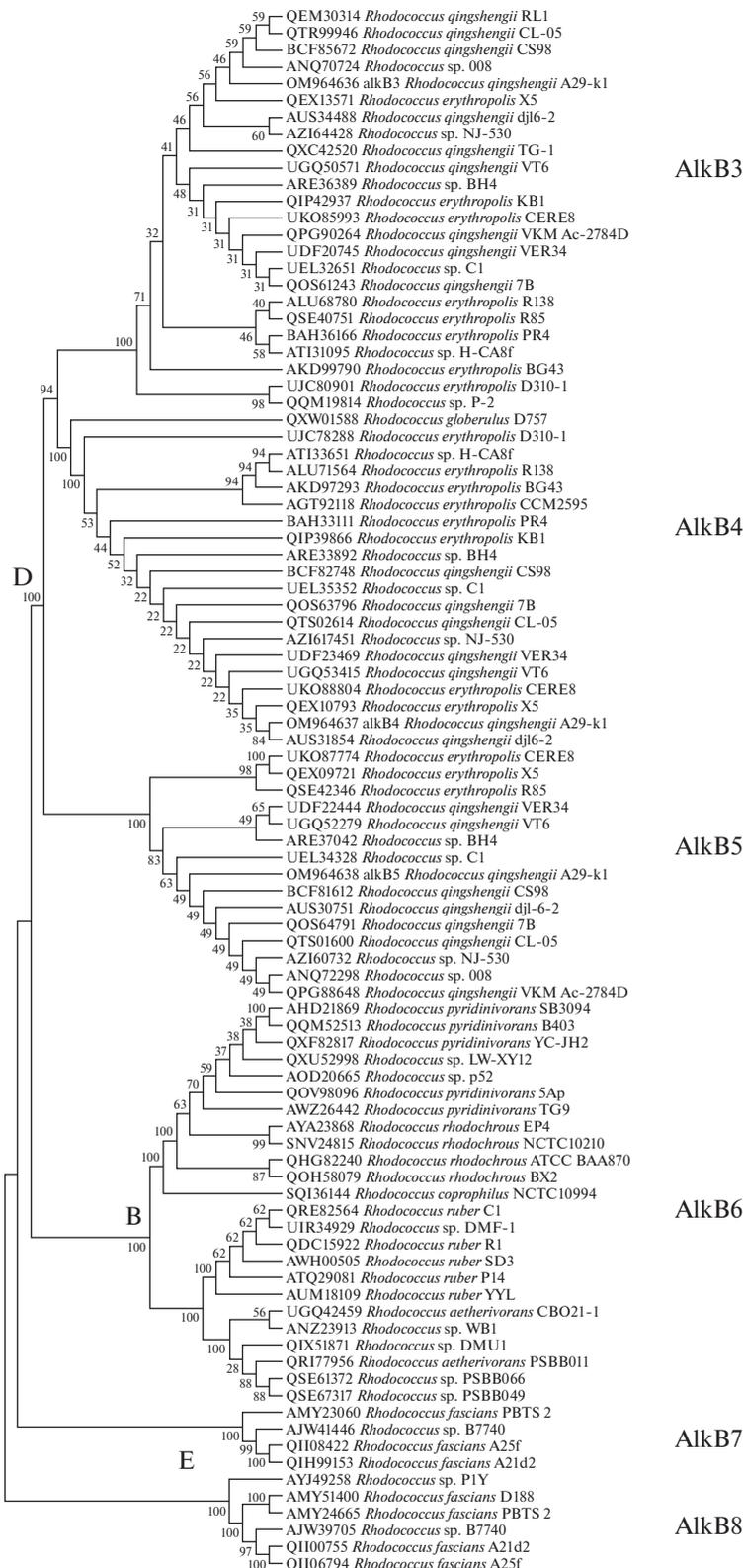


Рис. 3. Филогенетическое дерево алкан-1-монооксигеназ, детерминированных генами *alkB3*–*alkB8* бактерий рода *Rhodococcus*.

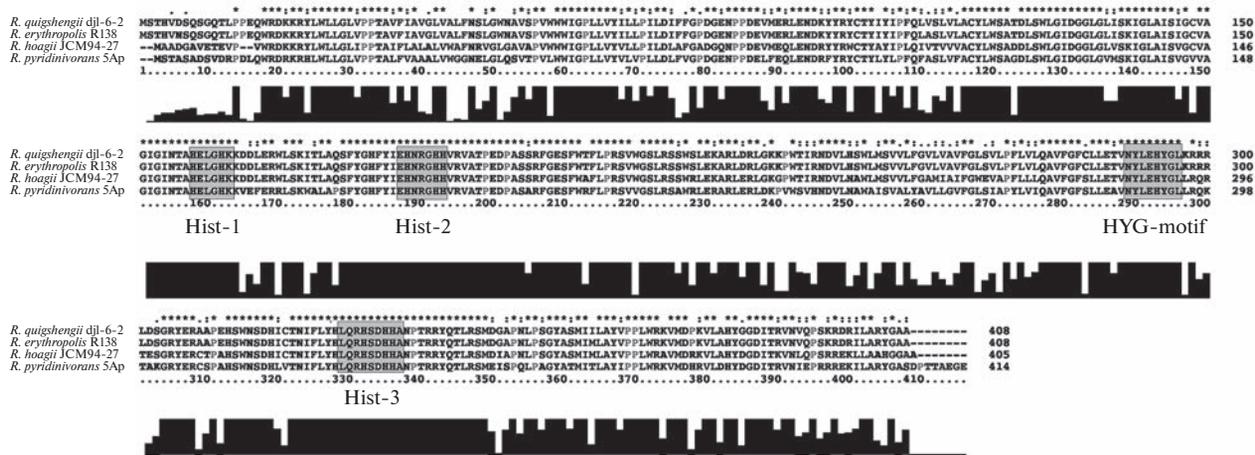


Рис. 4. Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей алкан-1-монооксигеназ, детерминируемых генами *alkB2* бактерий филогенетических групп А, В2 и D.

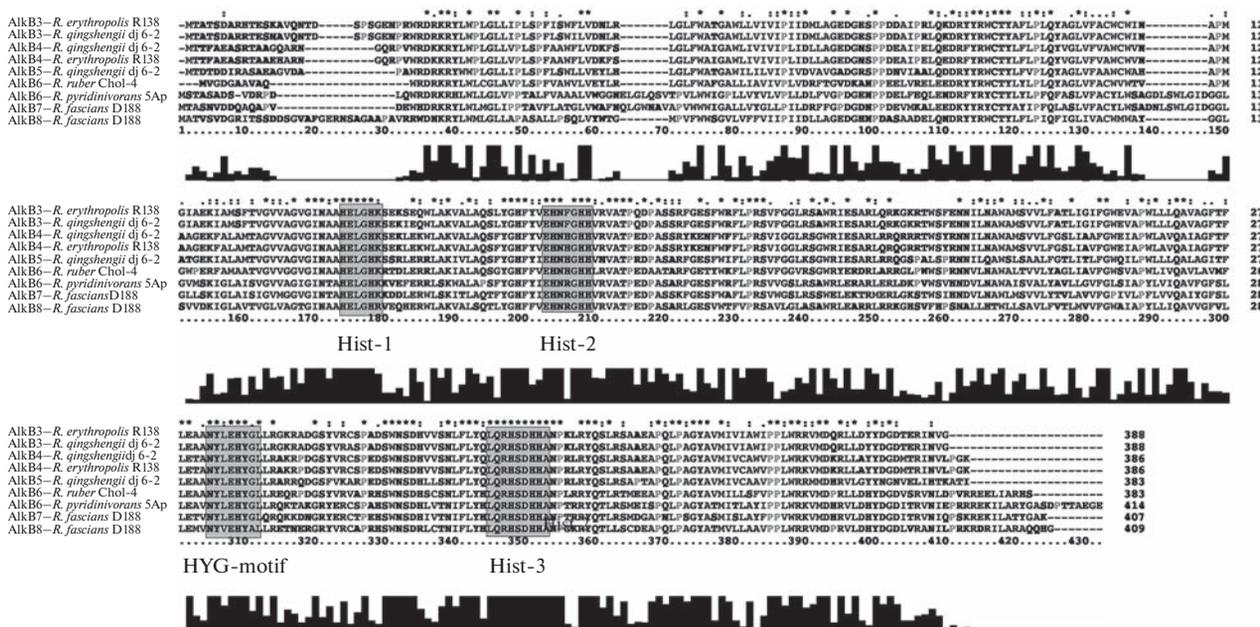


Рис. 5. Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей алкан-1-монооксигеназ бактерий *R. qingshengii* и *R. erythropolis*, кодируемых генами *alkB3-alkB5*; бактерий *R. pyridinivorans* и *R. ruber*, кодируемых генами *alkB6*; бактерий *R. fascians*, кодируемых генами *alkB7-alkB8*.

3925956 соответственно). Присутствие трех копий детерминант *ppsA* может свидетельствовать о важности процесса глюконеогенеза для данных микроорганизмов, поскольку образующая *de novo* глюкоза используется, в частности, для синтеза трегалозы, играющей важную роль в клеточном метаболизме, в том числе, для синтеза гликолипидов (Inaba et al., 2013).

Как указывалось ранее, ключевой путь синтеза трегалозы *de novo* происходит с участием трегалозо-6-фосфат синтазы (продукт гена *otsA*) и трегалозо-6-фосфат фосфатазы (продукт гена *ostB*). В

хромосоме бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap локализовано две копии гена *otsA* (с координатами 637 208–638 719 и 3936 036–3937 479 соответственно) и две копии *ostB* (с координатами 509 155–511 689 и 2588 284–2589 099 соответственно). В то же время гены *treY* (координаты 2929 869–2932 262) и *treZ* (координаты гена 2935 639–2937 414), определяющие альтернативный путь синтеза трегалозы, являются уникальными.

Отличительной особенностью всех актинобактерий является присутствие в составе клеточной стенки миколовых кислот (квалификацион-

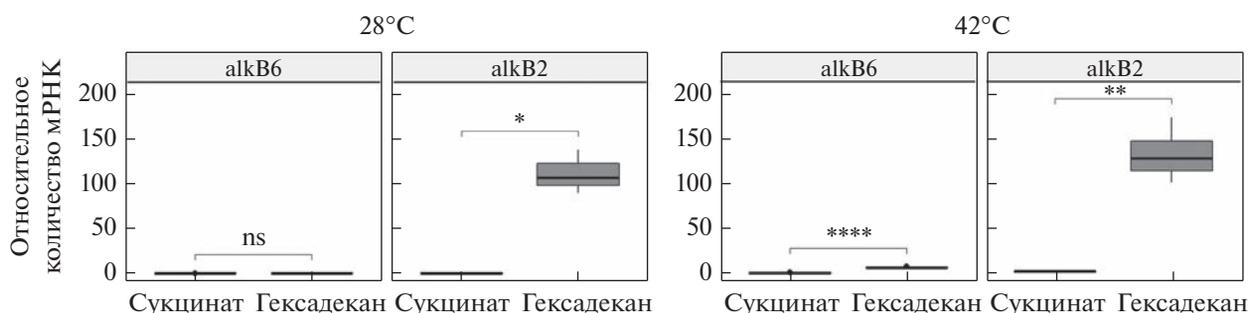


Рис. 6. Относительное количество мРНК, кодируемой генами *alkB2* и *alkB6* при разных температурах культивирования бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap в минимальной среде, содержащей в качестве источника углерода сукцинат натрия или гексадекан. Обозначения: ns – $P > 0.05$; * – $P \leq 0.1$; ** – $P \leq 0.01$; **** – $P \leq 0.0001$.

ный признак). Для синтеза этих соединений ключевую роль играют гены *fadD32*, *pks13* и *accD4*, входящие у бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap в состав одного оперона.

Следует отметить, что всем вышеуказанным генетическим детерминантам (*ppsA*, *ostA*, *ostB*, *treY*, *treZ*, *fadD32*, *pks13* и *accD4*) отводится важная роль в способности бактерий *R. erythropolis* синтезировать гликолипиды (Retamal-Morales et al., 2018). Присутствие гомологичных генов в хромосоме *R. pyridinivorans* 5Ap может свидетельствовать об их способности синтезировать биоПАВ данного химического состава.

Установлено, что бактерии *R. pyridinivorans* 5Ap, растущие с одинаковой эффективностью при 28 и 42°C, синтезировали биоПАВ с высокой эмульгирующей активностью вне зависимости от температуры культивирования (индекс эмульгирования составлял более 50%). При этом содержание трегалозы в составе биоПАВ не превышало 300 мг/л, что более чем в 100 раз меньше известных продуцентов трегалолипидов (до 40 г/л) (Uchida et al., 1989). Полученные данные свидетельствовали в пользу того, что эмульгирующая активность бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap определялась не только продукцией гликолипидов (Uzoigwe et al., 2015).

Предварительно проведенный анализ экспрессии генов *alkB2* и *alkB6* бактерий дикого типа при выращивании в минимальной солевой среде показал, что транскрипция гена *alkB2* индуцировалась в присутствии гексадекана. При этом эффективность транскрипции данного гена не менялась при разных температурных режимах (28 и 42°C). В то же время ген *alkB6* с низкой эффективностью экспрессировался при температуре 28°C, но его транскрипция достоверно возрастала в присутствии гексадекана при температуре 42°C (рис. 6). Полученные данные обосновали определение эффективности синтеза биоПАВ бактериями *R. pyridinivorans* 5Ap при разных температурных режимах.

Для установления роли алкан-1-монооксигеназ в синтезе биоПАВ были получены мутанты бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap с нарушенными генами *alkB2* и *alkB6*. Для этого фрагменты данных генов были клонированы в состав суицидального вектора pK18mob, который вносили в клетки исследуемых бактерий путем конъюгации. В качестве селективного маркера использовали канамицин, устойчивость к которому обеспечивалась плазмидой pK18mob, в качестве контрселективного – рифампицин, устойчивость к которому была получена для штамма *R. pyridinivorans* 5Ap. Встраивание плазмиды в состав исследуемых генов, обеспечивающее их инактивацию, подтверждали полимеразной цепной реакцией (использовали праймеры, отжигающиеся на плазмиде и на хромосоме вне области инсерции). Для отобранных мутантов определяли эмульгирующую активность и количество продуцируемых гликолипидов (количество трегалозы в сыром сурфактанте). Следует отметить, что в минимальной среде, содержащей в качестве единственного источника углерода гексадекан, у мутанта с нарушенным геном *alkB2* количество жизнеспособных клеток не увеличивалось, но не становилось меньше (через 96 ч культивирования число жизнеспособных клеток соответствовало количеству внесенных бактерий в среду культивирования). Это свидетельствовало о том, что данная детерминанта является ключевой, но не единственной, обеспечивающей способность утилизировать гексадекан. В то же время в минимальной среде с гексадеканом рост мутанта с инактивированным геном *alkB6* практически не отличался от исходного штамма. В связи с неспособностью мутанта с нарушенным геном *alkB2* расти в минимальной среде с гексадеканом, для последующего анализа бактерии культивировали в полноценной среде с добавлением гексадекана в качестве индуктора. В этих условиях все исследуемые бактерии росли с одинаковой эффективностью. В результате было установлено, что относительно исходного штамма у мутанта с нарушенным геном *alkB2* эмульгирующая активность снижа-

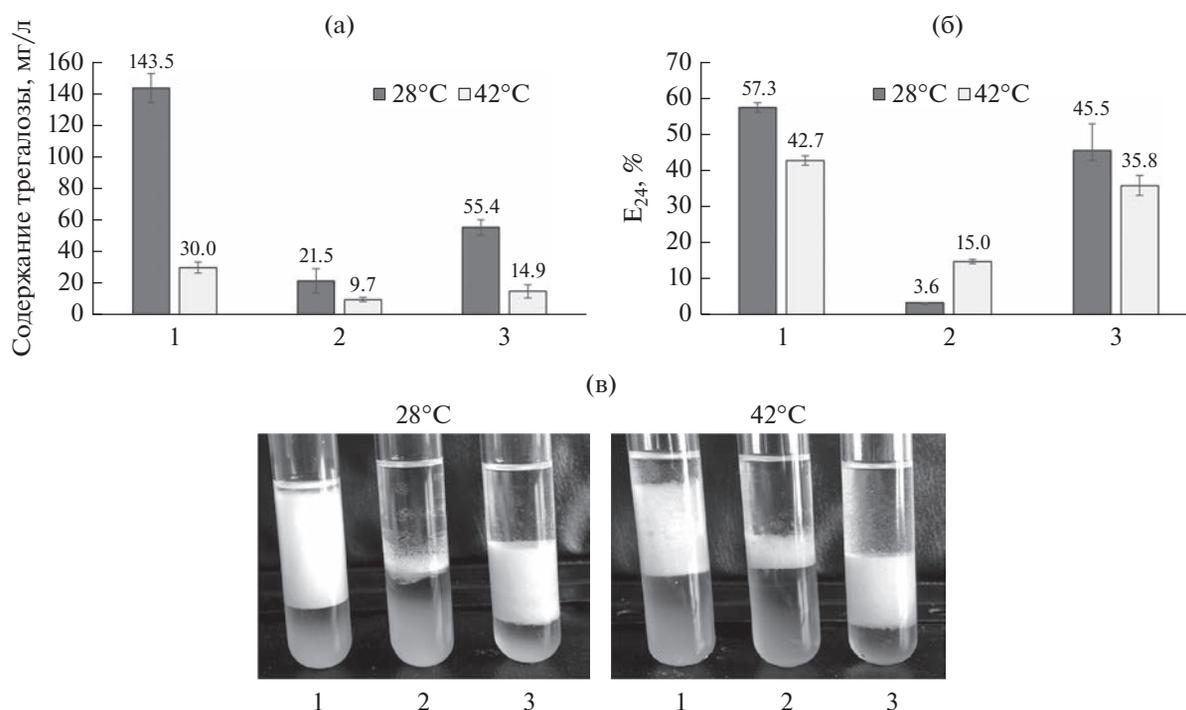


Рис. 7. Эффективность синтеза биоПАВ при разных температурах через 72 ч культивирования в полноценной среде с гексадеканом бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap: 1 – исходный рифампицинрезистентный штамм; 2 – мутант с инактивированным геном *alkB2*; 3 – мутант с инактивированным геном *alkB6*. (а) – Содержание трегалозы в сыром сурфактанте; (б) – индекс эмульгирования; (в) – эмульгирующая активность. Конечная концентрация жизнеспособных клеток для исходного штамма составила 1.5×10^8 КОЕ/мл (28 и 42°C) при исходной концентрации – 2.8×10^6 КОЕ/мл; мутанта с инактивированным геном *alkB2* – 1.8×10^8 КОЕ/мл (28 и 42°C) при исходной концентрации – 1.7×10^6 КОЕ/мл; мутанта с инактивированным геном *alkB6* – 2.2×10^8 КОЕ/мл (28 и 42°C) при исходной концентрации – 2.1×10^6 КОЕ/мл.

лась в 16 и 3 раза соответственно после культивирования при 28 и 42°C. Такую же закономерность регистрировали и для биоПАВ, содержащих трегалозу (количество уменьшалось соответственно в 7 и 3 раза после культивирования при 28 и 42°C). Для мутанта с нарушенным геном *alkB6* регистрировали снижение эмульгирующей активности и синтеза трегалолипидов (трегалозы) соответственно в 1.2 и более чем в 2 раза вне зависимости от температуры культивирования (рис. 7). Полученные результаты свидетельствовали о роли обоих исследованных детерминант в синтезе биоПАВ бактериями *R. pyridinivorans* 5Ap. При этом ген *alkB2* играл ключевую роль, но его инактивация не являлась летальной, и отсутствие его активности в большей степени компенсировалось при повышенной температуре увеличенной экспрессией гена *alkB6*.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнялась при финансовой поддержке Государственной программы научных исследований

(НИР № 3.6.2), грантов Министерства образования (НИР № 752/57 и НИР № 757/57).

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

Ратникова М.С., Титок М.А. Молекулярно-генетические маркеры для идентификации бактерий *Rhodococcus erythropolis* и *Rhodococcus qingshengii* // Микробиология. 2020. Т. 89. С. 444–452.

Ratnikova M.S., Titok M.A. Molecular genetic markers for identification of *Rhodococcus erythropolis* and *Rhodococcus qingshengii* // Microbiology (Moscow). 2020. V. 89. P. 435–442.

- Beilen J.B. van, Funhoff E.G. Alkane hydroxylases involved in microbial alkane degradation // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2007. V. 74. P. 13–21.
- Beilen J.B. van, Neuenschwander M., Smits T.H.M., Roth C., Balada S.B., Witholt B. Rubredoxins involved in alkane oxidation // *J. Bacteriol.* 2002. V. 184. P. 1722–1732.
- Ceniceros A., Dijkhuizen L., Petrusma M., Medema M.H. Genome-based exploration of the specialized metabolic capacities of the genus *Rhodococcus* // *BMC Genomics.* 2017. V. 18. P. 593.
- Chénier M.R., Beaumier D., Roy R., Driscoll B.T., Lawrence J.R., Greer C.W. Impact of seasonal variations and nutrient inputs on nitrogen cycling and degradation of hexadecane by replicated river biofilms // *Appl. Environ. Microbiol.* 2003. V. 69. P. 5170–5177.
- Cooper D.G., Goldenberg B.G. Surface-Active agents from two *Bacillus* species // *Appl. Environ. Microbiol.* 1987. V. 53. P. 224–229.
- DuBois Michel, Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith Fred. Colorimetric method for determination of sugars and related substances // *Anal. Chem.* 1956. V. 28. P. 350–356.
- Eras-Muñoz E., Farré A., Sánchez A., Font X., Gea T. Microbial biosurfactants: a review of recent environmental applications // *Bioengineered.* 2022. V. 13. P. 12365–12391.
- Geize R. van der, Hessels G.I., Gerwen R. van, Meijden P. van der, Dijkhuizen L. Unmarked gene deletion mutagenesis of *kdD*, encoding 3-ketosteroid Delta1-dehydrogenase, in *Rhodococcus erythropolis* SQ1 using *sacB* as counter-selectable marker // *FEMS Microbiol. Lett.* 2001. V. 205. P. 197–202.
- Gürtler V., Mayall B.C., Seviour R. Can whole genome analysis refine the taxonomy of the genus *Rhodococcus*? // *FEMS Microbiol. Rev.* 2004. V. 28. P. 377–403.
- Inaba T., Tokumoto Y., Miyazaki Y., Inoue N., Maseda H., Nakajima-Kambe T., Uchiyama H., Nomura N. Analysis of genes for succinoyl trehalose lipid production and increasing production in *Rhodococcus* sp. strain SD-74 // *Appl. Environ. Microbiol.* 2013. V. 79. P. 7082–7090.
- Kim D., Choi K.Y., Yoo M., Zylstra G.J., Kim E. Biotechnological potential of *Rhodococcus* biodegradative pathways // *Microbiol. Biotechnol.* 2018. V. 28. P. 1037–1051.
- Kügler J.H., Le Roes-Hill M., Syldatk C., Hausmann R. Surfactants tailored by the class *Actinobacteria* // *Front. Microbiol.* 2015. V. 6. Art. 212.
- Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis Version 7.0 for Bigger Datasets // *Mol. Biol. Evol.* 2016. V. 33. P. 1870–1874.
- Kuyukina M.S., Ivshina I.B. *Rhodococcus* biosurfactants: biosynthesis, properties, and potential applications // *Biology of Rhodococcus*, Microbiology Monographs / Ed. Alvarez H.M. Berlin, Heidelberg: Springer, 2010. P. 291–313.
- Kuyukina M.S., Ivshina I.B., Baeva T.A., Kochina O.A., Gein S.V., Chereshnev V.A. Trehalolipid biosurfactants from nonpathogenic *Rhodococcus* actinobacteria with diverse immunomodulatory activities // *Biotechnol.* 2015. V. 32. P. 559–568.
- Kuyukina M.S., Ivshina I.B., Philp J.C., Christofi N., Dunbar S.A., Ritchkova M.I. Recovery of *Rhodococcus* biosurfactants using methyl tertiary-butyl ether extraction // *J. Microbiol. Methods.* 2001. V. 46. P. 149–156.
- Larkin M.J., Kulakov L.A., Allen C.C.R. Biodegradation and *Rhodococcus* – masters of catabolic versatility // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2005. V. 16. P. 282–290.
- Liu H., Xu J., Liang R., Liu J. Characterization of the medium- and long-chain n-alkanes degrading *Pseudomonas aeruginosa* strain SJTD-1 and its alkane hydroxylase genes // *PLoS One.* 2014. V. 9. P. e105506.
- Luong T.M., Ponamoreva O.N., Nechaeva I.A., Petrikov K.V., Delean Ya.A., Surin A.K., Linklater D., Filonov A.E. Characterization of biosurfactants produced by the oil-degrading bacterium *Rhodococcus erythropolis* S67 at low temperature // *J. Microbiol. Biotechnol.* 2018. V. 34. P. 20.
- Majidzadeh M., Fatahi-Bafghi M. Current taxonomy of *Rhodococcus* species and their role in infections // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2018. V. 37. P. 2045–2062.
- Martínková L., Uhnáková B., Pátek M., Nesvera J., Kren V. Biodegradation potential of the genus *Rhodococcus* // *Environ. Int.* 2009. V. 35. P. 162–177.
- Metcalfe W.W., Jiang W., Wanner B.L. Use of the rep technique for allele replacement to construct new *Escherichia coli* hosts for maintenance of R6K gamma origin plasmids at different copy numbers // *Gene.* 1994. V. 138. P. 1–7.
- Mutalik S.R., Vaidya B.K., Joshi R.M., Desai K.M., Nene S.N. Use of response surface optimization for the production of biosurfactant from *Rhodococcus* spp. MTCC 2574 // *Bioreour. Technol.* 2008. V. 99. P. 7875–7880.
- Nie Y., Chi C.-Q., Fang H., Liang J.-L., Lu S.-L., Lai G.-L., Tang Y.-Q., Wu X.-L. Diverse alkane hydroxylase genes in microorganisms and environments // *Sci. Rep.* 2014. V. 4. P. 4968.
- Pfaffl M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR // *Nucleic Acids Res.* 2001. V. 29. P. e45.
- Pirog T.P., Shevchuk T.A., Klimenko I.A. Intensification of surfactant synthesis in *Rhodococcus erythropolis* EK-1 cultivated on hexadecane // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2010. V. 46. P. 651–658.
- Retamal-Morales G., Heine T., Tischler J.S., Erler B., Gröning J.A.D., Kaschabek S.R., Schlömann M., Levicán G., Tischler D. Draft genome sequence of *Rhodococcus erythropolis* B7g, a biosurfactant producing actinobacterium // *J. Biotechnol.* 2018. V. 280. P. 38–41.
- Riele H. te, Michel B., Ehrlich S.D. Single-stranded plasmid DNA in *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1986. V. 83. P. 2541–2545.
- Rojo F. Degradation of alkanes by bacteria // *Environ. Microbiol.* 2009. V. 11. P. 2477–2490.
- Rosa C.F.C. da, Freire D.M.G., Ferraz H.C. Biosurfactant microfoam: application in the removal of pollutants from soil // *J. Environ. Chem. Engineer.* 2015. V. 3. P. 89–94.
- Sangal V., Goodfellow M., Jones A.L., Schwalbe E.C., Blom J., Hoskisson P.A., Sutcliffe I.C. Next-generation systematics: an innovative approach to resolve the structure of complex prokaryotic taxa // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. Art. 38392.
- Schäfer A., Tauch A., Jäger W., Kalinowski J., Thierbach G., Pühler A. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum* // *Gene.* 1994. V. 145. P. 69–73.
- Schirmer A., Rude M.A., Li X., Popova E., Cardayre S.B. del Microbial biosynthesis of alkanes // *Science.* 2010. V. 329. P. 559–562.

Shanklin J., Whittle E., Fox B.G. Eight histidine residues are catalytically essential in a membrane-associated iron enzyme, stearoyl-CoA desaturase, and are conserved in alkane hydroxylase and xylene monooxygenase // *Biochemistry*. 1994. V. 33. P. 12787–12794.

Smits T.H., Röthlisberger M., Witholt B., Beilen J.B. van Molecular screening for alkane hydroxylase genes in Gram-negative and Gram-positive strains // *Environ. Microbiol.* 1999. V. 1. P. 307–317.

Táncsics A., Benedek T., Szoboszlai S., Veres P.G., Farkas M., Máthé I., Márialigeti K., Kukolya J., Lányi S., Kriszt B. The detection and phylogenetic analysis of the alkane 1-monooxygenase gene of members of the genus *Rhodococcus* // *Syst. Appl. Microbiol.* 2015. V. 38. P. 1–7.

Uchida Y., Tsuchiya R., Chino M., Hirano J., Tabuchi T. Extracellular accumulation of mono- and di-succinoyl trehalose lipids by a strain of *Rhodococcus erythropolis* grown on *n*-alkanes // *Agric. Biol. Chem.* 1989. V. 53. P. 757–763.

Uzoigwe C., Burgess J.G., Ennis C.J., Rahman P.K.S.M. Bio-emulsifiers are not biosurfactants and require different screening approaches // *Front. Microbiol.* 2015. V. 6. Art. 245.

Whyte L.G., Smits T.H.M., Labbé D., Witholt B., Greer C.W., van Beilen J.B. Gene cloning and characterization of multiple alkane hydroxylase systems in *Rhodococcus* strains Q15 and NRRL B-16531 // *Appl. Environ. Microbiol.* 2002. V. 68. P. 5933–5942.

Williams S.C., Austin R.N. An overview of the electron transfer proteins that activate alkane monooxygenase (AlkB) // *Front. Microbiol.* 2022. V. 13. Art. 845551.

Wood E.J. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual* Eds. Fritsch E.F., Sambrook J. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982. 545 p. ISBN 0-87969-136-0 // *Biochemical Education*. 1983. V. 11. № 2. P. 82–82.

Molecular Genetic and Functional Analysis of the Genes Encoding Alkane 1-Monooxygenase Synthesis in Members of the Genus *Rhodococcus*

A. A. Bulyarevich¹, A. S. Gurinovich¹, A. E. Filonov², and M. A. Titok^{1, *}

¹Belarusian State University, Minsk, 220030 Belarus

²Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Pushchino, 142290 Russia

*e-mail: ma_titok@bsu.by

Received October 17, 2022; revised November 22, 2022; accepted November 23, 2022

Abstract—Organization and localization of the *alkB* genes and of alkane 1-monooxygenases they encode in members of the genus *Rhodococcus* was investigated. All members of a phylogenetic group were found to possess specific types of the *alkB* genes (*alkB1*-type in the operons containing rubredoxin-coding genes, rubredoxin reductase, and a regulatory protein and/or *alkB2*-type in the operons lacking the rubredoxin-reductase-coding gene, and supplementary, separately located determinants of the *alkB3–alkB8* type). The *alkB1*-type genes were present in the chromosomes of bacteria of groups B1 (*R. aetherivorans*, *R. ruber*), C (*R. opacus*, *R. jostii*, *R. wratislaviensis*, *R. koreensis*), D (*R. erythropolis*, *R. qingshengii*), G (*R. triatomae*), and E (*R. fascians*). The *alkB2*-type genes occurred in strictly specified loci of the chromosomes of members of the phylogenetic groups A (*R. hoagii/R. equi*), B2 (*R. coprophilus*, *R. pyridinivorans*, *R. rhodochrous*), and D (*R. erythropolis*, *R. qingshengii*). The separately located *alkB3–alkB5* were revealed in the chromosomes of members of the D group D (*alkB5* was found only in *R. qingshengii*), the *alkB6* genes occurred in members of the groups B1 and B2, and *alkB7–alkB8* were present in members of group E. The proteins coded by the genes *alkB1* and *alkB2* belonged to three phylogenetic groups. The first one comprised AlkB1-type proteins of members of groups B1 and C and the AlkB2-type proteins of members of groups D and A. The second one was represented by AlkB2-type proteins of bacteria of group B2. The third group comprised AlkB1-type proteins of members of groups G and D. Alkane 1-monooxygenases encoded by separately localized genes *alkB3–alkB8* were represented by three phylogenetic lineages: AlkB3–AlkB5, AlkB6, and AlkB7 and AlkB8. In the genome of *R. pyridinivorans* 5Ap, the genes *alkB2* and *alkB6* characteristic of group B1 were revealed. This determinants were shown to be required for biosurfactant synthesis. Emulsifying activity of the mutant with impaired *alkB2* gene at 28 and 42°C was 16 and 3 times lower, respectively, while the amount of trehalose-containing surfactants decreased 7 and 3 times, respectively. Independent on the cultivation temperature, the mutant with impaired *alkB6* gene exhibited 1.2 times lower emulsifying activity and more than two-fold lower decrease of the synthesis of trehalose-containing surfactants. These results indicated the key role of *alkB2* in biosurfactant synthesis at different cultivation temperatures. The role of *alkB6* increased at 42°C, probably due to its elevated transcriptional activity.

Keywords: *alkB* genes, alkane 1-monooxygenases, biosurfactants

ПЕКТИНОЛИТИЧЕСКИЕ ДРОЖЖИ *SACCHAROMYCES PARADOXUS* – НОВЫЙ ГЕНОФОНД ДЛЯ ВИНОДЕЛИЯ

© 2023 г. А. Н. Боровкова^{а, б}, М. Ю. Шаламитский^с, Е. С. Наумова^{а, *}

^аНациональный исследовательский центр “Курчатовский институт”
“Курчатовский комплекс генетических исследований”, Москва, 123098 Россия

^бМосковский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
кафедра микологии и альгологии, Москва, 119234 Россия

^сВсероссийский национальный научно-исследовательский институт виноградарства и виноделия “Магарач”
Российской академии наук, Ялта, 298600 Россия

*e-mail: lena_naumova@yahoo.com

Поступила в редакцию 03.10.2022 г.

После доработки 26.10.2022 г.

Принята к публикации 31.10.2022 г.

Проведен масштабный скрининг пектинолитической активности у дрожжей *Saccharomyces paradoxus*, выделенных из различных природных источников в Европе, Азии, Северной Америке и на Гавайских островах. Из 98 изученных штаммов пектинолитическая активность отсутствовала только у пяти гавайских и двух европейских. Большинство штаммов были способны в той или иной степени секретировать активную эндо-полигалактуроназу. Североамериканские штаммы UCDFST 52-225, UCDFST 61-359, UCDFST 61-220, 95-3 и UCDFST 62-186 обладают очень высокой пектинолитической активностью, сопоставимой или даже превышающей таковую экспериментально полученного тетраплоидного штамма *S. cerevisiae* ВКПМ Y-718. Сравнительный анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей пектиназных генов показал, что североамериканская и дальневосточная популяции *S. paradoxus* отличаются более высоким генетическим разнообразием, чем европейская и гавайская. Филогенетический анализ подтвердил видоспецифичность генов *PGU* дрожжей рода *Saccharomyces*. Из восьми видов *Saccharomyces* высокая пектинолитическая активность характерна для *S. bayanus* и *S. paradoxus*. Пять североамериканских штаммов с наибольшей пектинолитической активностью представляют интерес для дальнейших молекулярно-генетических исследований и селекционных работ с винными дрожжами. Обсуждается экологическая роль эндо-полигалактуроназы.

Ключевые слова: *Saccharomyces paradoxus*, генетические популяции, гены *PGU*, пектиназа, эндо-полигалактуроназа, филогенетический анализ

DOI: 10.31857/S0026365622600729, **EDN:** AUJDPZ

Род *Saccharomyces* включает восемь биологических видов: *S. arboricola*, *S. bayanus*, *S. cariocanus*, *S. jurei*, *S. kudriavzevii*, *S. mikatae*, *S. cerevisiae* и *S. paradoxus* (Naumov et al., 2000; Kurtzman, 2003; Wang, Bai, 2008; Vaughan-Martini, Martini, 2011; Naseeb et al., 2017). Дрожжи *S. bayanus*, *S. cerevisiae* и *S. paradoxus* встречаются в разных регионах мира, тогда как *S. arboricola* и *S. mikatae* характерны только для Дальневосточной Азии. Штаммы дрожжей *S. kudriavzevii* были выделены в Европе и Дальневосточной Азии (Naumov et al., 2000; Sampaio, Gonçalves, 2008). Известны единичные штаммы видов *S. cariocanus* и *S. jurei*, выделенные, соответственно, в Бразилии и Европе (Naumov et al., 2000; Naseeb et al., 2017; Hutzler et al., 2021).

В виноделии традиционно используются дрожжи *S. cerevisiae*. Большое значение также имеют холодоустойчивые дрожжи *S. bayanus*. Этот вид

представлен двумя разновидностями (Наумов, 2000; Vaughan-Martini, Martini, 2011). Специфической экологической нишей *S. bayanus* var. *ivarum* является виноделие и виноградарство при пониженных температурах: эти дрожжи ассоциированы с производством белых, сладких и игристых вин, а также сидра (Naumov et al., 1993; Torriani et al., 1999; Rementeria et al., 2003; Наумов и соавт., 2011). Штаммы *S. bayanus* var. *bayanus*, включая типовую культуру CBS 380, выделяются, в основном, в условиях пивоварения (Naumov et al., 2005; Pérez-Través et al., 2014). Родственные дрожжи *S. eubayanus* обитают в различных природных субстратах в Аргентине, Китае, США, Канаде, Австралии и Новой Зеландии (Libkind et al., 2011; Nespolo et al., 2020). В Европе геном *S. eubayanus* обнаружен только у гибридных пивных дрожжей низового брожения *S. pastorianus* (Hebly et al.,

2015). Согласно гибридологическому анализу *S. eubayanus* не является самостоятельным биологическим видом и представляет собой третью разновидность *S. bayanus* (Наумов, 2017).

В последние годы проводятся многочисленные исследования по использованию в различных производственных ферментациях, включая виноделие, других видов *Saccharomyces*. Показана перспективность применения в пивоварении дрожжей *S. arboricola*, *S. jurei* и *S. mikatae* или их гибридов с *S. cerevisiae* (Nikulín et al., 2018; Hutzler et al., 2021). Естественные межвидовые гибриды *S. cerevisiae* × *S. kudriavzevii* и *S. cerevisiae* × *S. bayanus* × *S. kudriavzevii* обнаружены среди коммерческих винных, пекарских и пивных дрожжей, используемых во Франции, Испании, Австрии, Швейцарии и Австралии (Peris et al., 2018; Morard et al., 2020; Bendixsen et al., 2022).

Для винных дрожжей важным свойством является способность расщеплять содержащийся в ягодах винограда пектин. В зависимости от сорта содержание пектиновых веществ в ягодах винограда составляет от 0.5 до 5 г/л. Высокое содержание пектиновых веществ затрудняет процесс отделения и осветления виноградного сусла и может снижать органолептические показатели вина, а также приводить к появлению коллоидных помутнений и засорению фильтров (Van Rensburg, Pretorius, 2000). Пектин – полисахарид растительного происхождения, состоящий из соединенных между собой α -(1–4)-гликозидной связью остатков галактуроновой кислоты, присутствующих в виде метилового эфира. Расщепление высокомолекулярных пектиновых веществ – сложный процесс с участием нескольких ферментов, включая пектин-эстеразу, пектиназу (эндо-полигалактуроназу) и пектин-лиазу. Основным ферментом гидролиза пектиновых полисахаридов является пектиназа (эндо-полигалактуроназа, К.Ф. 3.2.1.15). Применяемые в виноделии коммерческие препараты пектиназ грибного происхождения, помимо эндо-полигалактуроназы, содержат примеси и ферменты с нежелательной пектинэстеразной активностью, которая приводит к повышенному содержанию токсичного метанола в вине (Louw et al., 2006). В отличие от мицелиальных грибов, дрожжи обычно не секретизируют пектинэстеразу, поэтому их пектиназы безопасны для виноделия (Fernández-González et al., 2004; da Silva et al., 2005).

Дрожжи *S. cerevisiae*, включая винные штаммы, как правило, не способны расщеплять пектин, или обладают очень низкой пектинолитической активностью, что может быть связано с мутациями в кодирующем эндо-полигалактуроназу структурном гене *PGUI* (псевдоген), с его полным отсутствием или с мутациями в регуляторных генах (Fernández-González et al., 2004; Divol, Rensburg, 2007; Louw et al., 2010). Недавно нами проведено

изучение распространения и особенностей пектиновых генов *PGU* у дрожжей *Saccharomyces* разной видовой принадлежности (Наумова и соавт., 2021; Боровкова и соавт., 2022). Показано, что виды *S. arboricola*, *S. kudriavzevii* и *S. mikatae* обладают низкой пектинолитической активностью, тогда как среди дрожжей *S. bayanus*, *S. cariocanus*, *S. paradoxus* и *S. jurei* обнаружены штаммы, способные активно расщеплять пектиновые соединения. Показано, что способность секретировать активную эндо-полигалактуроназу является видовой особенностью дрожжей *S. bayanus* (Боровкова и соавт., 2022).

На начальных этапах формирования вина, сбраживание виноградного сусла осуществляется гетерогенным консорциумом обитающих на виноградниках и оборудовании винных заводов дрожжей, среди которых встречаются виды, обладающие пектинолитической активностью: *Aureobasidium pullulans*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Metschnikowia fructicola*, *Kluveromyces marxianus* (Belda et al., 2016; Rollero et al., 2018; Tufariello et al., 2021). Показано, что применение в виноделии комбинированных стартерных культур (*Saccharomyces* в сочетании с несакхаромицетными дрожжами) позволяет улучшать качество вина, положительно влияет на такие параметры вина как содержание алкоголя и кислотность, а также уменьшает риск недобродов (Belda et al., 2017; Berbegal et al., 2020). Использование штаммов *Saccharomyces* в сочетании с пектинолитическими (*Aureobasidium pullulans*, *Metschnikowia* spp., *Kluveromyces marxianus*) и непектинолитическими (*Torulasporea delbrueckii*, *Hanseniaspora* spp., *Lachancea thermotolerans*, *Pichia* spp. и др.) дрожжами в ряде случаев давали лучшие результаты, чем применение коммерческих ферментных препаратов (Belda et al., 2016; Rollero et al., 2018; Tufariello et al., 2021). Однако необходимо тщательно подбирать несакхаромицетные штаммы, чтобы избежать образования посторонних привкусов и ароматов в вине, а также повышенного образования этилацетата и порчи вина. Следует отметить, что несакхаромицетные дрожжи доминируют только на первых этапах спиртового брожения, и при повышении уровня спирта они полностью вытесняются истинно винными дрожжами *Saccharomyces* (Pretorius, 2020). Наличие пектинолитической активности у штаммов *Saccharomyces* не только улучшает процесс осветления виноградного сусла и его фильтруемость, но также существенно влияет на формирование органолептических показателей виноматериалов. Это важно для получения высококачественных вин с узнаваемой сортовой индивидуальностью, особенно для вин из ароматических (например, Мускат) и полу-ароматических (Рислинг) сортов винограда. В этой связи актуальным является поиск штаммов-сахаромицетов, способных секретировать активную эндо-полигалактуроназу.

Дрожжи *S. paradoxus* встречаются повсеместно и выделяются из различных природных источников: сокоотечений широколиственных деревьев, насекомых, неокультуренных почв, листьев растений, а также с различных ягод, включая виноград (Наумов, 2013). С виноградинок в Хорватии был выделен штамм *S. paradoxus* RO88, обладающий высокой пектинолитической активностью и другими важными для виноделия характеристиками (Redžepović et al., 2003; Eschstruth, Divol, 2011). В нашем распоряжении имеется большая коллекция штаммов *S. paradoxus*, выделенных из различных природных источников в разных регионах мира.

Целью настоящего исследования является изучение молекулярно-генетических особенностей пектиназных генов *PGU* вида *S. paradoxus* на материале штаммов различного происхождения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования. Происхождение изученных штаммов дрожжей *Saccharomyces* приведено в табл. 1. Дрожжи культивировали при 28°C на полной среде YPD (бакто-агар – 20, глюкоза – 20, дрожжевой экстракт – 10 и пептон – 20; г/л).

Видовая идентификация штаммов. Идентификацию штаммов проводили с помощью ПДРФ-анализа ПЦР-амплифицированного 5.8S-ITS-фрагмента, включающего ген 5.8S рДНК и внутренние транскрибируемые спейсеры ITS1 и ITS2. Дрожжевую ДНК выделяли согласно Lõoke et al. (2011). Амплификацию и рестрикцию 5.8S-ITS-фрагментов проводили как описано ранее (Серпова и соавт., 2011). В качестве контролей использовали референтные штаммы дрожжей *S. cerevisiae* S288C и *S. paradoxus* CBS 432.

Пектинолитическая активность. Скрининг на наличие пектинолитической активности осуществляли согласно Louw et al. (2010) в нашей модификации. Дрожжи культивировали в течение 1 сут на твердой YPD среде. Суточные культуры дрожжей уколком микробиологической петли высевали на минимальную среду с полигалактуроновой кислотой (PG) следующего состава (г/л): дрожжевая азотная основа с аминокислотами (“Difco”, США) – 6.7, полигалактуроновая кислота (“Sigma”, США) – 12.5, глюкоза – 10, агар (“Difco”, США) – 20, Na₂HPO₄ – 6.8 (рН 4.0). Культивировали при 28°C в течение 3 сут, затем выросшие колонии дрожжей смывали дистиллированной водой и визуализацию производили 6 М раствором HCl. Ферментативную активность определяли по четким зонам гидролиза (ореолам) полигалактуроновой кислоты вокруг колоний дрожжей. Чашки Петри фотографировали и определяли размер ореолов с помощью ПО IC Measure_2.0.0.272 (www.helicon.ru). Для каждого

штамма были проведены два независимых эксперимента. Размер ореолов указывал на способность различных штаммов разлагать полигалактуроновую кислоту. В качестве контроля использовали запатентованный штамм *S. cerevisiae* ВКПМ Y-718, обладающий высокой пектинолитической активностью (Патент SU 1495368). Этот штамм является экспериментально полученным полиплоидом винного штамма Кокур-3.

Секвенирование и филогенетический анализ. Полимеразную цепную реакцию осуществляли на ДНК-амплификаторе “Bio-Rad” (США). Дрожжевую ДНК выделяли согласно Lõoke et al. (2011). Дизайн олигонуклеотидных праймеров для амплификации и секвенирования генов *PGU* осуществляли онлайн на сайте <https://www.yeastgenome.org>. Для амплификации генов *PGU* дрожжей *S. paradoxus* использовали следующие пары праймеров: PGU11 (5'-CACATTGATG-GACAAACGCA-3')/PGU12(5'-AGGATTAACAG-CTTGACCA-3') и PGU21 (5'-TTTGTGCGCT-TTGCTGTCTG-3')/PGU23 (5'-AAATTGACAC-CCCGACCAC-3'). ПЦР проводили в 30 мкл буфера, содержащего 2.5 mM MgCl₂, 0.1 mM каждого dNTP, 50 пмоль каждого праймера, 2.5 единицы *Taq*-полимеразы (“Синтол”, Россия), 20–200 нг ДНК по следующей схеме: начальная денатурация ДНК при 94°C в течение 5 мин; затем 30 циклов в режиме: денатурация при 94°C – 30 с, отжиг праймеров при 56°C – 30 с, синтез ДНК при 72°C – 60 с; конечная достройка при 72°C – 10 мин. Продукты амплификации разделяли электрофорезом в 1%-ном агарозном геле при 60–65 В в 0.5×ТВЕ буфере в течение 1–1.5 ч. Гель окрашивали бромистым этидием, промывали в дистиллированной воде и фотографировали в ультрафиолетовом свете на трансиллюминаторе Vilber Lourmat (Франция). В качестве маркера молекулярных весов использовали препарат 1 kb DNA Ladder (“Thermo Fisher Scientific”, США). ПЦР-фрагменты элюировали из геля с помощью набора Silica Beads DNA Gel Extraction Kit (“Thermo Fisher Scientific”, США), согласно протоколу фирмы-изготовителя. Нуклеотидные последовательности гена *PGU* определяли по двум цепям с помощью прямого секвенирования по методу Сенгера на автоматическом секвенаторе “Applied Biosystems 3730” (США). Полученные в данной работе нуклеотидные последовательности заложены в GenBank под регистрационными номерами: OP700018–OP700045.

Поиск сходства с известными нуклеотидными последовательностями *PGU* дрожжей *Saccharomyces* проводили с помощью программы BLAST в базе данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) и SGD (<http://www.yeastgenome.org/>). Множественные выравнивания изученных нуклеотидных и аминокислотных последовательностей проводили с помощью программы BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). Филогенетический анализ проводили с помощью программы

Таблица 1. Происхождение и пектинолитическая активность изученных штаммов дрожжей *Saccharomyces paradoxus*

Штамм	Источник и место выделения	Диаметр, мм*	Номер группы
<i>Saccharomyces paradoxus</i> <i>Европейская популяция</i>			
CBS 7400	Испорченный майонез, Европа	11.8	1
HA 220	<i>Hypericum perforatum</i> , Австрия	13.3	1
ВКМ У-1708	Полукультурный виноград, Армения	14.0	1
ВКМ У-506	Поверхность свеклы, Московская область, Россия	12.2	1
M2	Зеленые листья брусники <i>Vaccinium vitis-doea</i> , болото, Лосиный остров, Москва, Россия	14.8	1
M22	Зеленые листья брусники <i>Vaccinium vitis-doea</i> , болото, Лосиный остров, Москва, Россия	14.2	1
M29	Зеленые листья брусники <i>Vaccinium vitis-doea</i> , болото, Лосиный остров, Москва, Россия	14.5	1
M10	Зеленые листья одуванчика <i>Taraxacum officinale</i> , луг, Лосиный остров, Москва, Россия	14.4	1
M11	Липа, лесная подстилка, Лосиный остров, Москва, Россия	12.6	1
M12	Береза <i>Betula verrucosa</i> , лесная подстилка, Лосиный остров, Москва, Россия	13.8	1
M16	Зеленая хвоя лиственницы, Лосиный остров, Москва, Россия	13.4	1
M18	Зеленая хвоя ели, Лосиный остров, Москва, Россия	13.1	1
M36	Зеленая хвоя ели, Лосиный остров, Москва, Россия	12.0	1
M42	Зеленая хвоя ели, Лосиный остров, Москва, Россия	11.5	1
N16	Сокотечения <i>Quercus robur</i> , Москва, Россия	12.2	1
N13	Сокотечения <i>Q. robur</i> , Московская область, Россия	11.0	1
N7	Сокотечения <i>Q. robur</i> , Санкт-Петербург, Россия	14.0	1
N35	Сокотечения <i>Q. robur</i> , Воронеж, Россия	14.7	1
N34	Сокотечения <i>Q. robur</i> , Воронеж, Россия	11.5	1
N11	Сокотечения <i>Q. robur</i> , Новгородская область, Россия	14.3	1
N14	Сокотечения <i>Quercus</i> sp., Азербайджан	11.8	1
N18	Сокотечения <i>Q. robur</i> , Ефремов, Россия	11.9	1
N17	Сокотечение дуба <i>Q. robur</i> , Татарстан, Россия	13.1	1
N29	Сокотечение дуба <i>Q. robur</i> , Татарстан, Россия	12.9	1
N26	Сокотечения <i>Q. robur</i> , Эстония	12.2	1
N25	Сокотечения <i>Q. robur</i> , Эстония	12.5	1
N27	Сокотечения <i>Q. robur</i> , Эстония	12.2	1
D1	Кора дуба, Новосибирск, Россия	13.4	1
CBS 432(T)	Кора дуба <i>Quercus</i> sp., Россия	16.2	2
CBS 406	Сокотечение <i>Quercus</i> sp., Нидерланды	18.4	2
CBS 5829	Лесная почва, Дания	16.8	2
HA 219	<i>Hypericum perforatum</i> , Австрия	15.1	2
ZP 506	Кора <i>Quercus faginea</i> , Португалия	17.3	2
ВКМ У-1707	Дикий виноград, Армения	15.1	2
M6	Зеленые листья живучки <i>Ajuga reptans</i> , лес, Лосиный остров, Москва, Россия	15.3	2
M7	Зеленые листья живучки <i>Ajuga reptans</i> , лес, Лосиный остров, Москва, Россия	15.0	2

Таблица 1. Продолжение

Штамм	Источник и место выделения	Диаметр, мм*	Номер группы
M17	Зеленая хвоя ели, Лосиный остров, Москва, Россия	16.0	2
M19	Зеленая хвоя ели, Лосиный остров, Москва, Россия	15.2	2
M21	Зеленая хвоя ели, Лосиный остров, Москва, Россия	15.6	2
M23	Зеленые листья брусники <i>Vaccinium vitis-doea</i> , болото, Лосиный остров, Москва, Россия	15.2	2
M25	Зеленые листья брусники <i>Vaccinium vitis-doea</i> , болото, Лосиный остров, Москва, Россия	18.0	2
M26	Зеленые листья брусники <i>Vaccinium vitis-doea</i> , болото, Лосиный остров, Москва, Россия	15.4	2
M27	Зеленые листья брусники <i>Vaccinium vitis-doea</i> , болото, Лосиный остров, Москва, Россия	15.2	2
M28	Зеленые листья брусники <i>Vaccinium vitis-doea</i> , болото, Лосиный остров, Москва, Россия	15.4	2
M30	Зеленые листья брусники <i>Vaccinium vitis-doea</i> , болото, Лосиный остров, Москва, Россия	15.1	2
M31	Зеленая хвоя ели, Лосиный остров, Москва, Россия	15.5	2
M32	Зеленая хвоя ели, Лосиный остров, Москва, Россия	15.6	2
M40	Зеленые листья живучки <i>Ajuga reptans</i> , лес, Лосиный остров, Москва, Россия	15.0	2
M37	Зеленая хвоя лиственницы, Лосиный остров, Москва, Россия	17.8	2
N8	Сокотечения <i>Q. robur</i> , Московская область, Россия	15.6	2
N9	Узбекистан	16.7	2
N12	Сокотечения <i>Quercus</i> sp., Азербайджан	16.7	2
N15	Сокотечения <i>Quercus robur</i> , Москва, Россия	17.8	2
N20	Сокотечения <i>Quercus robur</i> , Москва, Россия	16.9	2
N41	Сокотечения <i>Quercus</i> sp., Ялта, Крым, Россия	17.1	2
N40	Сокотечения <i>Quercus</i> sp., Ялта, Крым, Россия	17.3	2
ATCC 96968	Экссудат <i>Quercus</i> sp., Финляндия	0	4
ATCC 96971	Экссудат <i>Quercus</i> sp., Финляндия	0	4
RO88	Виноградник, Хорватия	Нд	Нд
<i>Дальневосточная популяция</i>			
ВКМ Y-505	Виноград, Дальний Восток, Россия	14.6	1
ВКМ Y-1704	Сок амурского винограда, Дальний Восток, Россия	13.1	1
N43	Сокотечение <i>Q. mongolica</i> , Дальний Восток, Россия	12.7	1
N44	Сокотечение <i>Q. mongolica</i> , Дальний Восток, Россия	12.5	1
N46	Сокотечение <i>Q. mongolica</i> , Сихотэ-Алинский заповедник, Россия	14.2	1
N48	Сокотечение <i>Q. mongolica</i> , Хасанский район, Россия	13.5	1
N49	Сокотечение <i>Q. mongolica</i> , Хасанский район, Россия	12.2	1
N50	Экссудат <i>Quercus mongolica</i> , Владивосток, Россия	13.0	1
61.02	Сокотечение осины <i>Populus davidiana</i> , Приморский край, Россия	13.9	1
NBRC 1804	Кора, Япония	11.8	1
UCDFST 67-570	Экссудат растений, Япония	12.9	1
N45	Сокотечение <i>Q. mongolica</i> , Дальний Восток, Россия	17.8	2
N47	Сокотечение <i>Q. mongolica</i> , Алинский заповедник, Россия	17.3	2
ВКМ Y-1697	Сок лесной малины, Дальний Восток	17.4	2

Таблица 1. Продолжение

Штамм	Источник и место выделения	Диаметр, мм*	Номер группы
NBRC 1805	Кора, Япония	15.2	2
RS9	Силос, Япония	Нд	Нд
SN-ZZ18-9	<i>Q. aliena</i> , Китай	Нд	Нд
НВ-XS1-1	<i>Quercus</i> sp., Китай	Нд	Нд
НВ-SNJ10a	Кора <i>Quercus</i> sp., Китай	Нд	Нд
SN-TB12-1	<i>Quercus</i> sp., Китай	Нд	Нд
НВ-MY10-3	<i>Quercus</i> sp., Китай	Нд	Нд
НВ-XXY4-1	<i>Cyclobalanopsis myrsinifolia</i> , Китай	Нд	Нд
ВJ-DLS32-27	<i>Q. liaotungensis</i> , Китай	Нд	Нд
SN-HZZ6-2	<i>Quercus cocciferoides</i> , Китай	Нд	Нд
SN-HZZ24-1	<i>Cyclobalanopsis jenseniana</i> , Китай	Нд	Нд
SN-ZZ59-1	<i>Quercus</i> sp., Китай	Нд	Нд
JL-CB5-1	<i>Q. liaotungensis</i> , Китай	Нд	Нд
НВ-SNJ2a	Кора <i>Quercus</i> sp., Китай	Нд	Нд
SN-TTH1-1	<i>Q. cocciferoides</i> , Китай	Нд	Нд
НВ-XS18-1	<i>Quercus</i> sp., Китай	Нд	Нд
SN-ZZ32-3	<i>Quercus</i> sp., Китай	Нд	Нд
JL-WQ14-1	<i>Q. liaotungensis</i> , Китай	Нд	Нд
JL-CB13-1	Гнилое дерево, Китай	Нд	Нд
SN-TTS3-10	<i>Cyclobalanopsis jenseniana</i> , Китай	Нд	Нд
НВ-XS3-1	<i>Quercus</i> sp., Китай	Нд	Нд
НВ-XS21-2	<i>Quercus</i> sp., Китай	Нд	Нд
ВJ-DLS2-1	<i>Corylus heterophylla</i> , Китай	Нд	Нд
ВJ-DLS32-26	<i>Q. liaotungensis</i> , Китай	Нд	Нд
SN-QL4-2	<i>Quercus</i> sp., Китай	Нд	Нд
НВ-MY15-2	<i>Quercus</i> sp., Китай	Нд	Нд
ВJ-DLS60-3	<i>Q. liaotungensis</i> , Китай	Нд	Нд
SN-HZZ1-1	<i>Corylus mandshurica</i> Maxim., Китай	Нд	Нд
XZ-98-1-1	<i>Juglans cathayensis</i> , Тибет, Китай	Нд	Нд
<i>Североамериканская популяция</i>			
95-1	Сокотечение <i>Quercus</i> sp., Мичиган, США	13.5	1
95-4	Дуб <i>Q. rubra</i> , Мичиган, США	11.9	1
95-7	Дуб <i>Q. rubra</i> , Мичиган, США	13.8	1
UCDFST 61-196	<i>Drosophila pseudoobscura</i> , Калифорния, США	14.3	1
UCDFST 79-128	Черемуха <i>Prunus virginiana</i> , Онтарио, Канада	13.5	1
UCDFST 79-140	Яблоня <i>Malus pumila</i> , Онтарио, Канада	11.0	1
UCDFST 69-1006	Ива (<i>Salix</i> sp.), Калифорния, США	15.2	2
UCDFST 61-248	<i>Drosophila pseudoobscura</i> , Калифорния, США	18.8	2
UCDFST 51-186	<i>Drosophila pseudoobscura</i> , Калифорния, США	17.7	2
UCDFST 51-137	<i>Drosophila azteca</i> , Калифорния, США	15.9	2
UCDFST 52-153	<i>Drosophila</i> sp., Калифорния, США	17.4	2
UCDFST 61-232	<i>Drosophila viridis</i> , Калифорния, США	16.1	2
UCDFST 72-129	Сокотечения <i>Q. gambelii</i> , Аризона, США	15.0	2
UCDFST 52-225	Насекомые <i>Aulacigaster</i> sp., Калифорния, США	20.2	3

Таблица 1. Окончание

Штамм	Источник и место выделения	Диаметр, мм*	Номер группы
UCDFST 61-359	Сокотечения <i>Ulmus carpinifolia</i> , Калифорния, США	22.4	3
95-3	Дуб <i>Q. alba</i> , Мичиган, США	22.9	3
UCDFST 61-220	Насекомые <i>Aulacigaster</i> sp., Калифорния, США	25.4	3
UCDFST 62-186	Осиное гнездо, Канада	27.4	3
<i>Гавайская популяция</i>			
UCDFST 72-145	Экссудат <i>Myoporium</i> sp., Гавайи, США	13.8	1
UCDFST 73-538.2	Экссудат растений, Гавайи, США	14.6	1
UCDFST 72-140	Экссудат <i>Myoporium sandwicense</i> с личинками <i>Drosophila heidi</i> , Гавайи, США	0	4
UCDFST 71-101	Экссудат <i>Myoporium sandwicense</i> , Гавайи, США	0	4
UCDFST 72-143	Экссудат <i>Myoporium sandwicense</i> , Гавайи, США	0	4
UCDFST 72-149	Течь <i>Myoporium sandwicense</i> , Гавайи, США	0	4
UWO (PS) 91-917.1	Течь <i>Myoporium sandwicense</i> , Гавайи, США	0	4
<i>S. arboricola</i>			
CBS 10644(T)	Кора дуба <i>Quercus fabric</i> , Китай	3.5	1
<i>S. bayanus</i>			
CBS 7001	Ручейник <i>Mesophylax adopersus</i> , Испания	15.5	2
<i>S. cariocanus</i>			
NCYC 2890	<i>Drosophila</i> sp., Бразилия	11.8	1
<i>S. cerevisiae</i>			
S288C	Генетическая линия	0	4
ВКПМ Y-718	Полиплоидный мутант штамма Кокур-3, сухое белое вино, Крым, Россия	27.0	3
<i>S. jurei</i>			
NCYC 3947	Кора дуба <i>Quercus robur</i> , Франция	17.2	2
<i>S. kudriavzevii</i>			
NBRC 1802	Гниющие листья, Япония	5.0	1
<i>S. mikatae</i>			
NBRC 1815	Почва, Япония	5.0	1
<i>Kluuyveromyces marxianus</i>			
CBS 6556	Ферментированное кукурузное тесто, Мексика	Нд	Нд

Примечание. Сокращенные названия коллекций: ВКМ – Всероссийская коллекция микроорганизмов (Пушино, Россия); ВКПМ – Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов (Москва, Россия); CBS – The Westerdijk Fungal Biodiversity Institute (Утрехт, Нидерланды); NBRC/IFO – National Institute of Technology and Evaluation (Токио, Япония); NCYC – National Collection of Yeast Cultures (Норидж, Великобритания); РУСС – Portuguese Yeast Culture Collection (Лиссабон, Португалия); UCDFST – Herman J. Phaff Yeast Culture Collection of the Department of Food Science and Technology, University of California (Дэвис, Калифорния, США); UFRJ – Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro (Бразилия); UWO (PS) – Culture collection of the Department of Biology, University of Western Ontario (Онтарио, Канада). Остальные штаммы из коллекции лаборатории молекулярной генетики дрожжей ФГБУ “ГосНИИгенетика НИЦ “Курчатовский институт” (Москва, Россия). Соответствие штаммов различных коллекций: CBS 8711 = L19, S288C = CBS 8803, CBS 7001 = MCYC 623, NBRC 1815 = CBS 8839, NBRC 1802 = CBS 8840, NCYC 3947 = CBS 14759, UFRJ 50816 = CBS 8841, UFRJ 50791 = CBS 7994, ATCC 96968 = ALKO 2638, ATCC 96971 = ALKO 2639.

* Диаметр зоны гидролиза полигалактуроновой кислоты вокруг колоний дрожжей на PG-среде, мм.

** Нд – нет данных.

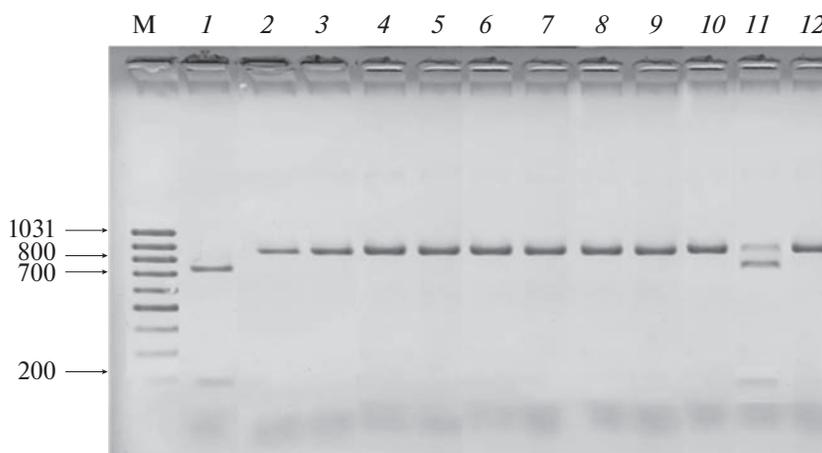


Рис. 1. Рестрикционный анализ амплифицированных 5.8-ITS-фрагментов рДНК штаммов *Saccharomyces* с помощью эндонуклеазы *HpaII*. Дорожки: 3 – UCDFST 51-137, 4 – UCDFST 52-225, 5 – UCDFST 61-196, 6 – UCDFST 61-220, 7 – UCDFST 61-232, 8 – UCDFST 62-186, 9 – UCDFST 67-570, 10 – UCDFST 69-1006, 11 – UCDFST 73-538.2, 12 – UCDFST 72-129. В качестве контроля использовали штаммы *S. cerevisiae* S288C (дорожка 1) и *S. paradoxus* CBS 432 (дорожка 2). М – маркер молекулярных весов (п.н.). “100bp DNA Ladder” (“Fermentas”, Литва).

генетические деревья строили методом объединения соседей (Neighbor-Joining) в программе MEGA 7 (Kumar et al., 2016). В качестве внешней группы использовали эндо-полигалактуроназный ген *EPG1* дрожжей *Kluveromyces marxianus* CBS 6566 (=KCTC17555), выделенных из ферментированного кукурузного теста (Мексика).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Видовая идентификация штаммов. Сначала мы провели идентификацию 10 штаммов дрожжей *Saccharomyces* из коллекции микроорганизмов UCDFST (Phaff Yeast Culture Collection, Department of Food Science and Technology, University of California, Дэвис, США): UCDFST 51-137, UCDFST 52-225, UCDFST 61-196, UCDFST 61-220, UCDFST 61-232, UCDFST 62-186, UCDFST 67-570, UCDFST 69-1006, UCDFST 72-129 и UCDFST 73-538.2 (табл. 1). Штаммы выделены из различных природных источников в Северной Америке, за исключением японского штамма UCDFST 67-570. Идентификацию штаммов проводили на основании ПЦР-ПДРФ-анализа 5.8S-ITS фрагментов, включающих ген 5.8S рНК и внутренние транскрибируемые спейсеры ITS1/ITS2.

С помощью ПДРФ-анализа с использованием эндонуклеаз *HaeIII* и *HpaII* можно различить дрожжи *S. cerevisiae*, *S. paradoxus* и *S. bayanus* (Серпова и соавт., 2011). Характерной особенностью дрожжей *S. bayanus* является способность ферментировать мелибиозу, тогда как штаммы *S. cerevisiae* и *S. paradoxus*, как правило, не способны утилизировать этот сахар. Принимая во внимание, что все 10 изученных штаммов из UCDFST-коллекции не сбразивали мелибиозу, они, по-

видимому, относятся к *S. cerevisiae* или *S. paradoxus*. В качестве контролей использовали видовые тестеры *S. cerevisiae* S288C и *S. paradoxus* CBS 432. У всех изученных и контрольных штаммов размер амплифицированных фрагментов был одинаковым и составлял примерно 850 п.н., что характерно для дрожжей рода *Saccharomyces*. Амплифицированные 5.8S-ITS фрагменты анализировали с помощью ферментативного расщепления эндонуклеазами *HaeIII* и *HpaII*. На рис. 1 представлены *HpaII*-профили анализируемых и контрольных штаммов. Типовая культура *S. paradoxus* CBS 432 и 9 изученных штаммов (UCDFST 51-137, UCDFST 52-225, UCDFST 61-196, UCDFST 61-220, UCDFST 61-232, UCDFST 62-186, UCDFST 67-570, UCDFST 69-1006, UCDFST 72-129) не имеют *HpaII*-сайта рестрикции (рис. 1, дорожки 2, 3–10 и 12). Два *HpaII*-фрагмента размером 730 и 120 п.н. имеются у контрольного штамма *S. cerevisiae* S288с (рис. 1, дорожка 1). У штамма UCDFST 73-538.2 обнаружен комбинированный профиль, объединяющий фрагменты *S. cerevisiae*-типа и *S. paradoxus*-типа (дорожка 11).

Таким образом, UCDFST 73-538.2 является гибридом дрожжей *S. cerevisiae* и *S. paradoxus*, а остальные 9 изученных штаммов относятся к *S. paradoxus*.

Пектинолитическая активность была определена у 98 штаммов *Saccharomyces paradoxus*, относящихся к четырем географическим популяциям: европейской, дальневосточной, североамериканской и гавайской (табл. 1). Почти все изученные штаммы в той или иной степени были способны секретировать активную эндо-полигалактуроназу (табл. 1, рис. 2.). Пектинолитическую активность оценивали по размеру зон гидролиза полигалак-

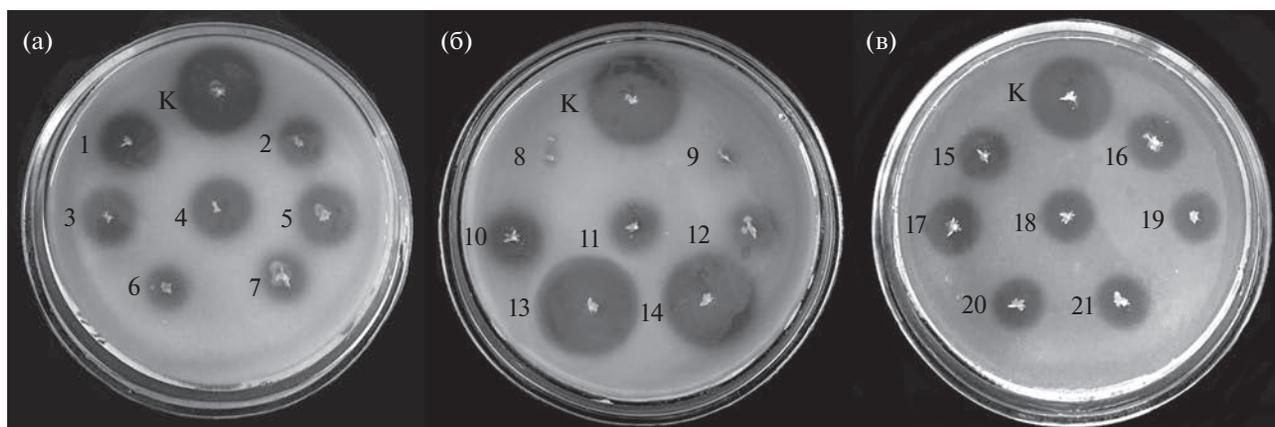


Рис. 2. Скрининг штаммов *Saccharomyces paradoxus* на наличие пектинолитической активности на PG-среде: (а): 1 – N20; 2 – N29; 3 – N35; 4 – ZP 506; 5 – N9; 6 – N14; 7 – N26; (б): 8 – ATCC 96968; 9 – UCDFST 71-101; 10 – UCDFST 73-538.2; 11 – UCDFST 72-145; 12 – UCDFST 67-570; 13 – UCDFST 62-186; 14 – UCDFST 61-220; (в): 15 – M2; 16 – M6; 17 – M7; 18 – M10; 19 – N43; 20 – 61.02; 21 – N48; К – контрольный штамм *S. cerevisiae* ВКПМ Y-718.

туруновой кислоты вокруг колоний дрожжей. В зависимости от диаметра образующихся ореолов изученные штаммы были разделены на четыре группы: 1) до 15 мм; 2) 15–20 мм; 3) более 20 мм. В четвертую группу были отнесены штаммы, не имеющие активности на PG-среде.

По пектинолитической активности 58 штаммов европейской популяции *S. paradoxus* разделились на две равные группы. К первой группе (диаметр зоны лизиса до 15 мм) были отнесены 28 штаммов, преимущественно выделенных из сокоотечений дуба *Quercus robur* (табл. 1, рис. 2а, 2в). Среди 28 штаммов второй группы ($d = 15\text{--}20$ мм) большинство изолировано с зеленой хвои ели, зеленых листьев брусники и сокоотечений широколиственных деревьев в европейской части России (Naumov, 1987; Глушакова и соавт., 2007). Штаммы ATCC 96968 и ATCC 96971, выделенные из экссудата *Quercus* sp. в Финляндии, не имели активность и были отнесены к 4 группе (рис. 2б).

Одиннадцать штаммов дальневосточной популяции попали в первую группу (табл. 1, рис. 2б, 2в). Ко второй группе были отнесены выделенные на Дальнем Востоке России штаммы N45, N47 (сокоотечение *Q. mongolica*) и ВКМ Y-1697 (сок амурского винограда), а также японский штамм NBRC 1805.

Из 18 штаммов североамериканской популяции шесть (95-1, 95-4, 95-7, UCDFST 79-128, UCDFST 79-140 и UCDFST 61-196) характеризовались диаметром зоны гидролиза менее 15 мм. Штаммы UCDFST 69-1006, UCDFST 61-248, UCDFST 51-186, UCDFST 51-137, UCDFST 52-153, UCDFST 61-232, UCDFST 72-129 попали во вторую группу. Пять штаммов имели зоны гидролиза полигалактуруновой кислоты более 20 мм: UCDFST 52-225 (20.2 мм), UCDFST 61-359 (22.4 мм), 95-3 (22.9 мм), UCDFST 61-220

(25.4 мм) и UCDFST 62-186 (27.4 мм) (табл. 1, рис. 2б). Следует отметить, что пектинолитическая активность последнего штамма была выше, чем у контрольного штамма ВКПМ Y-718 (27.0 мм). Обладающий наибольшей пектинолитической активностью штамм UCDFST 62-186 выделен из осинового гнезда в Канаде (табл. 1).

Среди 7 изученных гавайских штаммов только два имели активность: UCDFST 72-145 (13.8 мм) и UCDFST 73-538.2 (14.6 мм) (табл. 1, рис. 2б). У штаммов UCDFST 72-149, UWO(PS) 91-917.1, UCDFST 72-140, UCDFST 71-101 и UCDFST 72-143 активность не обнаружена (табл. 1, рис. 2б).

Филогенетический анализ генов *PGU* дрожжей *S. paradoxus* и кодируемых ими аминокислотных последовательностей. Мы провели секвенирование генов *PGU* у 27 штаммов *S. paradoxus*, относящихся к различным популяциям: европейской (CBS 406, ВКМ Y-1707, ВКМ Y-1708, M22, M11, M6, M12, M37, M40, N9, N40, N15, ZP 506), дальневосточной (ВКМ Y-505, ВКМ Y-1704, N47), североамериканской (95-1, UCDFST 69-1006, UCDFST 61-359, UCDFST 61-220, UCDFST 52-225, UCDFST 61-248, UCDFST 52-153, UCDFST 79-128, UCDFST 62-186) и гавайской (UCDFST 73-538.2, UCDFST 72-145). Полученные нуклеотидные последовательности имели длину 1077 нуклеотида, что покрывает большую часть кодирующей области генов *PGU*. Нуклеотидные последовательности сравнили между собой и с *PGU*-последовательностями штаммов *S. paradoxus*, депонированными в GenBank (Yue et al., 2017; He et al., 2022).

Штаммы европейской популяции имели идентичные последовательности генов *PGU* или отличались 1–6 нуклеотидными заменами. Наибольшие отличия (6 нуклеотидов) обнаружены у хорватского штамма RO88, который, согласно литературным данным (Eschstruth, Divol, 2011),

обладает высокой пектинолитической активностью. По нуклеотидным последовательностям генов *PGU* дальневосточные штаммы разделились на две группы. В первую вошли штаммы, выделенные на Дальнем Востоке России, Японии и Китае, имеющие идентичные *PGU*-последовательности или отличающиеся 1–3 заменами. Вторую группу сформировали шесть дивергентных китайских штаммов (HB-SNJ10a, SN-TB12-1, BJ-DLS2-1, BJ-DLS32-26, SN-QL4-2, BJ-DLS60-3), которые имеют идентичные *PGU*-последовательности и отличаются от штаммов первой группы 21–22 заменами. Различия между штаммами европейской и дальневосточной популяций составили от 6 до 28 замен в генах *PGU*.

Североамериканская популяция оказалась наиболее гетерогенной по нуклеотидным последовательностям генов *PGU*: от 0 до 88 замен. Из 9 проанализированных североамериканских штаммов только два (UCDFST 69-1006 и UCDFST 61-220) имели идентичные последовательности. От 1 до 10 замен обнаружено в генах *PGU* штаммов 95-1, UCDFST 69-1006, UCDFST 61-220, UCDFST 52-225, UCDFST 52-153 и UCDFST 79-128. Штаммы UCDFST 61-248 и UCDFST 62-186 имели сходные последовательности пектиназных генов (2 нуклеотидные замены), которые отличались от других североамериканских штаммов 14–20 нуклеотидами. Наиболее дивергентной оказалась *PGU*-последовательность штамма UCDFST 61-359: 82–88 нуклеотидных позиций. Этот штамм выделен из сокотечения вяза *Ulmus carpinifolia* в Калифорнии (табл. 1). Пектиназные гены североамериканских и европейских штаммов отличались 32–86 заменами, а с дальневосточными штаммами различия составили 31–87 нуклеотидов.

Нуклеотидные последовательности генов *PGU* трех гавайских штаммов UCDFST 73-538.2, UCDFST 72-145 и UWO (PS) 91-917.1, отличались 5–17 заменами. Интересно отметить, что ген *PGU* гибридного штамма UCDFST 73-538.2 отличается от последовательности североамериканского штамма UCDFST 52-153 всего одной синонимичной нуклеотидной заменой. Белковые последовательности эндо-полигалактуроназ этих штаммов идентичны. Различия между пектиназными генами гавайских и европейских штаммов составили от 33 до 40 замен, обнаружено 33–38 замен с дальневосточными и 1–92 замены с североамериканскими штаммами.

По полученным нуклеотидным последовательностям генов *PGU* дрожжей *S. paradoxus* были определены аминокислотные последовательности соответствующих белков из 359 аминокислотных остатков. На основании анализа аминокислотных последовательностей построено филогенетическое древо (рис. 3). В качестве внешней группы исполь-

зовали эндо-полигалактуроназу Epg1 дрожжей *Kluuyveromyces marxianus*.

На филогенетическом древе выделяются три основных кластера. Внутри первого кластера выделяются два подкластера. Один образован штаммами *S. cerevisiae*, а во втором объединились штаммы *S. paradoxus* и типовая культура *S. cariocanus* NCYC 2890. Внутри последнего подкластера также выделяются две группы. Первая включает штаммы североамериканской и гавайской популяций дрожжей *S. paradoxus*, а также *S. cariocanus*: 96.4–100% сходства. К этой группе примыкают шесть китайских штаммов (HB-SNJ10a, SN-TB12-1, BJ-DLS2-1, BJ-DLS32-26, SN-QL4-2, BJ-DLS60-3), *Pgu*-последовательности которых отличаются 3–7 белковыми заменами: 94.2–97.6% сходства. Вторая группа образована эндо-полигалактуроназами европейских и дальневосточных штаммов *S. paradoxus*, которые идентичны на 98.2–99.4%. Отдельное положение занимает белок североамериканского штамма UCDFST 61-359, который отличается 11–19 заменами от остальных штаммов *S. paradoxus* (рис. 3).

Второй кластер объединяет дрожжи *S. mikatae* и *S. jurei*, эндо-полигалактуроназы которых идентичны на 88.0–93.5%. Сходство белков Pgu1m/Pgu2m и Pgu1j/Pgu2j с *Pgu*-последовательностями *S. cerevisiae*, *S. paradoxus* и *S. cariocanus*: 79.5–84.6%.

Третий кластер образован наиболее дивергентными белками Pgu1b, Pgu2b и Pgu3b дрожжей *S. bayanus*, имеющих 81.4–82.1% сходства. Сходство с эндо-полигалактуроназами остальных видов *Saccharomyces* значительно ниже: 68.0–78.0% (рис. 3). Отдельное положение на филогенетическом древе занимают эндо-полигалактуроназы *S. kudriavzevii* и *S. arboricola*, которые идентичны на 72.3%. Сходство с белками остальных видов *Saccharomyces* составило 72.3–80.6% у *S. kudriavzevii* и 72.3–78.2% у *S. arboricola* (рис. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенное исследование показало, что высокая пектинолитическая активность характерна для дрожжей *S. paradoxus*. Из 98 изученных штаммов неспособность секретировать активную эндо-полигалактуроназу выявлена только у 5 гавайских (UCDFST 72-140, UCDFST 71-101, UCDFST 72-143, UCDFST 72-149, UWO (PS) 91-917.1) и двух европейских (ATCC 96968 и ATCC 96971) штаммов (табл. 1). Все остальные штаммы были способны в той или иной степени секретировать активную эндо-полигалактуроназу, при этом не было обнаружено ни одного штамма с диаметром зоны лизиса <11 мм. Североамериканские штаммы UCDFST 52-225, UCDFST 61-359, UCDFST 61-220, 95-3 и UCDFST 62-186 обладают очень высокой пектинолитической активностью, сопо-

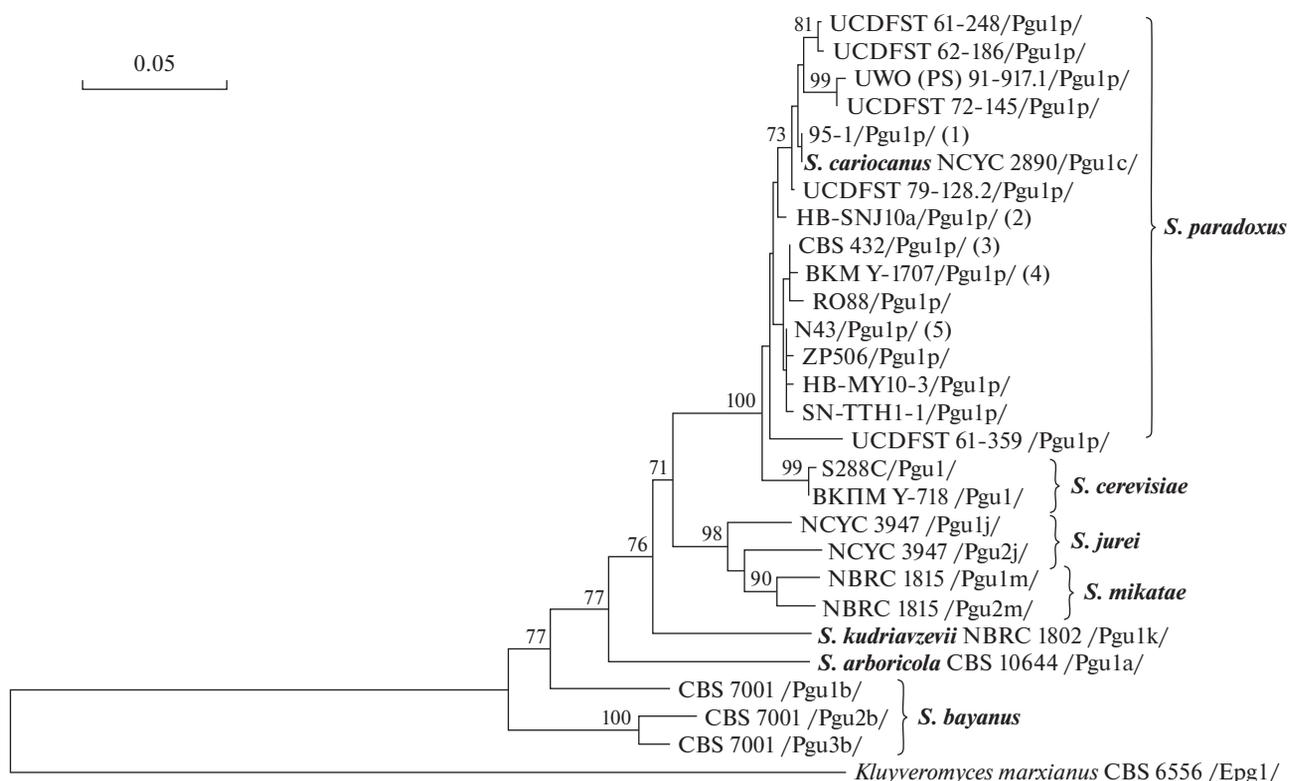


Рис. 3. Филогенетический анализ аминокислотных последовательностей эндо-полигалактуроназ Pgu дрожжей рода *Saccharomyces*. В качестве внешней группы использована эндо-полигалактуроназа дрожжей *Kluyveromyces marxianus*. Приводятся значения бутстрепа >70%. Шкала соответствует 50 аминокислотным заменам на 1000 аминокислотных позиций. Цифрами в скобках обозначены группы штаммов, имеющие идентичные аминокислотные последовательности: (1) – UCDFST 52-153, UCDFST 69-1006, UCDFST 52-225, UCDFST 61-220, UCDFST 73-538.2; (2) – SN-TB12-1, BJ-DLS2-1, BJ-DLS32-26, SN-QL4-2, BJ-DLS60; (3) – N17, CBS 406, M22, M6, M11, M12, M37, M40, N9, N15, N40; (4) – BKM Y-1708, BKM Y-1697; (5) – N44, BKM Y-505, BKM Y-1704, N47, SN-ZZ18-9, BJ-DLS32-27, SN-HZZ6-2, XZ-98-1-1, SN-HZZ24-1, SN-ZZ59-1, HB-SNJ2a, RS9, SN-ZZ32-3, JL-WQ14-1, SN-HZZ1-1, SN-TTS3-10, JL-CB13-1, HB-XS3-1, HB-MY15-2, HB-XXY4-1, HB-XS1-1, HB-XS18-1, JL-CB5-1, HB-XS21-2.

ставимой или даже превышающей такую экспериментально полученного тетраплоидного штамма *S. cerevisiae* ВКПМ Y-718 (табл. 1). Следует отметить, что большинство изученных нами ранее штаммов *S. cerevisiae*, а также дрожжи *S. arboricola*, *S. kudriavzevii* и *S. mikatae* не способны расщеплять пектиновые вещества или обладают очень низкой активностью: зоны лизиса полигалактуроновой кислоты 3.5–15.6 мм (Наумова и соавт., 2021). В настоящее время известно только 4 штамма *S. jurei*, выделенных с коры дуба во Франции и Германии (Naseb et al., 2017; Hutzler et al., 2021). Ранее нами показано, что французские штаммы *S. jurei* обладают средней пектинолитической активностью: 14.7–17.2 мм (Наумова и соавт., 2021). В тоже время высокая пектинолитическая активность является видовой особенностью дрожжей *S. bayanus* (Боровкова и соавт., 2022).

Филогенетический анализ подтвердил видоспецифичность генов *PGU* дрожжей рода *Saccharomyces*. Исключением является вид *S. cariocanus*,

пектиназный ген которого не отличается по нуклеотидной последовательности от генов некоторых североамериканских штаммов *S. paradoxus*. Следует отметить, что по многим молекулярным маркерам дрожжи *S. cariocanus* не отличаются от штаммов *S. paradoxus* из североамериканской популяции (Liti et al., 2005, 2006). Сравнительный анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей пектиназных генов показал, что североамериканская и дальневосточная популяции *S. paradoxus* характеризуются более высоким генетическим разнообразием, чем европейская.

Из восьми известных видов *Saccharomyces* высокая пектинолитическая активность характерна для двух из них: *S. bayanus* и *S. paradoxus*. По-видимому, способность секретировать активную эндо-полигалактуроназу является видовой особенностью этих дрожжей. Экологической нишей дрожжей *S. bayanus* является виноградарство и виноделие (Наумов и соавт., 2011). С другой стороны, дрожжи *S. paradoxus* не связаны с хозяйственной деятельностью человека и встречаются

преимущественно в природных условиях (Наумов, 2013). Эти дрожжи обитают в сокотечениях и коре различных деревьев, особенно дубов, лесной подстилке и самой почве, в насекомых, на диких ягодах и др. Круглогодичное изучение эпифитных дрожжевых сообществ в Московской области показало, что в начале лета и конце зимы на живых и разлагающихся листьях некоторых видов растений существенно возрастает численность дрожжей *S. paradoxus* (Глушакова и соавт., 2007). Это может указывать на экологическую значимость эндо-полигалактуроназы. По-видимому, полигалактуроновая составляющая растительного пектина является важной частью углеводного питания обитающих в природе дрожжей *S. paradoxus*.

Обнаруженная нами (Наумова и соавт., 2021; настоящее исследование) высокая пектинолитическая активность *S. paradoxus* позволяет предложить использовать генофонд этого вида для селекционной работы с винными дрожжами. Особенно это касается штаммов, выделенных из винограда. Действительно, выделенный с виноградинок штамм RO88 уже успешно используется в виноделии Хорватии (Redžepović et al., 2003; Eschstruth, Divol, 2011).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено в рамках государственного задания АААА-А20-120093090015-2.

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

Боровкова А.Н., Шаламитский М.Ю., Наумова Е.С. Отбор штаммов *Saccharomyces bayanus* с высокой пектинолитической активностью и филогенетический анализ генов *PGU* // Биотехнология. 2022. Т. 38. № 1. С. 13–24.

Borovkova A.N., Shalamitskii M.Yu., Naumova E.S. Selection of *Saccharomyces bayanus* strains with high pectinolytic activity and phylogenetic analysis of *PGU* genes // Appl. Biochem. Microbiol. 2022. V. 58. № 9. P. 1–10.

Глушакова А.М., Иванникова Ю.В., Наумова Е.С., Чернов И.Ю., Наумов Г.И. Массовое выделение и идентификация дрожжей *Saccharomyces paradoxus* из филлосферы растений // Микробиология. 2007. Т. 76. С. 236–242.

Glushakova A.M., Ivannikova Y.V., Naumova E.S., Chernov I.Y., Naumov G.I. Massive isolation and

identification of *Saccharomyces paradoxus* yeasts from plant phyllosphere // Microbiology (Moscow). 2007. V. 76. P. 205–210.

Наумов Г.И. Новая разновидность *S. bayanus* var. *ivarum*, установленная генетическим анализом // Микробиология. 2000. Т. 69. С. 410–414.

Naumov G.I. *Saccharomyces bayanus* var. *ivarum* comb. nov., a new variety established by genetic analysis // Microbiology (Moscow). 2000. V. 69. P. 338–342.

Наумов Г.И. Генетическое родство и биологический статус индустриально важных дрожжей *Saccharomyces eubayanus* Sampaio et al. // ДАН. 2017. Т. 473. № 5. С. 622–625.

Naumov G.I. Genetic relationship and biological status of the industrially important yeast *Saccharomyces eubayanus* Sampaio et al. // Dokl. Biol. Sciences. 2017. V. 473. P. 73–76.

Наумов Г.И. Эколого-биогеографические особенности дрожжей *Saccharomyces paradoxus* Batschinskaya и родственных видов: (I) ранние исследования // Микробиология. 2013. Т. 82. С. 387–394.

Naumov G.I. Ecological and biogeographical features of *Saccharomyces paradoxus* Batschinskaya yeast and related species: I. The early studies // Microbiology (Moscow). 2013. V. 82. P. 397–403.

Наумов Г.И., Наумова Е.С., Мартыненко Н.Н., Маснёф Помаред И. Таксономия, экология и генетика дрожжей *Saccharomyces bayanus* – нового объекта в науке и практике // Микробиология. 2011. Т. 80. С. 723–730.

Naumov G.I., Naumova E.S., Martynenko N.N., Masneuf-Pomarede I. Taxonomy, ecology, and genetics of the yeast *Saccharomyces bayanus*: a new object for science and practice // Microbiology (Moscow). 2011. V. 80. P. 735–742.

Наумова Е.С., Боровкова А.Н., Шаламитский М.Ю., Наумов Г.И. Природный полиморфизм пектиназных генов *PGU* дрожжей рода *Saccharomyces* // Микробиология. 2021. Т. 90. С. 344–356.

Naumova E.S., Borovkova A.N., Naumov G.I., Shalamitskiy M.Y. Natural polymorphism of pectinase *PGU* genes in the *Saccharomyces* yeasts // Microbiology (Moscow). 2021. V. 90. P. 349–360.

Серпова Е.В., Кишковская С.А., Мартыненко Н.Н., Наумова Е.С. Молекулярно-генетическая идентификация винных дрожжей Крыма // Биотехнология. 2011. № 6. С. 47–54.

Belda I., Conchillo L.B., Ruiz J., Navascués E., Marquina D., Santos A. Selection and use of pectinolytic yeasts for improving clarification and phenolic extraction in winemaking // Int. J. Food Microbiol. 2016. V. 223. P. 1–8.

Belda I., Ruiz J., Esteban-Fernández A., Navascués E., Marquina D., Santos A., Moreno-Arribas M.V. Microbial contribution to wine aroma and its intended use for wine quality improvement // Molecules. 2017. V. 22. P. 189–218.

Bendixsen D.P., Frazão J.G., Stelkens R. *Saccharomyces* yeast hybrids on the rise // Yeast. 2022. V. 39. P. 40–54.

Berbegal C., Khomenko I., Russo P., Spano G., Fragasso M., Biasioli F., Capozzi V. PTR-ToF-MS for the online monitoring of alcoholic fermentation in wine: assessment of VOCs variability associated with different combinations of *Saccharomyces*/Non-*Saccharomyces* as a case-study // Fermentation. 2020. V. 6. P. 55–72.

da Silva E.G., de Fátima Borges M., Medina C., Hilsdorf Piccoli R., Freitas Schwan R. Pectinolytic enzymes secreted by

- yeasts from tropical fruits // *FEMS Yeast Res.* 2005. V. 5. P. 859–865.
- Divol B., Rensburg P. *PGU1* gene natural deletion is responsible for the absence of endo-polygalacturonase activity in some wine strains of *Saccharomyces cerevisiae* // *FEMS Yeast Res.* 2007. V. 7. P. 1328–1339.
- Eschstruth A., Divol B. Comparative characterization of endo-polygalacturonase (Pgu1) from *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus* under winemaking conditions // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2011. V. 91. P. 623–634.
- Fernández-González M., Ubeda J.F., Vasudevan T.G., Cordeiro Otero R.R., Briones A.I. Evaluation of polygalacturonase activity in *Saccharomyces cerevisiae* wine strains // *FEMS Microbiol. Lett.* 2004. V. 237. P. 261–266.
- He P.Y., Shao X.Q., Duan S.F., Han D.Y., Li K., Shi J.Y., Zhang R.P., Han P.J., Wang Q.M., Bai F.Y. Highly diverged lineages of *Saccharomyces paradoxus* in temperate to subtropical climate zones in China // *Yeast.* 2022. V. 39. P. 69–82.
- Hebly M., Brickwedde A., Bolat I., Driessen M.R.M., de Hulster E.A.F., van den Broek M., Pronk J.T., Geertman J.-M., Daran J.-M., Daran-Lapujade P. *S. cerevisiae* × *S. eubayanus* interspecific hybrid, the best of both worlds and beyond // *FEMS Yeast Res.* 2015. V. 15. P. fov005.
- Hutzler M., Michel M., Kunz O., Kuusisto T., Magalhães F., Krogerus K., Gibson B. Unique brewing-relevant properties of a strain of *Saccharomyces jurei* isolated from ash (*Fraxinus excelsior*) // *Front. Microbiol.* 2021. V. 12. Art. 645271.
- Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets // *Mol. Biol. Evol.* 2016. V. 33. P. 1870–1874.
- Kurtzman C.P. Phylogenetic circumscription of *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* and other members of the *Saccharomycetaceae*, and the proposal of the new genera *Lachancea*, *Nakaseomyces*, *Naumovia*, *Vanderwaltozyma* and *Zygotorus laspora* // *FEMS Yeast Res.* 2003. V. 4. P. 233–245.
- Libkind D., Hittinger C.T., Valério E., Gonçalves C., Dover J., Johnston M., Gonçalves P., Sampaio J.P. Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of lager-brewing yeast // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011. V. 108. P. 14539–14544.
- Liti G., Peruffo A., James S.A., Roberts I.N., Louis E.J. Inferences of evolutionary relationships from a population survey of LTR-retrotransposons and telomeric-associated sequences in the *Saccharomyces sensu stricto* complex // *Yeast.* 2005. V. 22. P. 177–192.
- Liti G., David B., Barton H., Louis E.J. Sequence diversity, reproductive isolation and species concepts in *Saccharomyces* // *Genetics.* 2006. V. 174. P. 839–850.
- Löoke M., Kristjuhan K., Kristjuhan A. Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR based applications // *Biotechniques.* 2011. V. 50. P. 325–328.
- Louw C., La Grange D., Pretorius I.S., van Rensburg P. The effect of polysaccharide-degrading wine yeast transformants on the efficiency of wine processing and wine flavor // *J. Biotechnol.* 2006. V. 125. P. 447–461.
- Louw C., Young P.R., van Rensburg P., Divol B. Epigenetic regulation of *PGU1* transcription in *Saccharomyces cerevisiae* // *FEMS Yeast Res.* 2010. V. 10. P. 158–167.
- Morard M., Benavent-Gil Y., Ortiz-Tovar G., Pérez-Través L., Querol A., Toft Ch., Barrio E. Genome structure reveals the diversity of mating mechanisms in *Saccharomyces cerevisiae* × *Saccharomyces kudriavzevii* hybrids, and the genomic instability that promotes phenotypic diversity // *Microb. Genom.* 2020. V. 6. P. e000333.
- Naseeb S., James S.A., Alsammar H., Michaels C.J., Gini B., Nueno-Palop C., Bond C.J., McGhie H., Roberts I.N., Delneri D. *Saccharomyces jurei* sp. nov., isolation and genetic identification of a novel yeast species from *Quercus robur* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2017. V. 67. P. 2046–2052.
- Naumov G.I. Genetic basis for classification and identification of the ascomycetous yeasts // *Stud. Mycol.* 1987. V. 30. P. 469–475.
- Naumov G.I., Naumova E.S., Gaillardin C. Genetic and karyotypic identification of wine *Saccharomyces bayanus* yeasts isolated in France and Italy // *Syst. Appl. Microbiol.* 1993. V. 16. P. 274–279.
- Naumov G.I., James S.A., Naumova E.S., Louis E.J., Roberts I.N. Three new species in the *Saccharomyces sensu stricto* complex: *Saccharomyces cariocanus*, *Saccharomyces kudriavzevii* and *Saccharomyces mikatae* // *Int. J. Evol. Microbiol.* 2000. V. 50. P. 1931–1942.
- Naumova E.S., Naumov G.I., Masneuf-Pomaredé I., Aigle M., Dubourdiou D. Molecular genetic study of introgression between *Saccharomyces bayanus* and *S. cerevisiae* // *Yeast.* 2005. V. 22. P. 1099–1115.
- Nespolo R.F., Villarroel C.A., Oporto C.I., Tapia S.M., Vega-Macaya F., Urbina K., De Chiara M., Mozzachiodi S., Mikhalev E., Thompson D., Larrondo L.F., Saenz-Agudelo P., Liti G., Cubillos F.A. An out-of-patagonia migration explains the worldwide diversity and distribution of *Saccharomyces eubayanus* lineages // *PLoS Genetics.* 2020. V. 16. e1008777.
- Nikulin J., Krogerus K., Gibson B. Alternative *Saccharomyces* interspecies hybrid combinations and their potential for low-temperature wort fermentation // *Yeast.* 2018. V. 35. P. 113–127.
- Peris D., Pérez-Torrado R., Hittinger C.T., Barrio E., Querol A. On the origins and industrial applications of *Saccharomyces cerevisiae* × *Saccharomyces kudriavzevii* hybrids // *Yeast.* 2018. V. 35. P. 51–69.
- Pérez-Través L., Lopes C.A., Querol A., Barrio E. On the complexity of the *Saccharomyces bayanus* taxon: hybridization and potential hybrid speciation // *PLoS One.* 2014. V. 9. e93729.
- Pretorius I.S. Tasting the terroir of wine yeast innovation // *FEMS Yeast Res.* 2020. V. 20. Art. foz084.
- Redžepović S., Orlić S., Majdak A., Kozina B., Volschenk H., Viljoen-Bloom M. Differential malic acid degradation by selected strains of *Saccharomyces* during alcoholic fermentation // *Int. J. Food. Microbiol.* 2003. V. 83. P. 49–61.
- Rementeria A., Rodriguez J.A., Cadaval A., Amenabar R., Muguruza J.R., Hernando F.L., Sevilla M.J. Yeast associated with spontaneous fermentations of white wines from “Txakoli de Bizkaia” region (Basque Country, North Spain) // *Int. J. Food Microbiol.* 2003. V. 86. P. 201–207.
- Rollero S., Zietsman A.J.J., Buffetto F., Schückel J., Ortiz-Julien A., Divol B. *Kluyveromyces marxianus* secretes a pectinase in shiraz grape must that impacts technological properties and aroma profile of wine // *Agric. Food Chem.* 2018. V. 66. P. 11739–11747.
- Sampaio J.P., Gonçalves P. Natural populations of *Saccharomyces kudriavzevii* in Portugal are associated with oak bark and are sympatric with *S. cerevisiae* and *S. paradoxus* // *Appl. Environ. Microbiol.* 2008. V. 74. P. 2144–2152.

Torriani S., Zapparoli G., Suzzi G. Genetic and phenotypic diversity of *Saccharomyces sensu stricto* strains isolated from Amarone wine // *Antonie van Leeuwenhoek*. 1999. V. 5. P. 207–215.

Tufariello M., Fragasso M., Pico J., Panighel A., Castellarin S.D., Flamini R., Grieco F. Influence of Non-*Saccharomyces* on wine chemistry: a focus on aroma-related compounds // *Molecules*. 2021. V. 26. P. 644–666.

Van Rensburg P., Pretorius I.S. Enzymes in winemaking: harnessing natural catalysts for efficient biotransformations // *S. Afr. J. Enol. Viticult.* 2000. V. 21. P. 52–73.

Vaughan-Martini A., Martini A. *Saccharomyces* Meyen ex Reess (1870) // *The Yeast, a Taxonomic Study* / Eds. Kurtzman C.P., Fell J.W., Boekhout T. 5th edn. Amsterdam: Elsevier, 2011. V. 2. P. 733–746.

Wang S.A., Bai F.Y. *Saccharomyces arboricolus* sp. nov., a yeast species from tree bark // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2008. V. 58. P. 510–514.

Yue J.X., Li J., Aigrain L., Hallin J., Persson K., Oliver K., Bergstrom A., Coupland P., Warringer J., Lagomarsino M.C., Fischer G., Durbin R., Liti G. Contrasting evolutionary genome dynamics between domesticated and wild yeasts // *Nature Genetics*. 2017. V. 49. P. 913–924.

Pectinolytic Yeast *Saccharomyces paradoxus* as a New Gene Pool for Winemaking

A. N. Borovkova^{1, 2}, M. Yu. Shalamitskiy³, and E. S. Naumova^{1, *}

¹National Research Center “Kurchatov Institute”, Kurchatov Complex for Genetic Research (GosNIIgenetika), Moscow, 123098 Russia

²Department of Mycology and Algology, Moscow State University, Moscow, 119234 Russia

³All-Russian National Institute for Vine and Winemaking “Magarach”, Russian Academy of Sciences, Yalta, 298600 Russia

*e-mail: lena_naumova@yahoo.com

Received October 3, 2022; revised October 26, 2022; accepted October 31, 2022

Abstract—A large-scale screening of pectinolytic activity in the yeast *Saccharomyces paradoxus* isolated from various natural sources in Europe, Asia, North America, and the Hawaiian Islands was carried out. Of the 98 studied strains, pectinolytic activity was absent only in five Hawaiian and two European strains. Most strains were able to secrete active endo-polygalacturonase. North American strains UCDFST 52-225, UCDFST 61-359, UCDFST 61-220, 95-3, and UCDFST 62-186 had very high pectinolytic activity, comparable to or even higher than that of the experimentally obtained tetraploid strain *S. cerevisiae* VKPM Y-718. Comparative analysis of the nucleotide and amino acid sequences of pectinase genes showed that the North American and Far Eastern populations of *S. paradoxus* were more genetically diverse than the European and Hawaiian ones. Phylogenetic analysis confirmed the species specificity of the *PGU* genes of *Saccharomyces* yeasts. Of the eight *Saccharomyces* species, high pectinolytic activity is characteristic of *S. bayanus* and *S. paradoxus*. Five North American strains with the highest pectinolytic activity are of interest for further molecular genetic studies and breeding work with wine yeasts. The ecological role of endo-polygalacturonase is discussed.

Keywords: *Saccharomyces paradoxus*, genetic populations, the *PGU* genes, pectinase, endo-polygalacturonase, pectin, phylogenetic analysis

КРАТКИЕ
СООБЩЕНИЯ

СУТОЧНАЯ ДИНАМИКА МЕТАНА В ЦИАНОБАКТЕРИАЛЬНОМ
СООБЩЕСТВЕ СОДОВОГО ОЗЕРА ГОРЧИНА 1
(КУЛУНДИНСКАЯ СТЕПЬ, АЛТАЙСКИЙ КРАЙ)

© 2023 г. О. С. Самылина^а, *, А. Ю. Меркель^а, Н. В. Пименов^а

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

*e-mail: olga.samyлина@gmail.com

Поступила в редакцию 16.11.2022 г.

После доработки 19.11.2022 г.

Принята к публикации 20.11.2022 г.

Исследована суточная динамика содержания метана в придонной фототрофной биомассе мелко-водного содового озера Горчина 1 с соленостью в период проведения работ 30 г/л. В сообществе доминировали нитчатые цианобактерии, но формирования слоистого мата не происходило. Выявлено максимальное значение содержания метана до 202.4 нмоль $\text{CH}_4/\text{см}^3$ в утренние часы, что значительно превышало ночные показатели (28.9–42.8 нмоль $\text{CH}_4/\text{см}^3$). Сопоставление данных по содержанию метана с относительной численностью цианобактерий, метаногенных архей и метанотрофных бактерий в течение суток указывает на то, что активные процессы цикла метана в содовых озерах происходят не только в осадках, но и в придонных цианобактериальных сообществах. Содержание метана в биомассе такого сообщества является результатом баланса между процессами его выделения метаногенами, потребления метанотрофными бактериями и естественной дегазацией. Предполагается, что утренний пик содержания метана связан с выделением диазотрофными цианобактериями водорода, который стимулирует развитие и активность гидрогенотрофных метаногенов рода *Methanocalculus*.

Ключевые слова: суточная динамика, метан, содовое озеро, цианобактерии, метаногены, метанотрофы

DOI: 10.31857/S0026365622600778, **EDN:** AVQZZF

Содовые озера южной Сибири уже несколько десятилетий являются классическим объектом изучения микробных сообществ, адаптированных к жизни в полиэкстремофильных условиях — при повышенных значениях pH и высокой минерализации с преобладанием натриевых солей карбоната/бикарбоната (Труды..., 2007; Sorokin et al., 2014, 2015c). Гидрохимический режим озер этого типа в континентальных районах с умеренным климатом крайне нестабилен и напрямую зависит от меняющихся климатических параметров, наблюдаемых в разные сезоны и годы (среднемесячное количество осадков, температурный режим и т.д.). Недавно опубликованы метагеномные и метатранскриптомные исследования таксономического и функционального разнообразия микробных сообществ содовых озер, локализованных на разных континентах (Vavourakis et al., 2018; Zorz et al., 2019; Vanda et al., 2021; Pellegrinetti et al., 2022). Эти работы демонстрируют, с одной стороны, высокое сходство географически далеких галоалкалофильных сообществ, а с другой — значительное влияние солености на их состав и функционирование.

Терминальная фаза разложения органического вещества в содовых озерах происходит преимущественно при участии сульфатредуцирующих микроорганизмов, активность которых определяется как высокой продуктивностью содовых озер, так и содержанием сульфатов, часто превышающим их концентрацию в морских местобитаниях (Sorokin et al., 2011). Однако повышенное содержание метана, наблюдаемое в осадках многих содовых озер, свидетельствует о протекании также и активных процессов метаногенеза (Sorokin et al., 2015a). В содовых озерах выявлены все четыре известные катаболические пути образования метана: гидрогенотрофный, ацетокластический, метилотрофный и миксотрофный (метил-редуцирующий), причем общая соленость и температура являются ключевыми факторами, определяющими активность метаногенных архей в этих экосистемах (Sorokin et al., 2015a, 2022).

Наряду с метаногенами, в содовых озерах обнаружены алкалофильные метанотрофные бактерии, осуществляющие процесс окисления метана

(Khmelenina et al., 2000; Sorokin et al., 2014, 2015c). Наиболее активен этот процесс в содовых озерах при значениях pH 9–10 и концентрации ионов Na^+ ниже 1.5 М. В аэробном поверхностном слое осадков таких озер обычно доминируют метанотрофы I типа, относящиеся к группе гаммапротеобактерий *Methylomicrobium*–*Methylotuvimicrobium*, способные сохранять метаболическую активность при низком содержании кислорода. В последние годы метанотрофные бактерии I типа детектируются молекулярными методами в восстановленных осадках и бескислородных водах меромиктических водоемов. Предполагается, что в таких условиях для окисления метана метанотрофы могут использовать другие акцепторы электронов, помимо кислорода (нитраты, нитриты), и/или поддерживать активность при тесном взаимодействии с оксигенными фототрофами (см. обзор Каллистова и соавт., 2017 и ссылки в нем).

Таким образом, по имеющимся на сегодняшний день данным в осадках содовых озер с умеренной соленостью (до 100 г/л) происходят активные процессы круговорота метана, в котором участвуют разнообразные метаногенные археи и метанотрофные бактерии I типа.

В последние годы стали появляться работы, которые связывают образование метана в аэробной водной толще различных озер с прямой конверсией углекислоты в метан оксифототрофами (см. обзор Vizić et al., 2020 и ссылки в нем; Thottathil et al., 2022). Возможность протекания такого процесса в содовых озерах в настоящее время не выявлена. Напротив, для низкоминерализованного (около 8 г/л) меромиктического содового озера Соначи (Восточно-Африканская рифтовая долина, Кения), где в аэробных слоях воды на фоне цианобактериального цветения обнаружена необычайно высокая концентрация биогенного метана (до 156 мкмоль/л), было показано, что его образование связано с развитием гидрогенотрофных и ацетокластических метаногенов во взвешенных частицах (Fazi et al., 2021). Отмечая связь высокой концентрации метана с цветением цианобактерий, авторы этой работы не анализировали суточную динамику содержания метана в воде. Таким образом, вопрос о концентрациях, продуцентах и закономерностях появления метана в воде содовых озер остается практически неизученным.

В этой связи целью нашей работы стало изучение *in situ* суточной динамики метана в цианобактериальных сообществах мелководного содового озера Горчина 1 в Кулундинской степи и поиск корреляций с динамикой численности прокариот, вовлеченных в процессы образования и окисления метана.

Озеро Горчина 1 (51°40'19" N 79°54'20" E) входит в группу из четырех небольших озер, окру-

женных сосновым бором и расположенных в Михайловском районе Алтайского края. Экспериментальную работу проводили в начале июля 2019 г. Соленость определяли портативным рефрактометром ATAGO ATCS/MillE (Япония), значения pH – с помощью полевого потенциометра-кондуктометра “WTW” (Германия). Общую карбонатную щелочность определяли методом титрования 1 М раствором HCl. Интенсивность освещения измеряли с помощью люксметра ТКА-ЛЮКС (НТП “ТКА”, Россия). Объектом исследования служило придонное фототрофное сообщество, развивавшееся на мелководье у уреза воды (рис. 1). Образцы биомассы отбирали в течение суток в 00:00, 04:00, 08:00, 12:00, 16:00 и 20:00. В каждой точке времени биомассу брали непосредственно из озера в одной и той же локации.

Морфологическое разнообразие фототрофных микроорганизмов в природных образцах изучали в нативных препаратах под световым микроскопом Jenaval (“Carl Zeiss”, Германия). Идентификацию доминирующих цианобактерий производили морфологически с учетом генетических данных, полученных нами как ранее (Namsaraev et al., 2018), так и в данном исследовании. Содержание хлорофилла *a* (хлф *a*) в биомассе определяли аналогично предыдущим исследованиям (Namsaraev et al., 2018).

Для измерения содержания метана 1 мл биомассы фототрофного сообщества (в двух повторностях для каждой точки времени) помещали в пенициллиновый флакон объемом 20 мл, сразу фиксировали формалином в конечной концентрации 3.7% и герметично закрывали резиновой пробкой с алюминированным колпачком. Фиксированные образцы транспортировали в лабораторию, где измеряли содержание метана на хроматографе Кристалл-2000-М (ЗАО СКБ “Хроматэк”, Россия) с пламенно-ионизационным детектором. Полученные значения пересчитывали в нмоль $\text{CH}_4/\text{см}^3$ с учетом объема газовой фазы пенициллинового флакона.

Образцы фототрофного сообщества для экстракции ДНК и получения метагеномов отбирали одновременно с остальными. Биомассу помещали во флаконы объемом 60 мл, хранили и транспортировали в лабораторию в охлажденном виде. Выделение тотальной ДНК из природных образцов, а также последующий метагеномный анализ проводили по ранее описанной методике (Yakimov et al., 2022). Долю отдельных представителей прокариот в микробном сообществе вычисляли по соотношению покрытия прочтениями их геномов.

Статистический анализ данных (средние значения \pm стандартные отклонения, коэффициенты корреляции Спирмена (ρ)) проводили с использо-

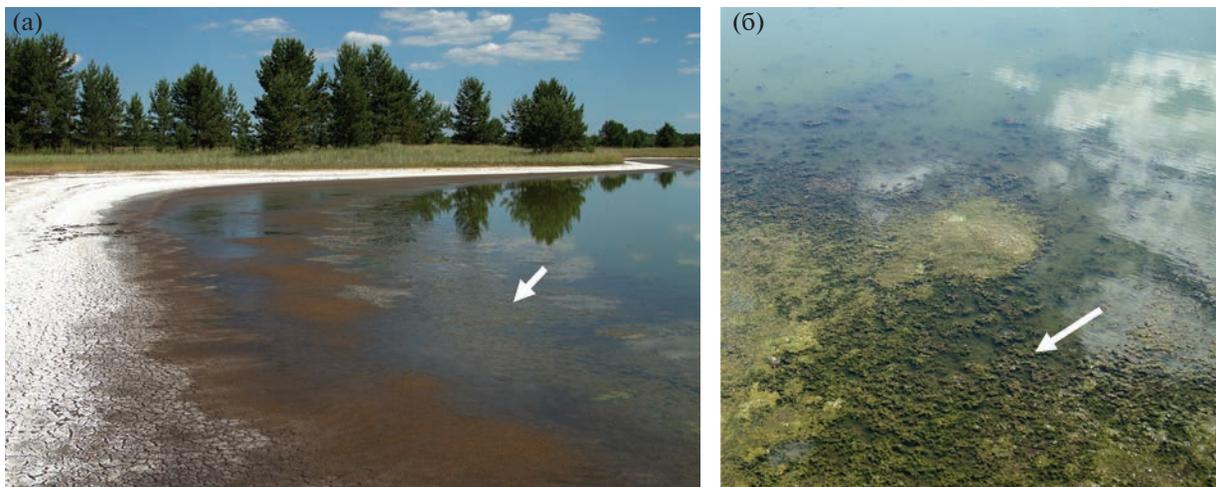


Рис. 1. Содовое озеро Горчина 1 в июле 2019 г.: (а) – общий вид; (б) – рыхлое придонное фототрофное сообщество. Стрелками отмечена исследованная фототрофная биомасса: локализация относительно береговой линии (а); общий вид биомассы, использованной для измерений (б).

ванием он-лайн калькулятора: <https://ncalculators.com/statistics/>.

Общая соленость воды озера в момент проведения исследования составила 30 г/л, общая щелочность – 0.4 моль-экв/л, значение рН – 10.52. По данным многолетних наблюдений (2005–2022 гг.) для озера Горчина 1 характерен широкий диапазон изменений общей солености (30–400 г/л) и общей щелочности (0.4–5.9 моль-экв/л). До 2018 г. рапа озера соответствовала статусу гиперсоленого водоема с общим содержанием солей более 85 г/л (Namsaraev et al., 2018). Но в 2018 г. мы наблюдали сильное распреснение, когда общая соленость снизилась до 30 г/л, что повлекло за собой значительные изменения в составе фототрофных сообществ (Горленко и соавт., 2020). В 2019 г. общая соленость не изменилась, и озеро второй год наблюдений находилось в стадии минимальной минерализации за весь многолетний период мониторинга.

В день проведения измерений стояла малооблачная погода, и интенсивность солнечного освещения в течение суток изменялась от 0 до 96.3 клк (рис. 2). В первой половине дня (в 08:00 и 12:00) в точке сбора образцов в планктоне озера наблюдали цветение цианобактерий с доминированием *Limnospira (Arthrospira) fusiformis* и *Anabaenopsis isatchenkoi*, которое исчезло во второй половине дня (16:00 и 20:00) и отсутствовало ночью и ранним утром (0:00, 4:00). На дне вдоль береговой линии наблюдали скопление толстого слоя рыхлой фототрофной биомассы с преобладанием бентосных цианобактерий (рис. 1) и доминированием негетероцистных нитчатых *Nodosilinea* sp., *Sodalinema* (ранее *Geitlerinema*) sp. и гетероцистных cf. *Trichormus* sp. Метагеномный анализ показал, что доля цианобактерий в анализировавшихся мик-

робных сообществах в течение суток варьировала от 17.32 до 32.11% (табл. 1), при этом преобладали геномные последовательности, принадлежащие *Nodosilinea* sp. (от 14.93 до 21.48%). Относительная численность цианобактерий в образцах, собранных в разное время суток, значимо коррелировала с интенсивностью солнечного света ($\rho = 0.7263$), что может говорить об активной поведенческой адаптации этих кислородных фототрофов к изменениям физико-химических условий в течение дня. Интересно, что в образцах не выявлено значимой линейной корреляции между численностью цианобактерий и содержанием хлф *a* ($\rho = -0.3553$), что может быть объяснено как вкладом эукариот (в образцах обнаружены эвгленовые водоросли), так и присутствием неактивного (“мертвого”) хлорофилла или его производных.

Важно отметить, что, несмотря на доминирование нитчатых цианобактерий, в озере не происходило образования слоистых цианобактериальных матов, аналогичных галофильным. Биомасса исследуемого цианобактериального сообщества была рыхлой и достаточно однородной, то есть не имела резких физико-химических градиентов, которые обусловлены слоистостью бентосных микробных матов. Кроме того, развитие этого рыхлого сообщества происходило на мелководье недалеко от уреза воды (рис. 1). Глубина озера здесь составляла всего несколько сантиметров, что позволяет предположить в целом аэробные условия в дневное время. Визуальных изменений в придонной фототрофной биомассе в течение дня не наблюдали. Содержание хлф *a* в образцах не коррелировало с интенсивностью солнечного света ($\rho = 0.0475$), что позволило нам использовать этот критерий для количественных оценок биомассы. Ее плотность в собранных образцах имела сопоставимые

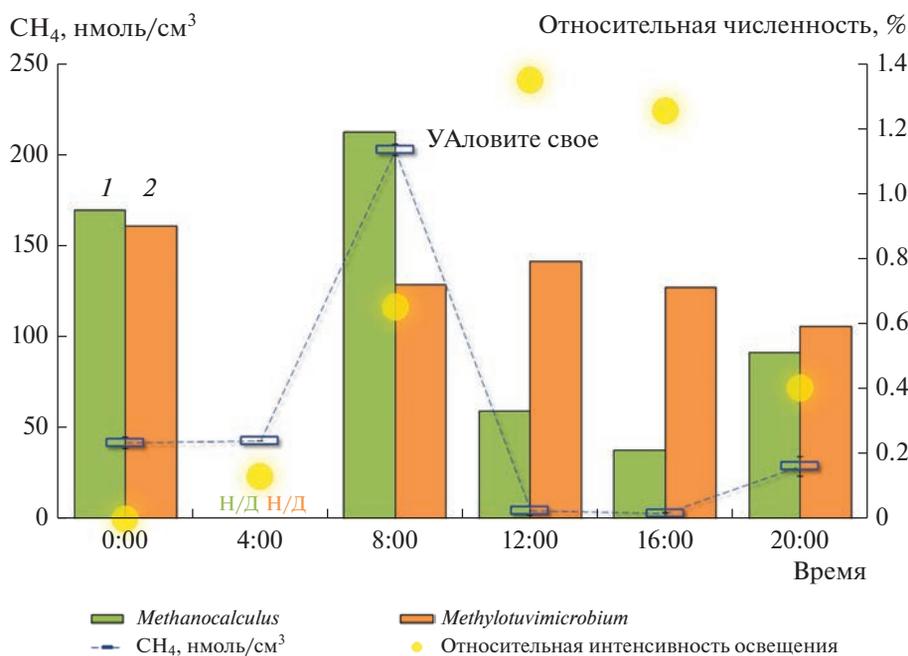


Рис. 2. Содержание метана и относительная численность метаногенных архей (1) и метанотрофных бактерий (2) в придонной фототрофной биомассе озера Горчина 1 в течение суток (июль 2019 г.). В точке 04:00 метагеномный анализ не проводили (н/д – нет данных). Относительная интенсивность освещения приведена вне осей ординат и отражает изменение интенсивности солнечного освещения в течение суток, где минимальное значение соответствует 0 клк (00:00, полночь), а максимальное – 96.3 клк (12:00, полдень) (подробнее см. в табл. 1).

значения (табл. 1) и составляла в среднем 46.8 ± 11.8 мкг хлф a/cm^3 .

Содержание метана в образцах придонной фототрофной биомассы изменялось в течение дня (рис. 2, табл. 1). Ночью и ранним утром оно составляло в среднем 42.2 ± 2.5 нмоль CH_4/cm^3 . Утром в 8:00 был зафиксирован пик (202.4 ± 3.1 нмоль CH_4/cm^3), после чего произошло резкое снижение содержания метана в придонной биомассе, которое в 12:00 и 16:00 составило в среднем 3.8 ± 2.3 нмоль CH_4/cm^3 . Вечером в 20:00 содержание метана снова увеличилось (28.9 ± 5.4 нмоль CH_4/cm^3), хотя еще не достигло ночных и раннеутренних значений. Содержание метана и хлф a в образцах линейно не коррелировало ($r = 0.03358$), т.е. изменения в содержании метана нельзя напрямую связать с разной плотностью образцов (разной биомассой сообщества в 1 мл образца). Отметим, что содержание метана имело умеренную отрицательную корреляцию с численностью цианобактерий ($r = -0.6484$), то есть наши данные не позволяют линейно связать выделение метана в данном эксперименте с прямой фотосинтетической активностью цианобактерий, как это предполагается для некоторых других экосистем (Bižić et al., 2020; Thottathil et al., 2022).

Метагеномный анализ выявил в изучаемых образцах геномные последовательности, относящиеся к гидрогенотрофным метаногенным археям

рода *Methanocalculus* и метанотрофным бактериям рода *Methylo-tuvimicrobium*. Из полученных данных удалось лишь частично восстановить геном *Methanocalculus* – 22.8% полноты сборки по оценке CheckM (Parks et al., 2015) и 0% контаминации. Полученные фрагменты генома, однако, содержали как частичную последовательность гена 16S рРНК (1040 п.о., 99.9% сходства с *Methanocalculus alkaliphilus* AMF2^T (Sorokin et al., 2015b); рис. 3), так и частичную последовательность гена *mcrA* (425 п.о., 98.82% сходства с *Methanocalculus alkaliphilus* AMF2^T). Более того, полученные фрагменты генома имеют уровень ANI с геномом *Methanocalculus alkaliphilus* AMF2^T 99.11%, т.е. можно с уверенностью говорить, что выявленный нами организм является штаммом именно этого вида.

Геном представителя *Methylo-tuvimicrobium* удалось собрать более полно (70% полноты сборки; 2.5% контаминации). Фрагментов гена 16S рРНК в нем обнаружить не удалось, однако с помощью программного обеспечения для геномной классификации GTDB-Tk v2 (Chaumeil et al., 2022) он был однозначно классифицирован как представитель рода *Methylo-tuvimicrobium*. Этот же вывод подтверждается анализом гена *pmoA*: 97.54% сходства к “*Methylo-tuvimicrobium buryatense*” 5GB1C по фрагменту длиной 448 п.о. Эти два генома имеют уровень ANI 90%, то есть, вероятно, относятся к разным, хотя и близкородственным видам. Стоит

Таблица 1. Некоторые параметры, измеренные в ходе эксперимента, и их взаимосвязь

Время	Интенсивность естественного освещения, клк	Хлф <i>a</i> , мкг/см ³ (среднее ± ст. откл.)	СН ₄ , нмоль/см ³ (среднее ± ст. откл.)	Относительная численность, %		
				цианобактерии (суммарно)	<i>Methanocalculus</i>	<i>Methylotheobacterium</i>
00:00	0	42.5 ± 1.7	41.6 ± 3.0	19.74	0.95	0.90
04:00	9.4	32.5 ± 12.0	42.8 ± 0.1	Н/д	Н/д	Н/д
08:00	46.5	49.4 ± 2.3	202.4 ± 3.1	17.32	1.19	0.72
12:00	96.3	41.7 ± 10.3	4.5 ± 2.6	32.11	0.33	0.79
16:00	89.7	47.0 ± 3.9	3.1 ± 0.3	23.65	0.21	0.71
20:00	28.7	67.7 ± 11.8	28.9 ± 5.4	20.99	0.51	0.59
Коэффициент корреляции	X_1	Y_1	Y_2	Y_3	Y_4	Y_5
Спирмена (ρ) между наборами данных X_i и Y_i *		$\rho = 0.0475$	$\rho = -0.2131$	$\rho = 0.7263$	$\rho = -0.6762$	$\rho = -0.1955$
		X_2	Y_2	Y_3	Y_4	Y_5
			$\rho = 0.03358$	$\rho = -0.3553$	$\rho = -0.0621$	$\rho = -0.8646$
			X_3	Y_3	Y_4	Y_5
				$\rho = -0.6484$	$\rho = 0.8497$	$\rho = -0.0567$
				X_4	Y_4	Y_5
					$\rho = -0.7333$	$\rho = 0.1278$

* Значения ρ (по модулю) соответствуют степени линейной корреляции: до 0.2 – очень слабой, 0.2–0.5 – слабой, 0.5–0.7 – средней, 0.7–0.9 – высокой, свыше 0.9 – очень высокой.

отметить, что ближайшие родственники обнаруженных нами метаногенного и метанотрофного микроорганизмов ранее были выделены также из содовых озер (Kaluzhnaya et al., 2001; Sorokin et al., 2015b).

На основе оценки покрытия прочтениями генома представителя рода *Methylotheobacterium* было показано, что в течение суток его доля в микробном сообществе изменялась незначительно (табл. 1) и в среднем составила $0.74 \pm 0.11\%$. Линейная корреляция численности *Methylotheobacterium* с содержанием метана, численностью цианобактерий и интенсивностью солнечного света не выявлена (табл. 1). Доля *Methanocalculus* в микробном сообществе в течение суток изменялась более выражено (рис. 2, табл. 1), положительно коррелировала с содержанием метана ($\rho = 0.8497$)

и отрицательно – с относительной численностью цианобактерий ($\rho = -0.7333$). Таким образом, можно предположить, что метан, который содержится в биомассе придонных фототрофных сообществ, не поступает из анаэробных осадков, а производится метаногенными археями, развивающимися непосредственно в составе фототрофного сообщества с доминированием оксифототрофов, в первую очередь цианобактерий.

Полученные нами данные показывают, что активные процессы цикла метана, обусловленные жизнедеятельностью метаногенных архей и метанотрофных бактерий, происходят не только в осадках содовых озер, но и в цианобактериальных сообществах, развивающихся в аэробной воде на мелководье. Причем относительная численность микроорганизмов, участвующих в этих процессах, различна в

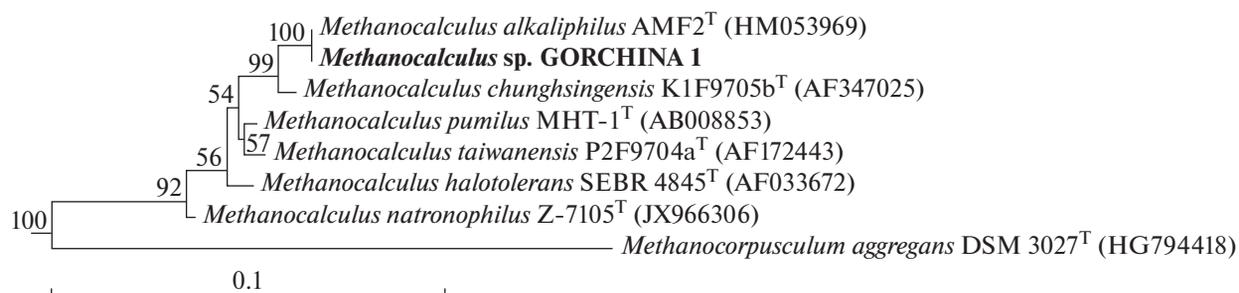


Рис. 3. Филогенетическое дерево, построенное на основании сравнительного анализа последовательностей гена 16S рРНК с использованием алгоритма maximum likelihood и bootstrap анализа (1000 повторов, значения ниже 50% не показаны).

разное время суток. Ночью в отсутствие фотосинтетической активности в цианобактериальном сообществе складываются микроаэробные—анаэробные условия, и происходит постепенное увеличение численности метаногенов. По нашим наблюдениям этот процесс начинается после 16:00 и длится до рассвета, при этом в сообществе поддерживается относительно стабильная концентрация метана. Содержание метана в биомассе является результатом баланса процессов его выделения метаногенами, потребления метанотрофами и естественной дегазации в атмосферу. Наши данные не позволяют оценить скорости этих процессов и их вклад в результирующую концентрацию метана. Особо следует отметить пик содержания метана в 8:00, пятикратно превышающий ночные и раннеутренние значения. Причиной его появления может служить выделение диазотрофными цианобактериями водорода, который стимулирует развитие и активность гидрогенотрофных метаногенов рода *Methanocalculus*. Известно, что сообщества цианобактерий *Nodosilinea* sp., *Sodalinema* sp. и cf. *Trichormus* sp., преобладавших в исследованных образцах, способны к светозависимой азотфиксации (Namsaraev et al., 2018). Физико-химические условия, сложившиеся в утреннее время должны быть благоприятны для такого рода взаимодействия: интенсивность солнечного света постепенно увеличивается и активирует светозависимую фиксацию азота цианобактериальным сообществом, но, вместе с тем, еще не происходит насыщения воды фотосинтетическим кислородом в той степени, которая способна ингибировать активность метаногенов, развивающихся, преимущественно, в анаэробных микронишах. Такое ингибирование, по-видимому, могло наступить к полудню, когда интенсивность солнечного света достигла пика, а относительная численность цианобактерий в сообществе увеличилась. Одновременно с этим произошло снижение концентрации метана в биомассе фототрофного сообщества вследствие аэробного окисления метана метанотрофами рода *Methylotheobacterium*.

Представленные в данной работе результаты и объяснения натуральных наблюдений носят предварительный характер и, безусловно, в дальнейшем требуют получения подтверждений. Кроме того, представляют интерес вопросы, связанные с особенностями суточной динамики микробных процессов при различной солености, которая, как было сказано выше, существенно влияет на состав и функционирование микробных сообществ содовых озер. Работы по изучению суточной динамики микробных процессов в цианобактериальных сообществах содовых озер предполагается продолжить с использованием хроматографических, радиоизотопных и геномных методов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Ш.А. Бегматову (ФИЦ Биотехнологии РАН) и М.А. Синетовой (ИФР РАН) за помощь при получении первичных данных в полевых условиях.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Обработка и анализ данных выполнен при поддержке проекта РНФ № 22-14-00038 и госзадания ФИЦ Биотехнологии РАН.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Горленко В.М., Брянцева И.А., Самылина О.С., Ашихмин А.А., Синетова М.А., Кострикина Н.А., Козяева В.В. Аноксигенные нитчатые фототрофные бактерии в микробных сообществах содовых озер Кулундинской степи (Алтайский край) // Микробиология. 2020. Т. 89. С. 688–699.
- Gorlenko V.M., Bryantseva I.A., Samylyna O.S., Ashikhmin A.A., Sinetova M.A., Kostrikina N.A., Kozyaeva V.V. Filamentous anoxygenic phototrophic bacteria in microbial communities of the Kulunda Steppe soda lakes (Altai Krai, Russia) // Microbiology (Moscow). 2020. V. 89. P. 697–707.
- Каллистова А.Ю., Меркель А.Ю., Тарновецкий И.Ю., Пименов Н.В. Образование и окисление метана прокариотами // Микробиология. 2017. Т. 86. С. 661–683.
- Kallistova A.Y., Merkel A.Y., Tarnovetskii I.Y., Pimenov N.V. Methane formation and oxidation by prokaryotes // Microbiology (Moscow). 2017. V. 86. P. 671–691.
- Труды Института микробиологии им. С.Н. Виноградского. Вып. 14. Алкалофильные микробные сообщества / Под ред. В.Ф. Гальченко. М.: Наука, 2007. 398 с. Proceedings of Winogradsky Institute of Microbiology. V. 14. Alkaliphilic microbial communities / Ed. by Galchenko V.F. M.: Nauka, 2007. 398 p.
- Хмеленина В.Н., Ешинимаяев Б.Ц., Калюжная М.Г., Троценко Ю.А. Потенциальная активность окисления метана и аммония метанотрофными сообществами содовых озер Южного Забайкалья // Микробиология. 2000. Т. 69. С. 553–558.
- Khmelena V.N., Eshinimaev B.T., Kalyuzhnaya M.G., Trotsenko Y.A. Potential activity of methane and ammonium oxidation by methanotrophic communities from the soda lakes of Southern Transbaikalia // Microbiology (Moscow). 2000. T. 69. P. 460–465.
- Banda J.F., Zhang Q., Ma L., Pei L., Du Z., Hao C., Dong H. Both pH and salinity shape the microbial communities of the lakes in Badain Jaran Desert, NW China // Sci. Total Environ. 2021. V. 791. Art. 148108.

- Bižić M., Grossart H.-P., Ionescu D.* Methane Paradox // eLS / John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, 2020. P. 1–11. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0028892>
- Chaumeil P.A., Mussig A.J., Hugenholtz P., Parks D.H.* GTDB-Tk v2: memory friendly classification with the Genome Taxonomy Database // Bioinformatics. 2022. Art. btac672. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btac672>
- Fazi S., Amalfitano S., Venturi S., Pacini N., Vazquez E., Olaka L.A., Tassi F., Crognale S., Herzsprung P., Lechtenfeld O.J., Cabassi J., Capecchiacci F., Rossetti S., Yakimov M.M., Vaselli O., Harper D.M., Butturini A.* High concentrations of dissolved biogenic methane associated with cyanobacterial blooms in East African lake surface water // Commun. Biol. 2021. V. 4. Art. 845. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02365-x>
- Kaluzhnaya M., Khmelenina V., Eshinimaev B., Suzina N., Nikitin D., Solonin A., Lin J.L., McDonald I., Murrell C., Trotsenko Y.* Taxonomic characterization of new alkaliphilic and alkalitolerant methanotrophs from soda lakes of the Southeastern Transbaikal region and description of *Methylobacterium buryatense* sp. nov. // Syst. Appl. Microbiol. 2001. V. 24. P. 166–176.
- Namsaraev Z., Samylina O., Sukhacheva M., Borisenko G., Sorokin D., Tourova T.* Effect of salinity on diazotrophic activity and microbial composition of phototrophic communities from Bitter-1 soda lake (Kulunda Steppe, Russia) // Extremophiles. 2018. V. 22. P. 651–663.
- 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.
- Pellegrinetti T.A., Cotta S.R., Sarmiento H., Costa J.S., Delbaje E., Montes C.R., Camargo P.B., Barbiero L., Rezend-Filho A.T., Fiore M.F.* Bacterial communities along environmental gradients in tropical soda lakes // Microb. Ecol. 2022. <https://doi.org/10.1007/s00248-022-02086-6>
- Sorokin D.Y., Abbas B., Geleijnse M., Pimenov N.V., Sukhacheva M.V., van Loosdrecht M.C.* Methanogenesis at extremely haloalkaline conditions in the soda lakes of Kulunda Steppe (Altai, Russia) // FEMS Microbiol. Ecol. 2015a. V. 91. Art. fiv016.
- Sorokin D.Y., Abbas B., Merkel A.Y., Rijpstra W.I.C., Damsté J.S.S., Sukhacheva M.V., van Loosdrecht M.C.M.* *Methanosalsum natronophilum* sp. nov., and *Methanocalculus alkaliphilus* sp. nov., haloalkaliphilic methanogens from hypersaline soda lakes // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2015b. V. 65. P. 3739–3745.
- Sorokin D.Y., Banciu H.A., Muyzer G.* Functional microbiology of soda lakes // Curr. Opin. Microbiol. 2015c. V. 25. P. 88–96.
- Sorokin D.Y., Berben T., Melton E.D., Overmars L., Vavourakis C.D., Muyzer G.* Microbial diversity and biogeochemical cycling in soda lakes // Extremophiles. 2014. V. 18. P. 791–809.
- Sorokin D.Y., Kuenen J.G., Muyzer G.* The microbial sulfur cycle at extremely haloalkaline conditions of soda lakes // Front. Microbiol. 2011. V. 2. Art. 44.
- Sorokin D.Y., Merkel A.Y., Abbas B.* Ecology of *Methanona-tronarchaeia* // Environ. Microbiol. 2022. Jun 21. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.16108>
- Thottathil S.D., Reis P.C.J., Prairie Y.T.* Magnitude and drivers of oxic methane production in small temperate lakes // Environ. Sci. Technol. 2022. V. 56. P. 11041–11050.
- Vavourakis C.D., Andrei A.-S., Mehrshad M., Ghai R., Sorokin D.Y., Muyzer G.* A metagenomics roadmap to the uncultured genome diversity in hypersaline soda lake sediments // Microbiome. 2018. V. 6. Art. 168. P. 1–18.
- Yakimov M.M., Merkel A.Y., Gaisin V.A., Pilhofer M., Messina E., Hallsworth J.E., Klyukina A.A., Tikhonova E.N., Gorklenko V.M.* Cultivation of a vampire: “*Candidatus Absconditococcus praedator*” // Environ. Microbiol. 2022. V. 24. P. 30–49.
- Zorz J.K., Sharp C., Kleiner M., Gordon P.M.K., Pon R.T., Dong X., Strous M.* A shared core microbiome in soda lakes separated by large distances // Nat. Commun. 2019. V. 10. Art. 4230.

Diurnal Methane Dynamics in the Cyanobacterial Community of Soda Lake Bitter 1 (Kulunda Steppe, Altai Krai)

O. S. Samylina^{1, *}, A. Yu. Merkel¹, and N. V. Pimenov¹

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

*e-mail: olga.samylina@gmail.com

Received November 16, 2022; revised November 19, 2022; accepted November 20, 2022

Abstract—The diurnal dynamics of methane content in the near-bottom phototrophic biomass of the shallow soda Lake Bitter 1 (Gorchina 1) with a salinity of 30 g/L during the study period was investigated. The community was dominated by filamentous cyanobacteria, although no layered mat was formed. The maximum value of methane content up to 202.4 nmol CH₄/cm³ was revealed in the morning hours, which significantly exceeded the night values (28.9–42.8 nmol CH₄/cm³). Comparison of data on the content of methane with the relative abundance of cyanobacteria, methanogenic archaea, and methanotrophic bacteria during the twenty-four hours indicated that active processes of the methane cycle in soda lakes occurred not only in the sediments, but also in the near-bottom cyanobacterial communities. Methane content in the biomass of such a community is the result of a balance between the processes of its release by methanogens, consumption by methanotrophic bacteria, and natural degassing. It is assumed that the morning peak of methane content is associated with the release of hydrogen by diazotrophic cyanobacteria, which stimulates the development and activity of hydrogenotrophic methanogens of the genus *Methanocalculus*.

Keywords: diurnal dynamics, methane, soda lake, cyanobacteria, methanogens, methanotrophs

ПОПРАВКА

DOI: 10.31857/S0026365622600791, EDN: AVRIVJ

К статье: “СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СОСТАВА И СТРУКТУРЫ МИКРОБНЫХ БИОПЛЕНОК ЭКОНИШ МЯСОПЕРЕРАБАТЫВАЮЩИХ КОМБИНАТОВ, РАЗЛИЧАЮЩИХСЯ ИСТОЧНИКАМИ СЫРЬЯ”

Ю. А. Николаев, Е. Н. Тихонова, Г. И. Эль-Регистан, М. В. Журина, В. К. Плакунов,
Е. В. Демкина, Е. В. Зайко, Д. С. Батаева, Н. А. Насыров, Ю. К. Юшина
(Микробиология. Т. 91. № 5. С. 613–630).

В разделе “Финансирование” необходимо изменить информацию.

Вместо:

“Работа финансирована грантом № 075-15-2020-775 Минобрнауки (по приоритетным направлениям научно-технологического развития) и, частично, за счет средств Министерства науки и высшего образования Российской Федерации для ФИЦ Биотехнологии РАН (работа Е.Н. Тихоновой, Г.И. Эль-Регистан, М.В. Журиной, В.К. Плакунова, Е.В. Дёмкиной)”.

Следует читать:

“Работа финансирована грантом № 075-15-2020-775 Минобрнауки (по приоритетным направлениям научно-технологического развития)”.