

ISSN 0026-3656

Том 92, Номер 1

Январь - Февраль 2023



МИКРОБИОЛОГИЯ

www.sciencejournals.ru



СОДЕРЖАНИЕ

Том 92, номер 1, 2023

ОБЗОРЫ

Азафилоновые пигменты грибов как перспективные натуральные красители

Т. В. Антипова, В. П. Желифонова, К. В. Зайцев, М. Б. Вайнштейн

3

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Sulfurospirillum tamanensis sp. nov. – факультативно анаэробная
алкалофильная бактерия из наземного грязевого вулкана

А. А. Фролова, А. Ю. Меркель, В. В. Кевбрин, Д. С. Копицын, А. И. Слободкин

14

Leucosporidium egoroviorum f.a., sp. nov., новый вид дрожжевых грибов,
выделенный из кабачков

А. В. Качалкин, А. М. Глушакова, М. А. Томашевская

24

Состояние цианобактерии *Arthrospira platensis* и ассоциированной с ней микрофлоры
при длительном хранении в состоянии ангидробиоза

И. А. Харчук, О. А. Рылькова, Н. М. Береговая

31

Обнаружение микроцистин-продуцирующих цианобактерий *Microcystis*, *Planktothrix*
и *Dolichospermum* с помощью мультипраймерной амплификации генов *mcy*

С. И. Сиделев

42

Система “кворум сенсинга” у *Chromobacterium subsugae* (ранее *C. violaceum*) ингибируется
гамма-лактонами – минорными компонентами экстракта листьев эвкалипта

К. С. Инчагова, Г. К. Дускаев, Д. Г. Дерябин

47

Сравнительная оценка стрессовых ответов микроводорослей *Prorocentrum cordatum*
(Ostenfeld) Dodge и *Dunaliella salina* (Teod.) на присутствие в среде наночастиц меди

Е. С. Соломонова, Н. Ю. Шоман, А. И. Акимов, О. А. Рылькова

57

Биоцидная активность наночастиц аспарагината хитозана

А. Б. Шиповская, Т. Н. Луговицкая, И. В. Зудина

68

Влияние атранов на рост *Rhodococcus qingshengii* VKM Ac-2784D в присутствии
различных источников углерода и на его способность к разложению нафталина

Л. А. Беловежец, Ю. А. Маркова, А. А. Левчук, Е. Н. Оборина, С. Н. Адамович

77

Микробная деструкция изделий из полипропилена и поливинилхлорида
в анаэробных условиях

Д. В. Малахова, М. А. Егорова, М. Р. Леонтьева, А. Г. Ельченинов,
Т. В. Панова, Ю. Д. Александров, Е. А. Цавкелова

86

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

Гены, кодирующие НАД⁺-зависимые формилдегидрогеназы, в таксономии
аэробных метилотрофных бактерий рода *Ancylobacter*

А. А. Чемодурова, А. С. Решетников, Н. В. Агафонова, Н. В. Доронина

98

Авторский указатель тома 91, 2022 г.

103

Contents

Vol. 92, No. 1, 2023

Reviews

Fungal Azaphilone Pigments as Promising Natural Colorants

T. V. Antipova, V. P. Zhelifonova, K. V. Zaitsev, and M. B. Vainshtein 3

Experimental Articles

Sulfurospirillum tamanensis sp. nov., a Facultative Anaerobic Alkaliphilic Bacterium from a Terrestrial Mud Volcano

A. A. Frolova, A. Yu. Merkel, V. V. Kevbrin, D. S. Kopitsyn, and A. I. Slobodkin 14

Leucosporidium egoroviorum f.a., sp. nov., a New Yeast Species Isolated from Zucchini

A. V. Kachalkin, A. M. Glushakova, and M. A. Tomashevskaya 24

State of Cyanobacteria *Arthrospira platensis* and of Associated Microflora during Long-Term Storage in the State of Anhydrobiosis

I. A. Kharchuk, O. A. Rylkova, and N. M. Beregovaya 31

Detection of Microcystin-Producing Cyanobacteria *Microcystis*, *Planktothrix*, and *Dolichospermum* Using Multiprimer Amplification of the *mcy* Genes

S. I. Sidelev 42

Quorum Sensing in *Chromobacterium subsugae* (Previously – *C. violaceum*) Is Inhibited by Gamma-Lactones, the Minor Components of Eucalyptus Leaf Extract

K. S. Inchagova, G. K. Duskaev, and D. G. Deryabin 47

Comparative Assessment of Stress Responses of the Microalgae *Prorocentrum cordatum* (Ostenfeld) Dodge and *Dunaliella salina* (Teod.) to the Presence of Copper Nanoparticles

E. S. Solomonova, N. Yu. Shoman, A. I. Akimov, and O. A. Rylkova 57

Biocidal Activity of Chitosan Asparaginate Nanoparticles

A. B. Shipovskaya, T. N. Lugovitskaya, and I. V. Zudina 68

The Effect of Atranes on the Growth of *Rhodococcus qingshengii* VKM AC-2784D in the Presence of Various Carbon Sources and on Its Ability to Degrade Naphthalene

L. A. Belovezhets, I. O. A. Markova, A. A. Levchuk, E. N. Oborina, and S. N. Adamovich 77

Microbial Destruction of Polypropylene And Polyvinylchloride Samples under the Anaerobic Conditions

D. V. Malakhova, M. A. Egorova, M. R. Leontieva, A. G. Elcheninov, T. V. Panova, Yu. D. Aleksandrov, and E. A. Tsavkelova 86

Short Communications

Genes of NAD⁺-Dependent Formate Dehydrogenases in Taxonomy of Aerobic Methylophilic Bacteria of the Genus *Ancylobacter*

A. A. Chemodurova, A. S. Reshetnikov, N. V. Agafonova, and N. V. Doronina 98

Author Index, 2022

103

АЗАФИЛОНОВЫЕ ПИГМЕНТЫ ГРИБОВ КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЕ НАТУРАЛЬНЫЕ КРАСИТЕЛИ

© 2023 г. Т. В. Антипова^{a, *}, В. П. Желифонова^a, К. В. Зайцев^b, М. Б. Вайнштейн^a

^aИнститут биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина
Российской академии наук — обособленное подразделение ФГБУН ФИЦ

«Пуцинский научный центр биологических исследований РАН», Пуццо, 142290 Россия

^bМосковский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119234 Россия

*e-mail: tantipova@ibpm.pushchino.ru

Поступила в редакцию 23.05.2022 г.

После доработки 23.06.2022 г.

Принята к публикации 23.06.2022 г.

Микроскопические грибы образуют и экскретируют многочисленные и разнообразные вторичные метаболиты, в том числе пигменты различной окраски, которые могут быть использованы как альтернатива применяемому в промышленности химическим и растительным красителям. Одним из перспективных классов грибных пигментов являются азафилоновые соединения, впервые обнаруженные у грибов рода *Monascus*. В обзоре дан анализ публикаций по образованию пигментов азафилонового типа у грибов *Monascus*, а также у *Talaromyces* и *Aspergillus cavernicola*. Приведены краткие сведения об антимикробной, противоопухолевой, противовоспалительной и гипохолестеролиемической активности азафилоновых пигментов. Обсуждены возможные стратегии повышения производительности процесса получения, а также направленного синтеза желтых, оранжевых и красных пигментов и их производных. В целом обзор позволяет оценить важность азафилоновых пигментов, перспективы и пути расширения их производства для применения в качестве натуральных красителей в различных областях.

Ключевые слова: азафилоновые пигменты, грибы, *Monascus*, *Aspergillus cavernicola*, пищевые красители

DOI: 10.31857/S0026365622600432, **EDN:** NLPLKN

На протяжении десятилетий в пищевой промышленности используют синтетические красители на основе азосоединений, которые получают путем диазотирования ароматических аминов (Benkhaya et al., 2020). Однако оказалось, что применение азокрасителей может провоцировать появление ряда заболеваний, включая онкологические (Al Reza et al., 2019). Кроме того, были обнаружены доказательства связи потребления искусственных пищевых красителей с аллергическими реакциями и поведенческими проблемами у детей (Vakthavachalu et al., 2020). Эти и другие проблемы, связанные со здоровьем, поставили перед пищевой промышленностью необходимость разработки новых составов на основе натуральных красителей для сохранения и обогащения цветовой палитры продуктов (Faustino et al., 2019). В последние годы мировой спрос на безвредные красители природного происхождения быстро растет как в пищевой и косметической промышленности, так и в текстильной отрасли (Kalra et al., 2020; Pimenta et al., 2021).

В настоящее время большинство используемых в промышленности натуральных красителей

получают из растительных источников. Примерами могут служить корень свеклы *Beta vulgaris* (бетанин) или томат *Solanum lycopersicum* (ликопин). Производство таких растительных красителей сильно зависит от поставки сырых ингредиентов, которая подвержена сезонным колебаниям, как в отношении количества, так и качества. Вместе с этим существует независимый от сезонных колебаний биотехнологический источник природных пигментов — биомасса микроорганизмов, выращиваемая в реакторах.

Благодаря значительному генетическому разнообразию, микроорганизмы способны обеспечить чрезвычайно широкий спектр продуцируемых пигментов (Tuli et al., 2014). Выдано более 50 патентов по использованию микробных красителей пищевых продуктов в Японии, США, Франции и Германии. В настоящее время на рынке представлены несколько микробных пищевых красителей: пигменты *Monascus*, астаксантин из *Xanthophyllomyces dendrorhous*, «Арпинк ред» из *Penicillium oxalicum*, рибофлавин из *Ashbya gossypii* и β-каротин или ликопин из *Blakeslea trispora* (Dufossé, 2017). Возрастающий интерес представляют новые продуценты нату-

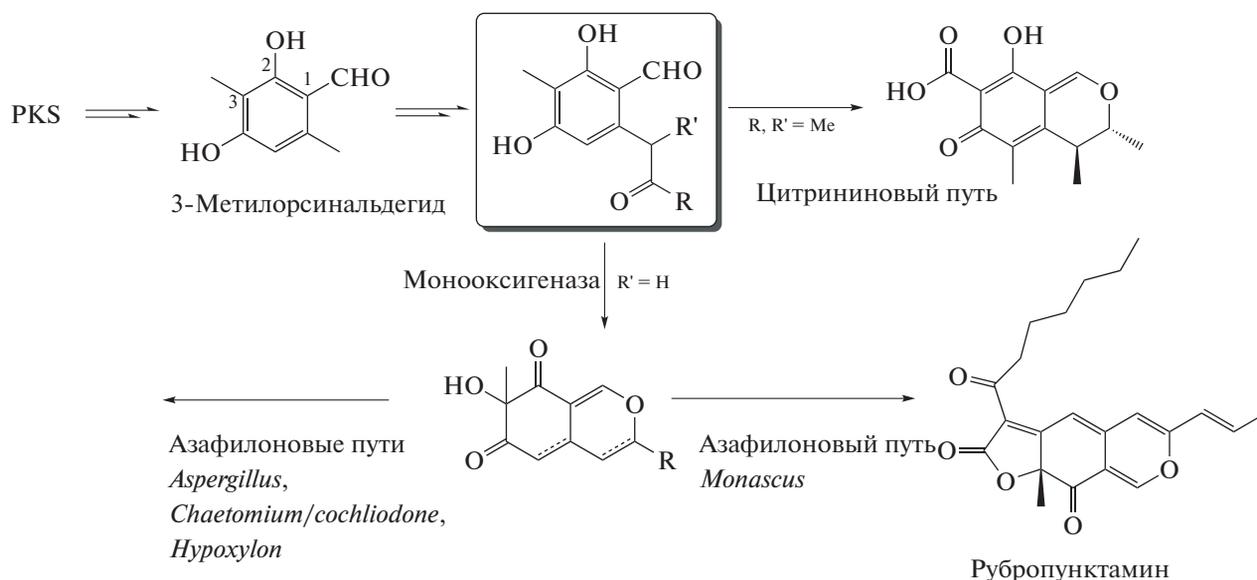


Рис. 1. Схема основных биосинтетических путей образования азафилоновых пигментов (Pavesi et al., 2021).

ральных красителей. Известно, что мицелиальные грибы образуют и экскретируют многочисленные классы вторичных метаболитов, включая пигменты различной окраски, и поэтому они могут быть использованы как новые источники безопасных и стабильных пигментов (Lagashetti et al., 2019; Morales-Oyervides et al., 2020). Преимущество грибных пигментов, по сравнению с химическими и растительными, состоит в том, что при их производстве могут быть использованы отходы агропромышленного комплекса (Faustino et al., 2019). Разнообразие пигментов грибов проявляется не только в их химической структуре, но и в цветовой гамме, которая может добавлять новые или дополнительные оттенки к цветовой палитре существующих красителей.

Одним из многообещающих классов грибных пигментов являются азафилоновые соединения, которые представляют собой вещества поликетидной природы, содержащие пиранохиноновое бициклическое ядро, хиральный четвертичный центр и гидроксильные группы в качестве заместителей (Chen et al., 2020; Pavesi et al., 2021; Liu, Wang, 2022). Традиционными продуцентами этих соединений являются грибы из рода *Monascus* (Patakova 2013; Vendruscolo et al., 2016; Chen et al., 2017). Эти грибы широко используются в странах Юго-Восточной Азии в течение почти двух тысяч лет в качестве натурального пищевого красителя, консерванта, а также в народной медицине для улучшения пищеварения и как болеутоляющее (Shib Pan, 2011; Chen et al., 2015). Например, красный ферментированный рис (“кодзи”, “ан-ка”, “ангкак”), приобретающий свой цвет после культивирования с грибом *Monascus purpureus*, применяется в качестве ценного терапевтического сред-

ства (Klimek et al., 2009). К настоящему времени азафилоновые соединения описаны у 61 рода грибов. К. Павези и соавт. выделили 5 основных биосинтетических путей, приводящих к образованию азафилоновых пигментов (Pavesi et al., 2021). Четыре из них были названы по продуцентам — азафилоновые пути *Monascus*, *Aspergillus*, *Chaetomium*, *Hypoxylon*, и один по конечному продукту — цитрининовый путь. Все основные биосинтетические пути имеют общее происхождение (рис. 1). Поликетидсинтазой (PKS) синтезируется общее промежуточное соединение 3-метилорсинальдегид, который с помощью ферментативных реакций преобразуется в цитринин, либо гидроксилируется монооксигеназой с образованием пиранохинонового ядра, общего для остальных азафилоновых путей.

С точки зрения получения натуральных пищевых красителей наиболее интересны и перспективны пигменты, образуемые азафилоновым путем *Monascus*. Термины “азафилоновый путь *Monascus*” и “*Monascus*-подобные пигменты” исторически закрепились в связи с тем, что эти пигменты впервые были обнаружены у грибов данного рода, однако впоследствии такие пигменты были обнаружены и у грибов других родов.

В настоящем обзоре приводятся современные данные о пигментах, образуемых различными грибами по азафилоновому пути *Monascus* (МП), биологической активности пигментов и о факторах, влияющих на процесс ферментации и цветовую палитру полученных продуктов.

АЗАФИЛОНЫ ГРИБОВ РОДА *MONASCUS*

В настоящее время у *Monascus* идентифицировано около сотни различных азафилоновых соединений (Chen et al., 2017). Существует шесть наиболее известных МП трех цветов: желтого (анкафлавин и монаскин), оранжевого (монаскорубрин и рубропунктатин) и красного (монаскорубрамин и рубропунктамин) (Liu et al., 2018; Pavesi et al., 2021). Эти пигменты образуются с помощью азафилонового пути *Monascus*, при котором исходный поликетид пиранохинон в результате этерификации, восстановления и региоселективной конденсации Кнёвенагеля с последующим восстановлением преобразуется в трициклический продукт, содержащий лактон (рис. 2). Восстановление фуранонового кольца трициклического продукта приводит к образованию анкафлавина и монаскина, либо в результате окисления связи C_{4a}–C₅ FAD-зависимой оксиредуктазой синтезируются оранжевые пигменты рубропунктатин и монаскорубрин (Chen et al., 2017). Из этих оранжевых пигментов в результате прямой реакции с эндогенным аммонием или с основными аминокислотами, такими как аргинин, образуются красные пигменты рубропунктамин и монаскорубрамин. Из-за нуклеофильного характера непротонированной аминогруппы для замены в этой реакции O на N более благоприятны щелочные условия. Известно 42 различных красных пигмента, большинство из которых были получены в результате неферментативной реакции рубропунктатамина и монаскорубрина с различными аминокислотами. Производные пигментов с аминокислотными остатками (ППА) имели более высокую растворимость в воде и термическую стабильность (Wong, Koehler, 1983; Jung et al., 2003). При этом заметно повышалась фотостабильность пигментов в условиях облучения солнечным светом и устойчивость при нейтральной кислотности среды, что делает полученные ППА потенциальными пищевыми красителями (Liu et al., 2018).

Кроме указанных шести основных МП при различных условиях культивирования у *Monascus* были выделены минорные желтые пигменты, такие как ксантомонасины, монаскопиридины, монаскусоны, монасникатинаты, монасфлуоны, монаспирепиридин А и др. Некоторые из этих минорных пигментов могут быть интермедиатами в биосинтетическом пути или продуктами разложения основных пигментов (Patakova, 2013). Продукция микотоксина цитринина также известна для *Monascus* (Blanc et al., 1995; Sabater-Vilar et al., 1999). Было показано, что у этих грибов продукция пигментов и цитринина регулируется общим сигнальным белком G, который играет ключевую роль в образовании вторичных метаболитов. В настоящее время в промышленности используются мутанты штаммов *Monascus*, которые утра-

тили способность синтезировать микотоксин. Тем не менее, в США и ряде европейских стран использование продуктов жизнедеятельности этих грибов в качестве пищевых красителей по-прежнему не разрешено из-за возможного присутствия цитринина и другого нежелательного соединения – статина мевинолина, неконтролируемый прием которого может привести к побочным эффектам.

АЗАФИЛОНЫ ГРИБОВ РОДА *PENICILLIUM* И *TALAROMYCES*

Недавно отдельные представители родов *Talaromyces* и *Penicillium* были признаны потенциально пригодными для промышленного производства природных пигментов, подобных тем, которые продуцируют виды *Monascus* (Maragi et al., 2009; Morales-Oyervides et al., 2020). Известно по меньшей мере несколько видов грибов *Talaromyces* и *Penicillium*, способных образовывать такие пигменты. По данным филогении виды грибов *Talaromyces* высоко гомологичны видам *Penicillium*. Гомология между видами *Penicillium* и *Monascus* намного ближе, чем между видами *Talaromyces* и *Monascus* (Liu et al., 2018). Ряд авторов объясняет появление азафилоновых пигментов *Monascus* у грибов других родов горизонтальным переносом генов, ответственных за биосинтез этих соединений, при этом организация и содержание генов могут различаться в зависимости от эволюционных перестроек (Chen et al., 2019).

У гриба *T. marneffeii* были обнаружены оранжевые пигменты монаскорубрин и рубропунктатин и их аминокислотные конъюгаты красного цвета (Woo et al., 2014). Однако *T. marneffeii* – диморфный гриб, образующий дрожжеподобные клетки, может вызывать серьезные микозы у людей с нарушенным иммунитетом, в частности, у больных СПИДом. Поэтому применение этого гриба и его продуктов в пищевой промышленности запрещено.

Грибы *T. purpurgenum* образуют большое количество окрашенных соединений, относящихся к монаскоподобным пигментам (Ogihara et al., 2000; Maragi et al., 2006; Frisvad et al., 2013). Некоторые из этих пигментов были структурно охарактеризованы, среди них фиолетовый пигмент PP-V (10Z)-12-карбоксимонаскорубрамин и оранжевый пигмент PP-O (10Z)-12-карбоксимонаскорубрин (Arai et al., 2015). Новая серия азафилоновых пигментов, названных атророзины, недавно была выделена из гриба *T. atrovirens* (Isbrandt et al., 2020). Атророзины А-У имели такое же азафилоновое ядро и карбоксильную группу при C₁ как и PP-O, их изохроменовая система также может включать аминокислоты. Несмотря на то, что предшественник атророзина PP-O во время культивирования первоначально был получен в виде смеси двух изомеров (соотношение *цис* : *транс* равно 3 : 2), атроро-

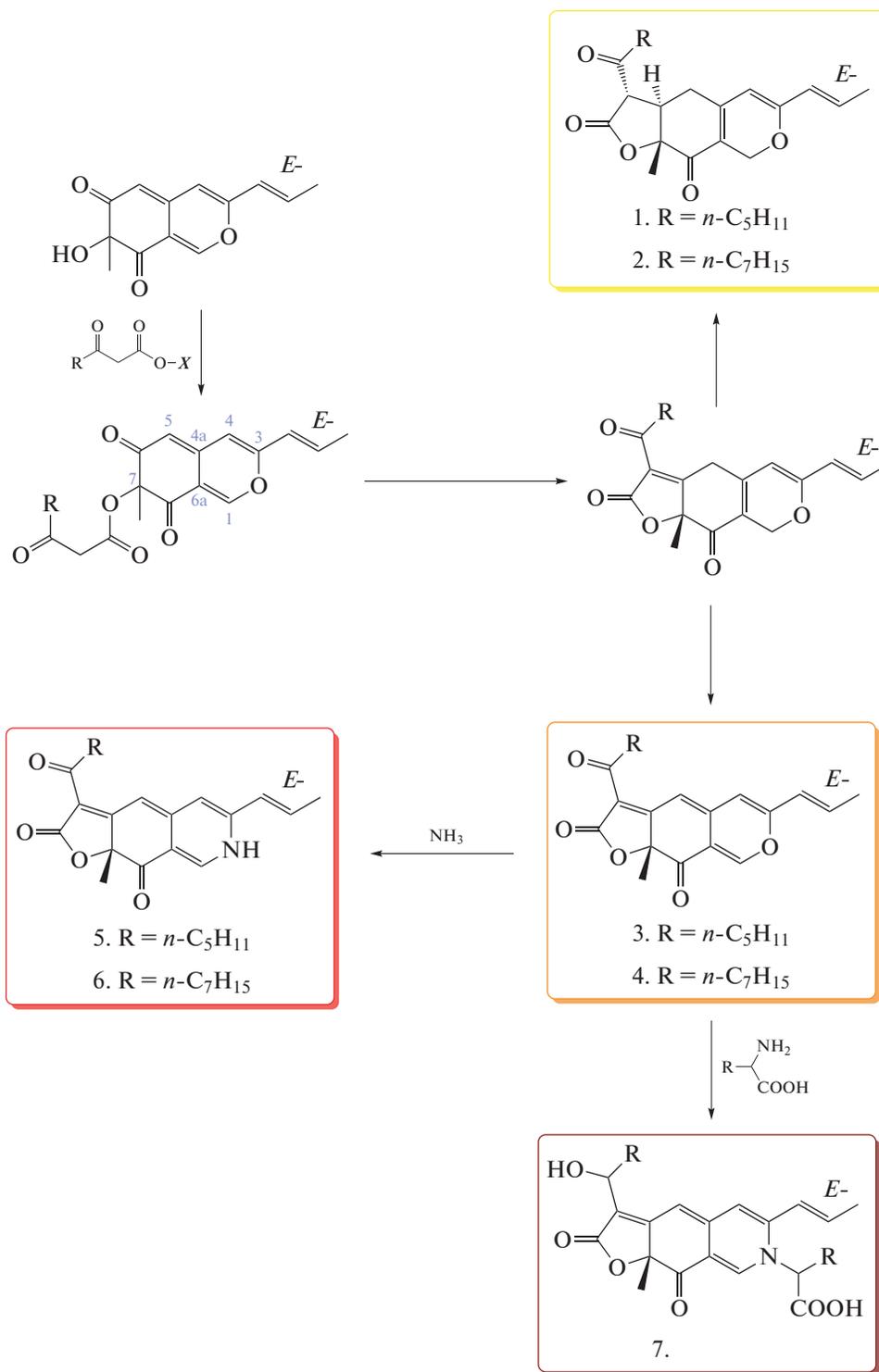


Рис. 2. Биосинтетический путь образования пигментов у *Monascus* (Chen et al., 2017): 1 – монасцин, 2 – анкафлавин, 3 – рубропунктатин, 4 – монаскорубрин, 5 – рубропунктамин, 6 – монаскорубрамин, 7 – производные пигментов с аминокислотами.

зины образовывались исключительно как *цис*-диастереомер (99.5%), возможно, из-за стерических взаимодействий с включенной аминокислотой.

T. purpurogenum интересен с точки зрения промышленного получения пищевых пигментов, но у этих грибов также встречаются цитотоксичные соединения рубратоксины А и В и лютеоскирин

(Frisvad et al., 2013). *T. atrovirens* вместе с оранжевыми пигментами *Monascus* образует миторубрин — азафилоновое соединение, не содержащее кольцо лактона в структуре. *T. atrovirens* рассматривается как потенциальный штамм для замещения *Monascus* sp. при производстве пигментов (Maragi et al., 2009).

Склеротиорин и ротиорин (как и монаскорубрин) являются сходными представителями класса кислородсодержащих гетероциклических соединений. При этом склеротиорин и ротиорин были выделены из культуры *P. sclerotiorum*, путем твердофазной ферментации, а также в жидкой культуре при стационарном культивировании (Curtin et al., 1940; Jackman et al., 1958). Склеротиорин представлял собой желтое аморфное вещество, а ротиорин был выделен в виде длинных красных игл. Ротиорин имеет трициклическую структуру с линейным лактонным кольцом, подобную пигментам *Monascus*. С помощью каскадных реакций ротиорина с первичными аминами, используя фосфаты как катализатор, в погруженной культуре были получены несколько производных ротиорина (Wu et al., 2021). Их рассматривают как альтернативный источник натуральных красителей вместо традиционных пигментов *Monascus*. Однако крупномасштабное производство минорного метаболита ротиорина при погруженном культивировании остается сложным и экономически невыгодным процессом (Liu, Wang, 2022).

АЗАФИЛОНЫ ГРИБОВ РОДА *ASPERGILLUS*

Многообещающим и безопасным источником природных красных пигментов могут быть грибы вида *Aspergillus cavernicola*. У них были обнаружены красные пигменты *цис*- и *транс*-кавернамины и их предшественники — оранжево-желтые пигменты кавернины (рис. 3) (Petersen et al., 2020). В экстракте *A. cavernicola* содержался также красный азафилоновый пигмент гидрокси-кавернамин. Эти метаболиты содержат изобутильный фрагмент в отличие от *n*-пентильных и *n*-гептильных фрагментов у пигментов *Monascus*. Относительно более короткая и разветвленная хвостовая часть структуры способствует лучшему растворению этих пигментов в воде по сравнению с монаскоподобными. В недавно опубликованном изобретении (Petersen et al., 2020) предлагается также способ получения отдельных азафилоновых пигментов путем ферментации *A. cavernicola* в жидкой среде с добавлением различных аминокислот, пептидов, аминокислот и других первичных аминов в качестве источников азота. В результате реакции нуклеофильного замещения по RN-группе оранжевых пигментов под действием соответствующих аминов получают различные производные красного цвета. Можно предположить, что эти производные обладают лучшими характеристиками для

использования в качестве пищевых красителей. Кроме того, у одного из штаммов *A. cavernicola* был выделен метаболит — монасникотиновая кислота (МНК) (Antipova et al., 2018; 2022). МНК по структуре близка монасникотинам, монаспир-пиридину А и монасопиридинам, ранее обнаруженных у грибов рода *Monascus*. При этом МНК в нейтральных условиях — бесцветное соединение, но из-за кето-енольной таутомерии в кислых условиях приобретает желтоватое окрашивание (Рыццов и соавт., 2021).

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ АЗАФИЛОНОВ

Азафилоновые пигменты представляют собой класс соединений, обладающих разнообразной биологической активностью. Имеются многочисленные данные об антимикробной, противовирусной, цитотоксической активностях монаскоподобных пигментов, также они могут действовать как ингибиторы различных ферментов (Osmanova et al., 2010; Liu et al., 2018; Pimenta et al., 2021).

Оранжевые пигменты монаскорубрин и рубропунтатин, в отличие от красных пигментов монаскорубрамина и рубропунтамина обладают антимикробной активностью в отношении *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, некоторых мицелиальных грибов и дрожжей (Martinkova et al., 1995). Более того, полученные производные красных пигментов с аминокислотами, имеющих фенильное кольцо (*D*-,*L*-фенилаланин и *D*-,*L*-тирозин), показали высокую антимикробную активность против бактерий (4–8 мкг/мл); кроме того, грамположительные бактерии были более восприимчивы к ингибированию, чем грамотрицательные бактерии, а лекарственная устойчивость *Lactobacillus* была незначительной (Kim et al., 2006). Производные с *D*-,*L*-аспарагином и *D*-,*L*-тиозином были эффективны против *Candida albicans* и мицелиальных грибов *A. niger* и *P. citrinum*. Антимикробную активность ППА связывают со снижением доступности кислорода для клеток из-за адсорбции пигментов клеточными стенками бактерий. Интересно отметить, что ППА также ингибировали репликацию вируса гепатита С за счет снижения активности вирусной РНК-полимеразы и пути биосинтеза мевалоната (Sun et al., 2012). Производное 2-амино-4-пиколина *in vitro* значительно ингибировало продукцию оксида азота и показало низкую цитотоксичность, что позволяет рассматривать это соединение в качестве потенциального пищевого красителя с противовоспалительным эффектом (Choe et al., 2020).

Для желтых пигментов *Monascus*, таких как анкафлавин (Su et al., 2005), монасцин (Akihisa et al., 2005), монаскуспилоин (Camphausen et al., 2012), монаспирпиридин А (Hsu et al., 2012) и монафилоны А (Hsu et al., 2010), и для водорастворимых желтых

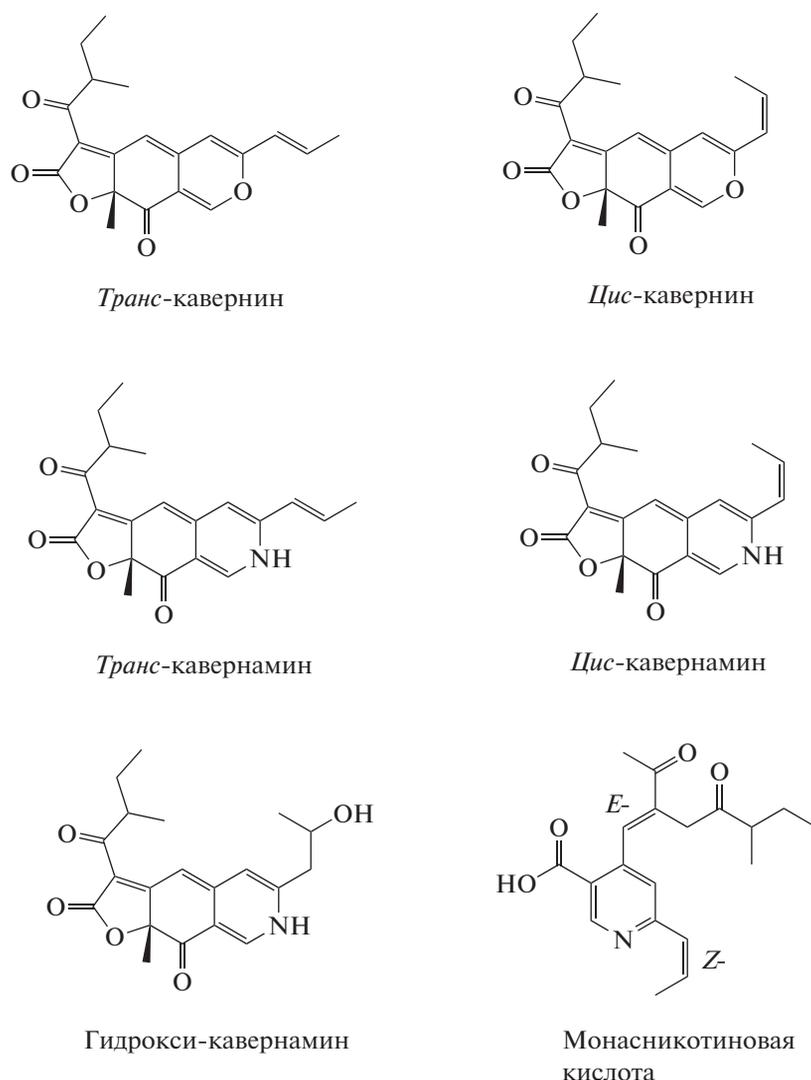


Рис. 3. Вторичные метаболиты гриба *Aspergillus cavernicola*.

пигментов (Tan et al., 2018) показана противоопухолевая активность по отношению к различным клеточным линиям рака. Было обнаружено, что анкафлавин в синергизме с монаколином К ингибировали пролиферацию и индуцировали апоптоз в клетках LCC рака легкого мыши (Ho, Pan, 2009). Обработка клеток HeLa рубропунктагином в темноте или при световом облучении приводила к дозозависимому апоптозу по митохондриальному пути, включая потерю потенциала митохондриальной мембраны, активацию каспазы-3, каспазы-8 и каспазы-9 и увеличение уровня внутриклеточных активных форм кислорода. Индуктивный эффект апоптоза клеток HeLa усиливался при световом излучении (Zheng et al., 2016). Изучение противоопухолевой активности монасникотиновой кислоты показало, что она снижает пролиферацию и миграцию клеток рака простаты LnCaP и ингибирует сигнальные пути АКТ-mTORC1 и FAK-Src (Рысцов

и соавт., 2021). МНК является перспективным соединением для получения различных производных с более высокой степенью противоопухолевой активности.

МП и ППА способны ингибировать разные ферменты и потому могут использоваться для профилактики и лечения различных заболеваний (атеросклероз, ожирение и др.). Гиполипидемический механизм МП заключается, в основном, в снижении уровня липидов в крови и в предотвращении атеросклероза за счет увеличения холестерина липопротеинов высокой плотности (ЛВП) или снижения уровня холестерина липопротеинов низкой плотности (ЛНП) (Liu et al., 2018). Монасцин и анкафлавин снижали уровень ЛНП и сохраняли содержание ЛВП. Эти пигменты ингибировали экспрессию ацетил-коэнзима А-ацетилтрансферазы, микросомального белка-переносчика триацилглицеринов и апопротеина В-100, тем самым

предотвращая сборку ЛНП (Lee et al., 2018). Эфир-холестерин-переносимый белок (СЕТР), ингибирование которого помогает поддерживать высокий уровень холестерина ЛВП в крови, является мишенью для лечения атеросклероза. ППА оказывали ингибирующее действие на СЕТР, среди которых производные L-Thg и L-Tug проявляли самую высокую ингибирующую активность (IC_{50} 1.0 и 2.3 мкМ соответственно) (Jang et al., 2014).

Ингибиторы протеин-тирозин фосфатазы типа 1В (РТР1В) используют для лечения метаболического синдрома и для терапии онкологических заболеваний. Скрининг потенциальных ингибиторов РТР1В из красного риса показал, что монаскоурбрамин проявлял селективную ингибирующую активность в отношении РТР1В (Jin et al., 2016). Монаскотинаты действуют как агонисты РРА γ (рецепторы, активирующие пролиферацию пероксисом) и могут использоваться для профилактики и/или лечения резистентности к инсулину при сахарном диабете 2 типа (Wu et al., 2018).

БИОТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ МП

За последнее десятилетие многие исследования были сосредоточены на оптимизации процесса биотехнологического производства МП. Было разработано несколько методов повышения производительности и цветовой гаммы МП, включая скрининг и мутагенез штаммов, иммобилизацию микробных клеток, нокаут генов, получение рекомбинантных штаммов и оптимизацию условий культивирования. Благодаря проведенным исследованиям, были выявлены факторы, влияющие на процесс ферментации и выход продуктов: способ культивирования, состав питательных сред (источник углерода и азота, соотношение С/Н, кофакторы, поверхностно-активные вещества, промежуточные соединения цикла трикарбоновых кислот), тип и возраст инокулята (споры и мицелий), температура, рН, уровень кислорода и скорость перемешивания, свет, влажность, а также экстракция и очистка пигментов (Chen et al., 2020; Karla et al., 2020; Morales-Oyervides et al., 2020; Pavesi et al., 2021). Описания основных методов, повышающих производительность процессов получения пигментов и регуляции их цвета, сосредоточены в нескольких областях.

Одним из подходов является оптимизация процесса путем подбора наиболее эффективных углеродных субстратов. Грибы *Monascus* выращивали в средах с разными источниками углерода: сахароза, мальтоза, глицерин, лактоза, глюкоза и т.д. При использовании глицерина *M. purpureus* продуцировал значительные количества желтых и красных пигментов, количество которых увеличивалось с повышением концентрации субстрата (Shi et al., 2021). На уровне экспрессии генов по-

казано, что это связано с образованием в процессе гликолиза и метаболизма углерода большого количества предшественников, участвующих в биосинтезе пигментов. При этом биомасса грибов и биосинтез пигментов штаммами *Monascus* достигали максимальных значений при отношении углерода к азоту 9 : 1. Продукция пигментов и условия проведения процесса сильно зависят от того, осуществляется ли культивирование в жидкой среде или на твердом субстрате (Johns, Stuart, 1991; Embaby et al., 2018). Другим важным подходом является удешевление себестоимости конечной продукции за счет использования максимально дешевых субстратов – отходов сельского хозяйства и связанных с ним производств (Bühler et al., 2013; Liu et al., 2020; Asghari et al., 2021; Chen et al., 2021).

Производство пигментов определенной цветовой гаммы выгодно, поскольку это устраняет этапы разделения пигментов нужного цвета на стадии очистки и выделения. Поэтому еще одним подходом является получение на стадии культивирования чистых экстрактов, преимущественно одного цвета, содержащих меньшее количество ненужных веществ (Venil et al., 2020). Цвет пигментов, продуцируемых грибами, зависит от источника азота и рН среды (Shi et al., 2015). У *Monascus* нитратная форма азота способствовала образованию только оранжевых и желтых пигментов. Аммонийная форма азота, аминокислоты, первичные амины, аминоксахара и др. были наиболее благоприятны для биосинтеза красных пигментов у *Monascus*, *Talaromyces* и *Aspergillus* (Pimenta et al., 2020). Показано, что цвет и продукция пигментов, продуцируемых грибами, зависит от рН среды культивирования. Наибольшая продукция красных и желтых пигментов *M. purpureus* была получена при исходной величине рН 5.0 (Agboyibor et al., 2019). В кислых условиях у *M. ruber* и *M. anka* были получены преимущественно оранжевые и желтые компоненты (Li et al., 2019). Пигменты с различными оттенками синтезировались *T. amestolkiae* DPUA 1275 в зависимости от начального значения рН среды. В нейтральных и щелочных условиях синтезировались темно-желтые пигменты, а пигменты темно-красного цвета были получены в кислых условиях (Oliveira et al., 2019).

Интересным направлением биотехнологических исследований являются работы по стимулированию образования пигментов грибами при окислительном стрессе. В качестве мягко воздействующего фактора рассматривают облучение голубой или даже ультрафиолетовой частью спектра (Chen et al., 2017). По данным (Huang et al., 2017) при окислительном стрессе, вызванном H_2O_2 , наблюдалось увеличение накопления водорастворимого желтого пигмента. Авторы показали, что это повышение происходило за счет усиления экспрес-

сии соответствующих генов и за счет увеличения количества предшественников биосинтеза пигмента. Сходным примером в развитии метода стимуляции образования пигментов окислителями является работа, где добавление в среду перекисных солей увеличивало продукцию каротиноидных пигментов у принципиально другой группы грибов (красных дрожжей *Rhodospiridium sphaerocarum* и *R. diobovatum*) на 130–140% по сравнению с контролем (Ячкула и соавт., 2021). Стратегии кофакторной метаболической инженерии, такие как добавление экзогенных кофакторов, обеспечение электролитной стимуляции во время погруженного культивирования, инактивация NADH-хиноноксидоредуктазы у *M. purpureus* увеличивало образование желтого пигмента (Liu et al., 2021).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Азафилоновые пигменты грибов *Monascus* могут широко применяться в пищевой, косметической, медицинской и текстильной промышленности в качестве безвредных натуральных красителей. Более того, многие из этих соединений и их производных обладают функциональной физиологической активностью и могут стать отличным ресурсом для проектирования и разработки новых терапевтических средств в будущем. В качестве альтернативных источников монаскоподобных пигментов, помимо представителей рода *Monascus*, в обзоре рассмотрены грибы *Talaromyces* и *A. cavernicola*, которые не синтезируют микотоксин (цитринин) и могут безопасно использоваться в крупномасштабном производстве.

Показано, что в результате простой реакции нуклеофильного замещения в оранжевых пигментах с соответствующими аминами можно получить разнообразные красные пигменты, в том числе такие, которые обладают не только улучшенными характеристиками для использования в качестве пищевых красителей (лучшей растворимостью, фотостабильностью и др.), но и большей функциональной активностью для их возможного терапевтического применения. В связи с этим разработка и конструирование новых пигментов для новых стратегий лечения болезней, в особенности онкологических, должны быть ориентированы на детальное определение химической структуры и механизма действия, лежащего в основе фармакологической активности.

Биотехнологические исследования последних десятилетий выявили несколько факторов, влияющих на процесс получения азафилоновых пигментов грибами. Подбор подходящих условий для культивирования, например, источников азота и pH среды культивирования, позволяет задавать соотношения продуцируемых красных и желтых пигментов. Использование дешевого растительного сырья или его отходов позволяет существен-

но снижать себестоимость продукции. В целом, грибы, продуцирующие азафилоновые соединения, являются надежной промышленной основой для эффективного биосинтеза пигментов определенной цветовой гаммы.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Статья не содержит материалов, полученных с использованием животных в качестве объектов исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Рысцов Г.К., Антипова Т.В., Зайцев К.В., Земскова М.Ю. Противоопухолевая активность монасникотиновой кислоты, выделенной из гриба *Aspergillus cavernicola* // Биоорганическая химия. 2021. Т. 47. Р. 162–172.
- Rystsov G.K., Antipova T.V., Zaitsev K.V., Zemskova M.Y. Antitumor activity of monasnicotinic acid isolated from the fungus *Aspergillus cavernicola* // Russ. J. Bioorg. Chem. (Moscow). 2021. V. 47. P. 307–316.
<https://doi.org/10.1134/S1068162021010209>
- Ячкула А.А., Делеган Я.А., Антипова Т.В., Вайнштейн М.Б. Действие персульфатов на накопление красных каротиноидов в культурах дрожжей: *Rhodospiridium sphaerocarum*, *R. diobovatum* и *Rhodotorula glutinis* // Биотехнология. 2021. Т. 37. № 3. С. 20–28.
<https://doi.org/10.21519/0234-2758-2021-37-3-20-28>
- Agboyibor C., Kong W.-B., Zhang A.-M., Niu S.-Q. Nutrition regulation for the production of *Monascus* red and yellow pigment with submerged fermentation by *Monascus purpureus* // Biocatal. Agric. Biotechnol. 2019. V. 21. P. 101276.
<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101276>
- Akihisa T., Tokuda H., Ukiya M., Kiyota A., Yasukawa K., Sakamoto N., Kimura Y., Suzuki T., Takayasu J., Nishino H. Anti-tumor-initiating effects of monascin, an azaphilone pigment from the extract of *Monascus pilosus* fermented rice (red-mold rice) // Chem. Biodivers. 2005. V. 2. P. 1305–1309.
<https://doi.org/10.1002/cbdv.200590101>
- Al Reza M.S., Hasan M.M., Kamruzzaman M., Hossain M.I., Zubair M.A., Bari L., Abedin M.Z., Reza M.A., Khalid-Bin-Ferdous K.M., Haque K.M.F., Islam K., Ahmed M.U., Hossain M.K. Study of a common azo food dye in mice model: Toxicity reports and its relation to carcinogenicity // Food Sci. Nutr. 2019. V. 7. P. 667–677.
<https://doi.org/10.1002/fsn3.906>
- Antipova T.V., Zaitsev K.V., Zhrebker A.Ya., Tafeenko V.A., Baskunov B.P., Zhelifonova V.P., Ivanushkina N.E., Kononikhin A.S., Nikolaev E.N., Kozlovsky A.G. Monasnicotinic acid, a novel pyridine alkaloid of the fungus *Aspergillus cavernicola*: isolation and structure establishment // Mendeleev Commun. 2018. V. 28. № 1. P. 55–57.
<https://doi.org/10.1016/j.mencom.2018.01.018>
- Antipova T.V., Zhelifonova V., Zaitsev K.V., Zhrebker A., Baskunov B., Oprunenko Y.F. Formation of azaphilone pig-

- ments and monascinic acid by the fungus *Aspergillus cavernicola* // J. Agric. Food Chem. 2022. V. 70. P. 7122–7129.
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c01952>
- Arai T., Kojima R., Motegi Y., Kato J., Kasumi T., Ogihara J. PP-O and PP-V, *Monascus* pigment homologues, production, and phylogenetic analysis in *Penicillium purpurogenum* // Fungal Biol. 2015. V. 119. P. 1226–1236.
<https://doi.org/10.1016/j.funbio.2015.08.020>
- Asghari M., Jahadi M., Hesam F., Ghasemi-Sepro N. Optimization of *Monascus* pigment production on date waste substrates using solid state fermentation // Appl. Food Biotechnol. 2021. V. 8. P. 247–254.
<https://doi.org/10.22037/afb.v8i3.34278>
- Bakthavachalu P., Kannan S.M., Qoronfleh M.W. Food color and autism: a meta-analysis // Personalized Food Intervention and Therapy for Autism Spectrum Disorder Management. Advances in Neurobiology / Eds. Essa M.M., Qoronfleh M.W. Berlin—Heidelberg, Germany: Springer, 2020. V. 24. P. 481–504.
https://doi.org/10.1007/978-3-030-30402-7_15
- Benkhaya S., M'rabet S., El Harfi A. Classifications, properties, recent synthesis and applications of azo dyes // Heliyon. 2020. V. 6. P. e03271.
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03271>
- Blanc P.J., Loret M.O., Goma G. Production of citrinin by various species of *Monascus* // Biotechnol. Lett. 1995. V. 17. P. 291–294.
- Bühler R.M.M., Dutra A.C., Vendruscolo F., Moritz D.E., Nino J.L. *Monascus* pigment production in bioreactor using a co-product of biodiesel as substrate // Food Sci. Technol. 2013. V. 33. Suppl. 1. P. 9–13.
<https://doi.org/10.1590/S0101-20612013000500002>
- Camphausen K., Chiu H.W., Fang W.H., Chen Y.L., Wu M.D., Yuan G.F., Ho S.Y., Wang Y.J. Monascopiloin enhances the radiation sensitivity of human prostate cancer cells by stimulating endoplasmic reticulum stress and inducing autophagy // PLoS One. 2012. V. 7. P. e40462.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040462>
- Chaudhary V., Katyal P., Poonia A. K., Kaur J., Puniya A.K., Panwar H. Natural pigment from *Monascus*: the production and therapeutic significance // J. Appl. Microbiol. 2021. P. 1–21.
<https://doi.org/10.1111/jam.15308>
- Chen Ch., Tao H., Chen W., Yang B., Zhou X., Luo X., Liu Y. Recent advances in the chemistry and biology of azaphilones // RSC Adv. 2020. V. 10. P. 10197–10220.
<https://doi.org/10.1039/D0RA00894J>
- Chen W., Chen R., Liu Q., He Yi., He K., Ding X., Kang L., Guo X., Xie N., Zhou Y., Lu Y., Cox R.J., Molnár I., Li M., Shao Y., Chen F. Orange, red, yellow: biosynthesis of azaphilone pigments in *Monascus* fungi // Chem. Sci. 2017. V. 8. P. 4917–4925.
- Chen W., Feng Y., Molnár I., Chen F. Nature and nurture: confluence of pathway determinism with metabolic and chemical serendipity diversifies *Monascus azaphilone* pigments // Nat. Prod. Rep. 2019. V. 36. P. 561–572.
<https://doi.org/10.1039/c8np00060c>
- Chen W., He Y., Zhou Y., Shao Y., Feng Y., Li M., Chen F. Edible filamentous fungi from the species *Monascus*: early traditional fermentations, modern molecular biology, and future genomics // Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. 2015. V. 14. P. 555–567.
- Chen X., Yan J., Chen J., Gui R., Wu Y., Li N. Potato pomace: An efficient resource for *Monascus* pigments production through solid-state fermentation // J. Biosci. Bioeng. 2021. V. 132. P. 167–173.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2021.03.007>
- Choe D., Song S.M., Shin C.S., Johnston T.V., Ahn H.J., Kim D., Ku S. Production and characterization of anti-inflammatory *Monascus* pigment derivatives // Foods. 2020. V. 9. P. 858.
<https://doi.org/10.3390/foods9070858>
- Curtin T.P., Reilly J. Sclerotiorine, C₂₀H₂₀O₅Cl, a chlorine-containing metabolite product of *Penicillium sclerotiorin* van Beyma // Biochem. J. 1940. V. 34. P. 1418–1421.
- Dufossé L. Pigments, microbial // Encyclopedia of Microbiology (4th ed). 2019. P. 579–594.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.13091-2>
- Embaby A.M., Hussein M.N., Hussein A. *Monascus* orange and red pigments production by *Monascus purpureus* ATCC16436 through co-solid state fermentation of corn cob and glycerol: An eco-friendly environmental low cost approach // PLoS One. 2018. V. 13. P. e0207755.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207755>
- Faustino M., Veiga M., Sousa P., Costa E. M., Silva S., Pintado M. Agro-food byproducts as a new source of natural food additives // Molecules. 2019. V. 24. P. 1056.
<https://doi.org/10.3390/molecules24061056>
- Frisvad J.C., Yilmaz N., Thrane U., Rasmussen K.B., Houbraken J., Samson R.A. *Talaromyces atrovirens*, a new species efficiently producing industrially relevant red pigments // PLoS One. 2013. V. 8. P. e84102.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084102>
- Ho B.Y., Pan T.M. The *Monascus* metabolite monacolin K reduces tumor progression and metastasis of Lewis lung carcinoma cells // J. Agric. Food Chem. 2009. V. 57. P. 8258–8265.
- Hsu L.C., Hsu Y.W., Liang Y.H., Liaw C.C., Kuo Y.H., Pan T.M. Induction of apoptosis in human breast adenocarcinoma cells MCF-7 by monapurpyridine A, a new azaphilone derivative from *Monascus purpureus* NTU 568 // Molecules. 2012. V. 17. P. 664–673.
- Hsu Y.W., Hsu L.C., Chang C.L., Liang Y.H., Kuo Y.H., Pan T.M. New anti-inflammatory and anti-proliferative constituents from fermented red mold rice *Monascus purpureus* NTU 568 // Molecules. 2010. V. 15. P. 7815–7824.
- Huang T., Tan H.L., Lu F.J., Chen G., Wu Z.Q. Changing oxidoreduction potential to improve water-soluble yellow pigment production with *Monascus ruber* CGMCC 10910 // Microb. Cell Fact. 2017. V. 16. P. 208.
<https://doi.org/10.1186/s12934-017-0828-0>
- Isbrandt T., Tolborg G., Ødum A., Workman M., Larsen T.O. Atrovirens: a new subgroup of *Monascus* pigments from *Talaromyces atrovirens* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2020. V. 104. P. 615–622.
- Jackman G.B., Robertson A., Travers R.B., Whalley W.B. The chemistry of fungi. Part XXXIV. Rotiorin, a metabolite of *Penicillium sclerotiorum* van Beyma // J. Chem. Soc. 1958. V. 372. P. 1825–1832.
- Jang H., Choe D., Shin C.S. Novel derivatives of *Monascus* pigment having a high CETP inhibitory activity // Nat.

- Prod. Res. 2014. V. 28. P. 1427–1431.
<https://doi.org/10.1080/14786419.2014.905561>
- Jin Y., Cheng X., Jiang F., Guo Z., Xie J., Fu L. Application of the ultrafiltration-based LC-MS approach for screening PTP1B inhibitors from Chinese red yeast rice // *Anal. Methods*. 2016. V. 8. P. 353–361.
<https://doi.org/10.1039/C5AY01767J>
- Johns M.R., Stuart D.M. Production of pigments by *Monascus purpureus* in solid culture // *J. Ind. Microbiol.* 1991. V. 8. P. 23–28.
<https://doi.org/10.1007/BF01575587>
- Jung H., Kim C., Kim K., Shin C.S. Color characteristics of *Monascus* pigments derived by fermentation with various amino acids // *J. Agric. Food Chem.* 2003. V. 51. P. 1302–1306.
<https://doi.org/10.1021/jf0209387>
- Kalra R., Conlan X.A., Goel M. Fungi as a potential source of pigments: harnessing filamentous fungi // *Front Chem.* 2020. V. 8. P. 369.
<https://doi.org/10.3389/fchem.2020.00369>
- Kim C., Jung H., Kim Y.O., Shin S.C. Antimicrobial activities of amino acid derivatives of monascus pigments // *FEMS Microbiol. Lett.* 2006. V. 264. P. 117–124.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00451.x>
- Klimek M., Wang S., Ogunkanmi A. Safety and efficacy of red yeast rice (*Monascus purpureus*) as an alternative therapy for hyperlipidemia // *P & T*. 2009. V. 34. P. 313–327.
- Lagashetti A.C., Dufossé L., Singh S.K., Singh P.N. Fungal pigments and their prospects in different industries // *Microorganisms*. 2019. V. 7. P. 604.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms7120604>
- Lee C.L., Wen J.Y., Hsu Y.W., Pan T.M. The blood lipid regulation of *Monascus*-produced monascin and ankaflavin via the suppression of low-density lipoprotein cholesterol assembly and stimulation of apolipoprotein A1 expression in the liver // *J. Microb. Immun. Infection*. 2018. V. 51. P. 27–37.
<https://doi.org/10.1016/j.jmii.2016.06.003>
- Li L., Chen S., Gao M., Ding B., Zhang J., Zhou Y., Liu Y., Yang H., Wu Q., Chen F. Acidic conditions induce the accumulation of orange *Monascus* pigments during liquid-state fermentation of *Monascus ruber* M7 // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2019. V. 103. P. 8393–8402.
- Liu J., Luo Y., Guo T., Tang C., Chai X., Zhao W., Bai J., Lin Q. Cost-effective pigment production by *Monascus purpureus* using rice straw hydrolysate as substrate in submerged fermentation // *J. Biosci. Bioeng.* 2020. V. 129. P. 229–236.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2019.08.007>
- Liu J., Wu J., Cai X., Zhang C., Liang Y., Lin Q. Regulation of secondary metabolite biosynthesis in *Monascus purpureus* via cofactor metabolic engineering strategies // *Food Microbiol.* 2021. V. 95. P. 103689.
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103689>
- Liu L., Wang Z. Azaphilone alkaloids: prospective source of natural food pigments // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2022. V. 106. P. 469–484.
<https://doi.org/10.1007/s00253-021-11729-6>
- Liu L., Zhao J., Huang Y., Xin Q., Wang Z. Diversifying of chemical structure of native *Monascus* pigments // *Front. Microbiol.* 2018. V. 9. P. 1–12.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03143>
- Mapari S.A., Meyer A.S., Thrane U., Frisvad J.C. Identification of potentially safe promising fungal cell factories for the production of polyketide natural food colorants using chemotaxonomic rationale // *Microb. Cell Fact.* 2009. V. 8. P. 24.
<https://doi.org/10.1186/1475-2859-8-24>
- Mapari S.A.S., Meyer A.S., Thrane U. Colorimetric characterization for comparative analysis of fungal pigments and natural food colorants // *J. Agric. Food Chem.* 2006. V. 54. P. 7028–7035.
<https://doi.org/10.1021/jf062094n>
- Martínková L., Jzlová P., Veselý D. Biological activity of polyketide pigments produced by the fungus *Monascus* // *J. Appl. Microbiol.* 2008. V. 79. № 6. P. 609–616.
- Morales-Oyervides L., Ruiz-Sánchez J.P., Oliveira J.C., Sousa-Gallagher M.J., Méndez-Zavala A., Giuffrida D., Dufossé L., Montañez J. Biotechnological approaches for the production of natural colorants by *Talaromyces/Penicillium*: a review // *Biotechnol. Adv.* 2020. V. 43. P. 107601.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107601>
- Ogihara J., Kato J., Oishia K., Fujimoto Y. Biosynthesis of PP-V, a monascorbamine homologue, by *Penicillium* sp. AZ // *J. Biosci. Bioeng.* 2000. V. 90. P. 678–680.
[https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(00\)90017-3](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(00)90017-3)
- Oliveira F., Pedrolli D.B., Teixeira M.F.S., Ebinuma V.C.S. Water-soluble fluorescent red colorant production by *Talaromyces amestolkiae* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2019. V. 103. P. 6529–6541.
- Osmanova N., Schultze W., Ayoub N. Azaphilones: a class of fungal metabolites with diverse biological activities // *Phytochem. Rev.* 2010. V. 9. P. 315–342.
<https://doi.org/10.1007/s11101-010-9171-3>
- Patakova P. *Monascus* secondary metabolites: production and biological activity // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2013. V. 40. P. 169–181.
<https://doi.org/10.1007/s10295-012-1216-8>
- Pavesi C., Flon V., Mann S., Leleu S., Prado S., Franck X. Biosynthesis of azaphilones: a review // *Nat. Prod. Rep.* 2021. V. 38. P. 1058–1071.
<https://doi.org/10.1039/D0NP00080A>
- Petersen T.I., Kroll-Moller P., Larsen T.O., Ødum A.S.R. A novel class of pigments in *Aspergillus* // *Patent Application WO 2020/094830 A1*, 2020.
- Pimenta L.P.C., Gomes D.C., Cardoso P.G., Takahashi J.A. Recent findings in azaphilone pigments // *J. Fungi*. 2021. V. 7. P. 541.
<https://doi.org/10.3390/jof7070541>
- Sabater-Vilar M., Maas R.F.M., Fink-Gremmels J. Mutagenicity of commercial *Monascus* fermentation products and the role of citrinin contamination // *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 1999. V. 444. P. 7–16.
[https://doi.org/10.1016/s1383-5718\(99\)00095-9](https://doi.org/10.1016/s1383-5718(99)00095-9)
- Shi J., Zhao W., Lu J., Wang W., Yu X., Feng Y. Insight into *Monascus* pigments production promoted by glycerol based on physiological and transcriptome analyses // *Proc. Biochem.* 2021. V. 102. P. 141–149.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.12.006>
- Shi K., Song D., Chen G., Pistolozzi M., Wu Z., Quan L. Controlling composition and color characteristics of *Monascus* pigments by pH and nitrogen sources in submerged fermentation // *J. Biosci. Bioeng.* 2015. V. 120. P. 145–154.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2015.01.001>

- Shi Y.C., Pan T.M. Beneficial effects of *Monascus purpureus* NTU 568-fermented products: a review // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2011. V. 90. P. 1207–1217.
https://doi.org/10.1007/s00253-011-3202-x
- Su N.W., Lin Y.L., Lee M.H., Ho C.Y. Ankaflavin from *Monascus*-fermented red rice exhibits selective cytotoxic effect and induces cell death on Hep G2 cells // J. Agric. Food Chem. 2005. V. 53. P. 1949–1954.
- Sun J.M., Kim S.J., Kim G.W., Rhee J.K., Kim N.D., Jung H., Jeun J., Lee S.H., Han S.H., Shin C.S., Oh J.W. Inhibition of hepatitis C virus replication by *Monascus* pigment derivatives that interfere with viral RNA polymerase activity and the mevalonate biosynthesis pathway // J. Antimicrob. Chemother. 2012. V. 67. P. 49–58.
https://doi.org/10.1093/jac/dkr432
- Tan H., Xing Z., Chen G., Tian X., Wu Z. Evaluating antitumor and antioxidant activities of yellow *Monascus* pigments from *Monascus ruber* fermentation // Molecules. 2018. V. 23. P. 3242.
https://doi.org/10.3390/molecules23123242
- Tuli H.S., Chaudhary P., Beniwal V., Sharma A.K. Microbial pigments as natural color sources: current trends and future perspectives // J. Food Sci. Technol. 2015. V. 52. P. 4669–4678.
https://doi.org/10.1007/s13197-014-1601-6
- Vendruscolo F., Bühler R.M.M., Carvalho J.C., Oliveira D., Moritz D.E., Schmidell W., Ninow J.L. *Monascus*: a reality on the production and application of microbial pigments // Appl. Biochem. Biotechnol. 2016. V. 178. P. 211–223.
https://doi.org/10.1007/s12010-015-1880-z
- Venil C.K., Velmurugan P., Dufossé L., Devi P.R., Ravi A.V. Fungal pigments: potential coloring compounds for wide ranging applications in textile dyeing // J. Fungi. 2020. V. 6. P. 68.
https://doi.org/10.3390/jof6020068
- Wong H.C., Koehler P.E. Production of water-soluble *Monascus* pigments // J. Food Sci. 1983. V. 48. P. 1200–1203.
https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1983.tb09191.x
- Woo P.C., Lam C.W., Tam E.W.T., Lee K.C., Yung K.K.Y., Leung C.K.F., Sze K.H., Lau S.K.P., Yuen K.Y. The biosynthetic pathway for a thousand-year-old natural food colorant and citrinin in *Penicillium marneffeii* // Sci. Rep. 2014. V. 4. P. 6728.
https://doi.org/10.1038/srep06728
- Wu M.D., Cheng M.J., Yech Y.J., Chen Y.L., Chen K.P., Chen I.Sh., Yang P.Hs., Yuan G.F. Monasnicotines A–D, four new pyridine alkaloids from the fungal strain *Monascus pilosus* BCRC 38093 // Molecules. 2011. V. 16. P. 4719–4727.
https://doi.org/10.3390/molecules16064719
- Wu S., Liu L., Zhang X., Wang Z. Submerged culture of *Penicillium sclerotiorum* for production of rotiorin alkaloids by using biosynthetic and chemical catalytic cascade reactions // Proc. Biochem. 2021. V. 104. P. 10–18.
- Zheng Y., Zhang Y., Chen D., Chen H., Lin L., Zheng C., Guo Y. *Monascus* pigment rubropunctatin: a potential dual agent for cancer chemotherapy and phototherapy // J. Agric. Food Chem. 2016. V. 64. P. 2541–2548.
https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b05343

Fungal Azaphilone Pigments as Promising Natural Colorants

T. V. Antipova^{1, *}, V. P. Zhelifonova¹, K. V. Zaitsev², and M. B. Vainshtein¹

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

²Department of Chemistry, Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: tantipova@ibpm.pushchino.ru

Received May 23, 2022; revised June 23, 2022; accepted June 23, 2022

Abstract—Microscopic fungi form and excrete numerous and diverse secondary metabolites, including pigments of various colors, which may be used as an alternative to chemical and plant colorants used in industry. Azaphilone compounds, first discovered in fungi of the genus *Monascus*, are among the promising classes of fungal pigments. The review analyzes the publications on formation of azaphilone-type pigments in *Monascus* fungi, as well as in *Talaromyces* and *Aspergillus cavernicola*. Brief information is provided concerning the antimicrobial, antitumor, anti-inflammatory, and hypolipidemic activities of azaphilone pigments. Possible strategies for increasing the efficiency of the production process and directed synthesis of yellow, orange, and red pigments and their derivatives are discussed. In general, the review provides for assessment of the role of azaphilone pigments, as well as of the prospects and ways to expand their production for use as natural dyes in various fields.

Keywords: azaphilone pigments, fungi, *Monascus*, *Aspergillus cavernicola*, food colorants

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИ

***SULFUROSPIRILLUM TAMANENSIS* SP. NOV. – ФАКУЛЬТАТИВНО
АНАЭРОБНАЯ АЛКАЛИФИЛЬНАЯ БАКТЕРИЯ ИЗ НАЗЕМНОГО
ГРЯЗЕВОГО ВУЛКАНА**

© 2023 г. А. А. Фролова^а*, А. Ю. Меркель^а, В. В. Кевбрин^а, Д. С. Копицын^б, А. И. Слободкин^а

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

^бРГУ нефти и газа им. И.М. Губкина, Москва, 119991 Россия

*e-mail: romana2804@gmail.com

Поступила в редакцию 15.07.2022 г.

После доработки 27.07.2022 г.

Принята к публикации 29.07.2022 г.

Из наземного грязевого вулкана Таманского полуострова выделена алкалифильная факультативно анаэробная бактерия (штамм T05b^T). Клетки изолята представляют собой подвижные спириллы толщиной 0.5 мкм и длиной 1.5–2.5 мкм. Штамм T05b^T растет при температуре 6–42°C (оптимум – 30°C), pH 8.0–11.0 (оптимум – 9.0), концентрации NaCl 0–14% (вес/об.); использует лактат, формиат, малат, пируват, молекулярный водород, элементную серу, сульфит, тиосульфат и сульфид в качестве донора электронов и нитрат, фумарат, элементную серу, сульфит, тиосульфат, ДМСО, арсенат и кислород в качестве акцептора электронов. Продуктом восстановления нитрата является аммоний. Сбраживает малат, пируват, фумарат. Способен к микроаэробному (до 3% O₂, об./об.) росту. Штамм T05b^T не использует сульфат и Fe(III) в качестве акцептора электронов, не диспропорционирует элементную серу, тиосульфат и сульфит и не сбраживает глюкозу, фруктозу, сахарозу, лактат, формиат, малеинат, дрожжевой экстракт и пептон. В жирнокислотном составе клеток преобладают C16:1 ω7 (45.9%), C16:0 (25.8%) и C18:1 ω7 (20.9%). Геном штамма T05b^T имеет размер 2.46 Мп и содержание Г + Ц 45.5%. В геноме содержатся гены, кодирующие ферменты энергетического метаболизма: периплазматический комплекс нитратредуктазы Nap, тиосульфат/полисульфид редуктазу Phs/Psr, сульфид:хинон оксидоредуктазу Sqr и дыхательную арсенатредуктазу Arr. Анализ нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК штамма T05b^T показал 98.61% сходства с типовым штаммом *Sulfurospirillum alkalitolerans* (филум “*Campylobacterota*”). На основании фенотипических характеристик и данных филогенетического анализа предлагается отнести данный изолят к новому виду рода *Sulfurospirillum*, как *Sulfurospirillum tamanensis* sp. nov. с типовым штаммом T05b^T (=DSM 112596^T = VKM B-3538^T).

Ключевые слова: алкалифил, анаэробные бактерии, грязевой вулкан, восстановление нитрата, *Campylobacterota*

DOI: 10.31857/S0026365622600560, **EDN:** NLZORV

Грязевые вулканы – это геологические структуры, образованные выбросами частиц глины, брекчий, жидкостей и газов из глубоких осадочных слоев. Грязевой вулканизм играет существенную роль в балансе метана в атмосфере (Mazzini, Etiore, 2017). Наземные грязевые вулканы геологически связаны с подземными залежами нефти и природного газа и содержат различные неорганические и органические соединения, которые могут использоваться в качестве доноров и акцепторов электронов в микробном метаболизме. Вероятно, этим объясняется значительное филогенетическое разнообразие микроорганизмов, как детектированных молекулярными методами (Cheng et al., 2012; Yang et al., 2012; Merkel et al., 2021), так и выделенных в чистые культуры из наземных грязевых вул-

канов (Alain et al., 2006; Kokoschka et al., 2015; Khomyakova et al., 2020; Ratnikova et al., 2020; Slobochkina et al., 2020; Frolova et al., 2021a, 2021b).

Таманский полуостров является одним из регионов с наиболее интенсивным грязевым вулканизмом. Керченско-Таманская грязевулканическая провинция насчитывает свыше 100 действующих наземных грязевых вулканов (Шнюков и соавт., 1986; Холодов и соавт., 2012). Флюиды многих из этих вулканов имеют pH > 8.5, что способствует развитию алкалифильных микроорганизмов. Алкалифильные анаэробные бактерии, принадлежащие к разным филогенетическим группам, обладают значительным биотехнологическим потенциалом и населяют различные природные и антропогенные среды (Sorokin et al., 2014; Preiss et al., 2015), но раз-

нообразии алкалофильных анаэробов в наземных грязевых вулканах изучено слабо.

В настоящей работе приводится описание штамма факультативно анаэробного алкалофильного микроорганизма, выделенного из наземного грязевого вулкана полуострова Тамань и отнесенного нами к новому виду рода *Sulfurospirillum*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Источник выделения. Образец грязевулканического флюида, содержащего твердую и жидкую фракции, был отобран в мае 2017 г. из активного грифона наземного грязевого вулкана Гнилая Гора (Таманский полуостров, Краснодарский край, РФ). GPS координаты – 45.251° N, 37.436° E. Температура в месте отбора проб составляла 21°C, pH 8.5, концентрация Cl⁻ – 15.7 мМ, концентрация SO₄²⁻ – 5.3 мМ. Образец был отобран анаэробно в пластиковую пробирку с плотно закручивающейся крышкой и в таком виде перевезен в лабораторию для дальнейших экспериментов.

Среды и культивирование. Для выделения и рутинного культивирования штамма T05b^T использовали анаэробную восстановленную солоноватую среду следующего состава (на 1 л дистиллированной воды): 0.33 г KН₂РO₄, 0.33 г NH₄Cl, 0.33 г KCl, 0.33 г CaCl₂ · 6H₂O, 2.00 г NaHCO₃, 0.33 г MgCl₂ · 6H₂O, 10.00 г NaCl, 0.66 г Na₂S · 9H₂O, 0.001 г резазурин, 1 мл витаминов (Wolin et al., 1963) и 1 мл микроэлементов (Slobodkin et al., 2012). Среду готовили кипячением и охлаждением под непрерывным током N₂, после чего добавляли восстанавливающий агент (Na₂S · 9H₂O). Приготовленную среду разливали по 10 мл в пробирки Хангейта объемом 17 мл и автоклавировали при 121°C в течение 60 мин. После стерилизации pH среды был 9.0. Нитрат калия (10 мМ) и лактат натрия (10 мМ) добавляли из стерильных концентрированных растворов перед инокуляцией образца.

Фенотипические характеристики. Изучение морфологии и подвижности клеток проводили в жидкой среде после 48 ч инкубации, используя микроскоп Zeiss Primo Star с фазово-контрастным устройством. Ростовые эксперименты проводились в трехкратной повторности. Для морфологической, физиологической и метаболической характеристики штамм T05b^T культивировали на среде, применявшейся для выделения, пока не указано иное. Определение диапазонов температуры, pH и солёности проводились на восстановленной среде с лактатом и нитратом. Диапазоны солёности измеряли при концентрации NaCl 0–15% (вес/об.). Различные значения pH создавали путем внесения в отдельные пробирки стерильных растворов 3 М HCl или 10% NaOH. Эксперименты с серосо-

держащими соединениями и кислородом проводили на невосстановленной среде.

Состав клеточных жирных кислот. Состав жирных кислот определяли, как указано ранее (Slobodkina et al., 2020), используя прямое метилирование лиофильно высушенной биомассы бактерий и хромато-масс-спектрометрический анализ; содержание определяли по методу внутренней нормализации по площади пиков полного ионного тока метиловых эфиров жирных кислот.

Выделение ДНК, секвенирование и анализ полного генома. Выделение ДНК для определения нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК и полногеномного секвенирования проводили с помощью FastDNA Spin Kit (“MP Bio”), следуя протоколу производителя. Ген 16S рРНК амплифицировали, используя универсальные бактериальные праймеры 27F, 357F, 530F, 1114F, 342R, 519R и 1492R (Weisburg et al., 1991). Секвенирование продуктов ПЦР проводили методом Сэнгера. Предварительный филогенетический скрининг сходства последовательностей генов 16S рРНК проводили по базе данных GenBank (Benson et al., 1999) с помощью программы BLAST (Altschul et al., 1990). Для более точного определения филогенетического положения изолята нуклеотидную последовательность гена 16S рРНК выравнивали с последовательностями референтных штаммов ближайших родственных микроорганизмов с помощью программы Clustal W (Thompson, 1997). Филогенетический анализ выполняли при помощи программы MEGA 7.0 (Kumar et al., 2016). Статистическую достоверность ветвления оценивали с помощью “bootstrap-анализа” 1000 альтернативных филограм (Felsenstein, 1985), построенных методами, входящими в пакет программ для филогенетического анализа MEGA 7.

Геном штамма T05b^T секвенировали, используя систему MiSeq (“Illumina”, San Diego, California, США). Поиск генов и аннотацию проводили с использованием сервера RAST (Brettin et al., 2015). Средство просмотра SEED использовалось для распределения предсказанных генов по категориям подсистем (Overbeek et al., 2014).

Нуклеотидная последовательность гена 16S рРНК штамма T05b^T депонирована в GenBank/EMBL под номером MW872671.

Полногеномная последовательность штамма T05b^T депонирована в GenBank/EMBL под номером JAFHKK010000000.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Получение чистой культуры. Накопительные культуры были получены путем внесения природного образца (около 10%, об.) в стерильную анаэробную среду, содержащую лактат и нитрат. После инкубации накопительных культур при

Таблица 1. Использование доноров и акцепторов электронов штаммом T05b^T

Акцептор/донор	Лактат	Формиат	Малат	Пируват	Водород	Элементная сера	Сульфит	Тиосульфат	Сульфид
Нитрат	+	–	+	–	–	+	+	+	+
Фумарат	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Элементная сера	+	–	+	+	–	–	–	–	–
Сульфит	+	–	–	–	–	–	–	–	–
Тиосульфат	–	–	–	+	–	–	–	–	–
ДМСО	+	–	–	+	–	–	–	–	–
Арсенат	+	+	+	+	–	–	–	–	–
Кислород	+	–	+	+	–	–	–	–	–

Примечание. (+) – рост $>2 \times 10^6$ кл./мл. (–) – отсутствие роста. Концентрация всех растворимых доноров и акцепторов – 10 мМ. Элементная сера – 5 г/л, ДМСО – 10%, кислород – 3% (об./об.) в газовой фазе, водород – 80% (об./об.) в газовой фазе. * В присутствии малата или сукцината как источника углерода.

30°C в течение 2 сут, наблюдался значительный микробный рост. После трех последовательных пересевов (5%, об.) культуру рассеивали методом 10-кратных серийных разведений на жидкой среде того же состава. В последнем разведении, показавшем рост (10^{-9}), наблюдался только один морфологический тип клеток. Десятикратные разведения были повторены еще дважды, и культура, выросшая в последнем разведении, получила обозначение штамм T05b^T. Результаты секвенирования гена 16S рРНК подтвердили чистоту культуры. Попытки получить рост колоний в анаэробных условиях на твердой среде методом roll-tube или в толще 1% Gelrite gellan gum или 1% агара, не привели к положительным результатам.

Клетки штамма T05b^T представляют собой спириллы толщиной 0.5 мкм и длиной 1.5–2.5 мкм, растущие одиночно или парами; подвижны за счет одиночного полярного жгутика. Образование эндоспор не наблюдалось на протяжении 30 сут культивирования.

Физиология роста. Штамм T05b^T способен расти при температурах от 10 до 42°C, с оптимумом при 30°C. Рост не наблюдался при 50°C и выше и при 6°C и ниже при инкубации в течение 20 сут. Диапазон рН для роста составляет 8.0–11.0 (оптимум 9.0), роста не отмечалось при рН 7.5 и ниже или 11.5 и выше. Штамм T05b^T способен расти при концентрации NaCl в среде от 0 до 14.0% (вес/об.); при 15% NaCl и выше роста не происходило.

Доноры и акцепторы электронов. Штамм T05b^T способен использовать широкий спектр органических и неорганических соединений в качестве доноров и акцепторов электронов для роста (табл. 1). Добавление дрожжевого экстракта (0.2 г/л) не стимулировало рост. Максимальная концентрация клеток (около 7×10^7 кл./мл) наблюдалась при росте с лактатом. Водород использовался только с

фумаратом, в этих условиях штамм T05b^T не нуждался в дополнительном источнике углерода для роста. Элементная сера, тиосульфат и сульфит могут быть использованы в качестве доноров электронов с нитратом или фумаратом в качестве акцептора. Восстановление нитрата с соединениями серы требует присутствия малата или сукцината как источника углерода, причем рост с сульфитом был значительно лучше, чем с элементной серой или тиосульфатом. Сульфид (в концентрациях до 5 мМ) использовался в качестве донора электронов для восстановления малата, фумарата (10 мМ каждый) и нитрата (1 мМ) без добавления дополнительных источников углерода с образованием элементной серы, сукцината и ацетата (в соотношении 5 : 1 при росте с малатом и 6.7 : 1 при росте с фумаратом). Продуктом восстановления нитрата со всеми протестированными донорами электронов является аммоний. Штамм T05b^T способен к дисмутации малата и фумарата. Основными продуктами дисмутации малата и фумарата являются сукцинат и ацетат. Соотношение сукцинат/ацетат при сбраживании малата составило 2.2, а при сбраживании фумарата 4.6. Штамм T05b^T способен к росту в микроаэробных (до 3% кислорода) условиях; роста при концентрации кислорода выше 3% или в аэробных условиях не наблюдалось при культивировании в течение трех недель.

Штамм T05b^T не использует сульфат (10 мМ) и ферригидрит (слабокристаллический оксид Fe(III), 90 мМ) в качестве акцепторов электронов с протестированными донорами электронов и не способен к диспропорционированию элементной серы, тиосульфата и сульфита. Штамм T05b^T не способен к сбраживанию глюкозы, фруктозы, сахарозы, лактата, формиата, малеината (каждый субстрат 10 мМ), дрожжевого экстракта (1 г/л) и пептона (2.5 г/л).

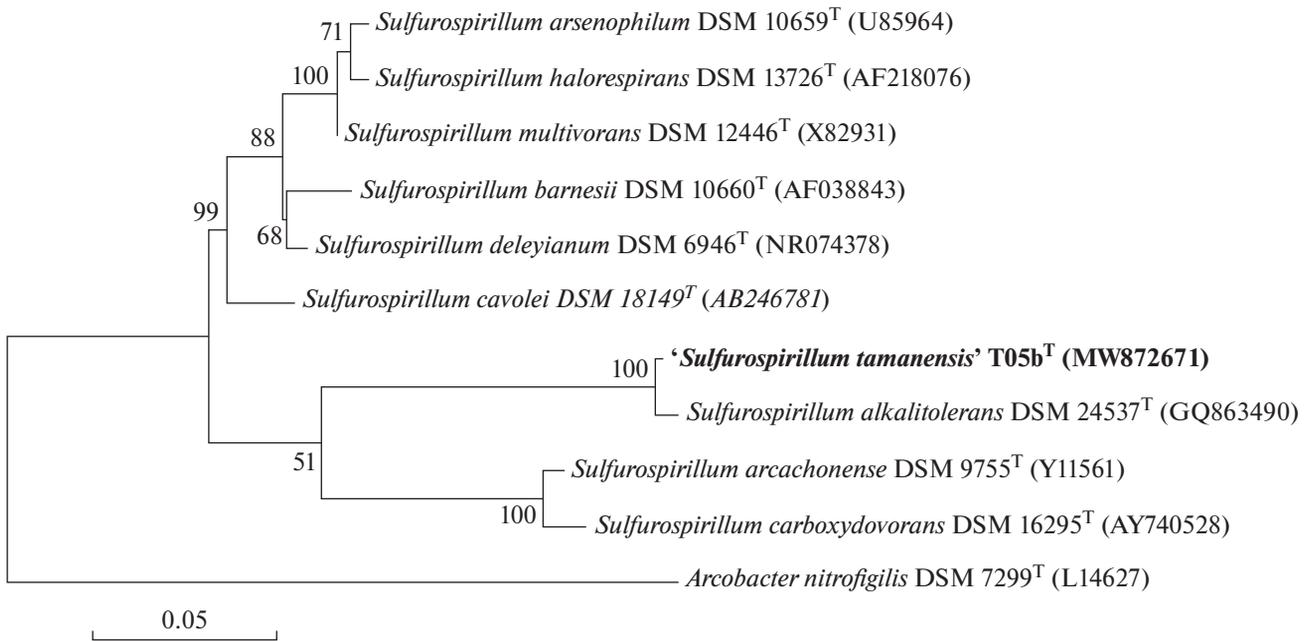


Рис. 1. Филогенетическое дерево, основанное на последовательностях гена 16S рРНК, показывающее положение штамма Т05b^T и родственных ему микроорганизмов. Дерево было реконструировано методом maximum-likelihood. Деревья, построенные с помощью алгоритмов neighbor-joining и minimum-evolution, отображали одинаковую топологию. Каждое число указывает значение начальной загрузки из 1000 повторностей. Масштабная метка – 0.020 замен на нуклеотидное положение. Идентификационные номера GenBank указаны в скобках.

Состав клеточных жирных кислот. Клеточные жирные кислоты штамма Т05b^T были представлены смесью неразветвленных насыщенных и ненасыщенных кислот: С16:1ω7 (45.9%), С16:0 (25.8%) и С18:1 ω7 (20.9%). Также были обнаружены С14:1 ω7 (3.1%), С14:0 (1.9%), С15:0 (0.3%), С16:1 ω5 (0.7%) и С18:0 (1.4%).

Филогения. Нуклеотидные последовательности гена 16S рРНК штамма Т05b^T, полученные путем амплификации с универсальными бактериальными праймерами и в ходе полногеномного секвенирования, были идентичны. Сравнение 1473 нуклеотидов последовательности гена 16S рРНК штамма Т05b^T с нуклеотидными последовательностями, размещенными в базе данных GenBank (Benson et al., 1999) показали, что изолят принадлежит к роду *Sulfulospirillum* класса *Epsilonproteobacteria* с 98.61% сходства с геном 16S рРНК с *S. alkalitolerans* (Sorokin et al., 2013). Реконструкция филогенетического дерева гена 16S рРНК показала, что штамм Т05b^T представляет собой монофилетическую ветвь, четко отделенную от наиболее близких видов (рис.1).

Общие характеристики генома. Геном штамма Т05b^T, собранный из 63 контигов, имеет общую длину 2456696 нт и значение N50 73734 нт. Содержание Г + Ц геномной ДНК составляет 45.5%. Геном содержит 2568 нуклеотидных последовательностей кодирующих белки и 39 генов РНК. Большинство

аннотированных генов отвечает за синтез аминокислот и производных (182), метаболизм белков (104), дыхание (93), кофакторы, витамины, простетические группы и образование пигментов (86).

Углеродный метаболизм. В отличие от других представителей рода *Sulfulospirillum* (Ross et al., 2016), геном штамма Т05b^T не содержит полного набора генов цикла трикарбоновых кислот. Однако функцию отсутствующей малатдегидрогеназы может выполнять мембранно-связанная малат:хинон оксидоредуктаза (WP_205459850), которая содержит ФАД в качестве кофактора и отдает электроны хинонам, которые впоследствии окисляются компонентами электрон-транспортной цепи (Kather et al., 2000). Геном штамма Т05b^T содержит гены фумаратгидратазы I типа (WP_205460080), что является характерным для рода *Sulfulospirillum* (Ross et al., 2016). Гены пируваткарбоксилазы, присутствующие у всех представителей рода *Sulfulospirillum*, в геноме штамма Т05b^T отсутствуют. Превращение пирувата в оксалоацетат происходит, по-видимому, с помощью оксалоацетатдекарбоксилазы (WP_205458054–WP_205458055). Наличие всех генов фосфатацетилтрансферазного/ацетаткиназного пути, вероятно, позволяет штамму Т05b^T использовать лактат в качестве донора электронов, превращая ацетат в ацетил-КоА.

Геном штамма Т05b^T содержит все гены неокислительной части пентозофосфатного пути,

что является характерным для всех представителей рода *Sulfurospirillum* (Ross et al., 2016), а также все гены нефосфорилирующего пути Энтнера–Дудорова.

Сопряжение окисления органических субстратов с цепью переноса электронов происходит через респираторный комплекс I. Геном штамма T05b^T кодирует два типа НАДН:хиноноксидоредуктазоподобных комплексов: комплекс ϵ -протеобактериального типа (WP_205458496–WP_205458507), который может связывать окисление пирувата с цепью переноса электронов, используя ферредоксин/флаводоксин в качестве переносчика электронов, и комплекс с высокой степенью схожести с *nuoEF E. coli* (WP_205457951–WP_205457964), который может связывать множественные дегидрогеназы с цепью переноса электронов (Goris et al., 2014). Наличие комплекса ϵ -протеобактериального типа (ϵ -NADH I) характерно для всех представителей рода *Sulfurospirillum* (Ross et al., 2016).

Азотный метаболизм. Геном штамма T05b^T содержит генный кластер, кодирующий дыхательный периплазматический комплекс нитратредуктазы Nar типа – *narAGHBFLD* (WP_205459257–WP_205459263), характерный для *Epsilonproteobacteria* (Simon et al., 2003), и расположенный рядом с ним генный кластер нитритредуктазы *nrfHAIJ* (WP_205459266–WP_205459269). Гены редуктаз, восстанавливающих оксид азота и закись азота (*nor* и *nos*), в геноме штамма T05b^T отсутствуют. Наиболее вероятно, что штамм T05b^T осуществляет диссимиляционное восстановление нитрата с образованием аммония за счет канонических ферментативных систем Nar и Nrf типа.

В геноме штамма T05b^T закодированы все компоненты нитрогеназного комплекса для фиксации молекулярного азота *nifHDKE* (WP_205459985–WP_205459999).

Серный метаболизм. Геном штамма T05b^T не содержит генов диссимиляционной сульфитредуктазы Dsr типа и окисляющих серные соединения белков Sox. Возможно, окисление элементарной серы и тиосульфата происходит с участием серии ферментов, включающих роданазу и Hdr-подобный комплекс (Zhang et al., 2021); биохимия и генетические детерминанты этих метаболических путей в настоящее время изучены недостаточно. В щелочных условиях вероятно также окисление S⁰, связанное с образованием растворимых полисульфидов (Ghosh, Dam, 2009). Способность изолята восстанавливать тиосульфат и элементарную серу, вероятно, вызвана активностью тиосульфат/полисульфид редуктазы Phs/Psr, три субъединицы которой (PhsABC) закодированы в генном кластере WP_205459460–WP_205459462. Окисление сульфида, возможно, осуществляется сульфид:хинон оксидоредуктазой Sqr (WP_205458630).

Метаболизм мышьяка. Геном штамма T05b^T кодирует две ферментативные системы, восстанавливающие арсенат: Arr – для анаэробного дыхания с As(V) в качестве конечного акцептора электронов и Ars, обуславливающую устойчивость к ионам мышьяка. Субъединицы арсенатредуктазы ArrA (WP_205459496) и ArrB (WP_205459497) имеют 50 и 52% идентичности аминокислотных последовательностей с субъединицами хорошо изученной дыхательной арсенатредуктазы из *Shewanella ANA-3* (Malasarn et al., 2008). Система детоксикации мышьяка представлена опероном, состоящим из двух копий тиоредоксин-связанной арсенатредуктазы ArsC, белками устойчивости к мышьяку и арсенит/антимонит H⁺ антипортером ArrB (WP_205460022–WP_205460027).

Гидрогеназы. Геном штамма T05b^T содержит один генный кластер, кодирующий две разные NiFe гидрогеназы (WP_205458701–WP_205458715). Согласно классификатору гидрогеназ HydDB (Søndergaard et al., 2016), каталитическая единица одной из них (WP_205458711) принадлежит к [NiFe] Group 1b, которая включает дыхательные водородпоглощающие гидрогеназы, участвующие в процессах анаэробного дыхания с фумаратом, нитратом и сульфатом, и широко представленную среди *Epsilonproteobacteria*. Малая (WP_205458712) и цитохром *b*-содержащие (WP_205458710) субъединицы этой гидрогеназы обеспечивают перенос электронов к пулу хинонов. Большая субъединица второй гидрогеназы HyaB (WP_205458714) относится к [NiFe] Group 2d, которая включает дыхательные водород-поглощающие гидрогеназы, участвующие в аэробном и фумаратном дыхании. Этот тип гидрогеназ встречается у бактерий различных филогенетических групп, однако у представителей *Epsilonproteobacteria* ее функции не охарактеризованы. Малая субъединица этой гидрогеназы HyaA также закодирована в геноме (WP_205458715). Кроме этого, кластер содержит гены белков участвующих в сборке гидрогеназ *hupAEDCB*.

ОБСУЖДЕНИЕ

Штамм T05b^T выделен из наземного грязевого вулкана Таманского полуострова. Он представляет собой факультативно анаэробную алкалофильную мезофильную бактерию.

Филогенетический анализ на основе гена 16S рРНК показал, что штамм T05b^T образует отдельную линию в пределах рода *Sulfurospirillum* (Schumacher et al., 1993), относящегося к семейству *Campylobacteraceae* филума “*Campylobacterota*”. На момент публикации род *Sulfurospirillum* представлен восемью видами с валидно опубликованными именами: *S. alkalitolerans* (Sorokin et al., 2013), *S. arcachonense* (Finster et al., 1997), *S. arsenophilum*, *S. barnesii*

Таблица 2. Дифференцирующие характеристики штамма T05b^T и представителей рода *Sulfurospirillum*

Характеристика	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>T</i> опт., °C	30	Н.д. – 41 (н.д.)	Н.д. – 30 (20)	8–30 (26)	Н.д. – 30 (н.д.)	20–40 (30)	20–36 (н.д.)	Н.д. (25–30)	Н.д. (30)
pH опт.	9.0	8.5	7.0–7.4	7.5	7.5	7.0	7.1	Н.д.	7–7.5
NaCl, % (вес/объем)	0–14	3.5–10.2	0.1	0.6–4	0–0.8	<1.0	<0.2	Н.д.	Н.д.
Доноры электронов									
Сульфид	+	+	Н.д.	Н.д.	Н.д.	Н.д.	+	Н.д.	+
Лактат	+	+	+	+	+	+	–	+	+
Малат	+	–	Н.д.	+	Н.д.	+	+	Н.д.	Н.д.
Акцепторы электронов									
Тиосульфат	+	+	+	–	+	+	+	–	+
Сульфит	+	–	Н.д.	–	–	+	+	–	Н.д.
ДМСО	+	–	Н.д.	–	–	+	+	Н.д.	+
Нитрат	+	+	+	–	+	+	+	+	+
Арсенат	+	+	–	+	+	+	+	+	+
Кислород 3% (вес/объем)	+	–	–	+	+	+	+	+	Н.д.
Брожение									
Лактат	–	–	–	Н.д.	Н.д.	–	Н.д.	Н.д.	Н.д.
Малат	+	–	Н.д.	–	Н.д.	+	+	Н.д.	Н.д.
Пируват	+	+	–	Н.д.	Н.д.	+	Н.д.	+	+
Фумарат	+	+	+	+	+	+	+	+	Н.д.
Содержание Г + Ц (мол. %)	45.5	47.6	40.9	32	40.8	42.7	38.4	41.8	41.5
Источник выделения	Грязевой вулкан	Биореактор	Пресноводные отложения, загрязненные мышьяком	Морской осадок	Пресноводное болото, загрязненное селенатом	Подземные воды, загрязненные нефтью	Осадок лесного пруда	Анаэробная почва, загрязненная хлорированными алифатическими соединениями	Активный ил

Примечание. 1 – T05b^T (настоящее исследование); 2 – *S. alkalitolerans* (Sorokin et al., 2013); 3 – *S. arsenophilum* (Stolz et al., 1999); 4 – *S. arachonense* (Finster et al., 1997); 5 – *S. barnesii* (Stolz et al., 1999); 6 – *S. cavaleri* (Kodama et al., 2007); 7 – *S. deleyianum* (Schumacher et al., 1992); 8 – *S. halorespirans* (Luijten et al., 2003); 9 – *S. multivorans* (Luijten et al., 2003). Все штаммы используют водород, пируват, формиат, фумарат в качестве донора электронов и элементную серу, фумарат в качестве акцептора электронов. Ни один из штаммов не использует сульфат как акцептор электронов. Н.д. – данные в литературных источниках отсутствуют.

(Stolz et al., 1999), *S. cavolei* (Kodama et al., 2007), *S. deleyianum* (Schumacher et al., 1993), *S. halorespirans* и *S. multivorans* (Luijten et al., 2003). Согласно современной практике в систематике прокариот, для установления видовой принадлежности микроорганизма рекомендуется сравнение идентичности нуклеотидных последовательностей (ANI) и уровня ДНК–ДНК гибридизации *in silico* полных геномов. Однако сравнить геномы штамма T05b^T и его ближайшего родственника *S. alkalitolerans* (DSM 24537^T) в настоящее время не представляется возможным ввиду отсутствия данных секвенирования полного генома *S. alkalitolerans* в общедоступных базах данных. Вместе с этим, полноценным основанием для отнесения изолята к новому виду считается уровень сходства по генам 16S рРНК ниже 98.7% (Chun et al., 2018). Идентичность нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК между штаммом T05b^T и *S. alkalitolerans* (DSM 24537^T) составляет 98.61%, таким образом, штамм T05b^T может быть отнесен к новому виду рода *Sulfurospirillum*.

Представители рода *Sulfurospirillum* широко географически распространены и были обнаружены в разнообразных экосистемах, включая нефтяные месторождения, чистые и загрязненные грунтовые воды и морские метановые сипы (GBIF Secretariat (2021). GBIF Backbone Taxonomy. Checklist dataset <https://doi.org/10.15468/39omei>; Jensen, Finster, 2005; Hubert et al., 2007; Cornish Shartau et al., 2009; Rowland et al., 2009; Sercu et al., 2013). Штамм T05b^T является первым представителем рода, выделенным из наземного грязевого вулкана. Новый изолят имеет диапазоны рН, температуры и солености для роста, близкие к параметрам в его среде обитания.

Метаболический потенциал, кодируемый в геноме штамма T05b^T, соответствует фенотипическим данным. Разнообразные используемые доноров и акцепторов электронов характерно для всех видов рода *Sulfurospirillum* и для представителей “*Campylobacterota*” в целом (van der Stel et al., 2019). Дифференцирующие характеристики штамма T05b^T и членов рода *Sulfurospirillum* представлены в табл. 2. Наиболее заметными отличиями являются более высокий рН оптимум и более высокий диапазон солености для роста. Таким образом, на основании проведенных исследований мы предлагаем отнести штамм T05b^T к новому виду рода *Sulfurospirillum* – *Sulfurospirillum tamanensis* sp. nov.

Описание *Sulfurospirillum tamanensis* sp. nov.

Sulfurospirillum tamanensis
(ta.ma.nén.sis – лат. прил., обитающий на Тамани)

Клетки представляют собой подвижные спириллы, 0.5 мкм толщиной и 1.5–2.5 мкм длиной.

Рост при температуре 6–42°C (оптимум – 30°C), рН 8.0–11.0 (оптимум – 9.0), концентрации NaCl 0–14% (вес/об.); использует лактат, формиат, малат, пируват, молекулярный водород, элементную серу, сульфит, тиосульфат и сульфид в качестве донора электронов и нитрат, фумарат, элементную серу, сульфит, тиосульфат, ДМСО, арсенат и кислород в качестве акцептора электронов. Продуктом восстановления нитрата является аммоний. Сбраживает малат, пируват, фумарат. Способен к микроаэробному (до 3% O₂; об./об.) росту. Не использует сульфат и Fe(III) в качестве акцептора электронов. Не сбраживает глюкозу, фруктозу, сахарозу, лактат, формиат, малеинат, дрожжевой экстракт и пептон. Не диспропорционирует элементную серу, тиосульфат и сульфит.

Типовой штамм T05b^T (=DSM 112596^T = VKM B-3538^T) выделен из наземного грязевого вулкана полуострова Тамань. Размер генома – 2.46 Мп. Содержание Г + Ц в геномной ДНК 45.5% (полногеномное секвенирование).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФ 22-14-00011 (выделение, определение физиологических характеристик и таксономического положения изолята). Секвенирование полного генома и биоинформатический анализ проведены при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ. Состав жирных кислот определен в РГУНГ им. И.М. Губкина при поддержке гранта Президента РФ (МК-5506.2021.4).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Гнатенко Г.И., Кутный В.А., Науменко П.И., Соболевский Ю.В., Шнюков Е.Ф. Грязевые вулканы Керченско-Таманской области (атлас) // Киев: Наукова Думка, 1986. С. 149.
- Холодов В.Н. Грязевые вулканы: распространение и генезис // Геология и полезные ископаемые Мирового океана. 2012. Т. 4. С. 5–27.
- Alain K., Holler T., Musat F., Elvert M., Treude T., Krüger M. Microbiological investigation of methane- and hydrocarbon-discharging mud volcanoes in the Carpathian Mountains, Romania // Environ. Microbiol. 2006. V. 8. P. 574–590.

- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. Basic local alignment search tool // J. Mol. Biol. 1990. V. 215. P. 403–410.
- Benson D.A., Boguski M.S., Lipman D.J., Ouellette B.F.F., Rapp B.A., Wheeler D.L. GenBank // Nucleic Acids Res. 1999. V. 27. P. 12–17.
- Bonch-Osmolovskaya E.A., Sokolova T.G., Kostrikina N.A., Zavarzin G.A. *Desulfurella acetivorans* gen. nov. and sp. nov. — a new thermophilic sulfur-reducing eubacterium // Arch. Microbiol. 1990. V. 153. P. 151–155.
- Brettin T., Davis J.J., Disz T., Edwards R.A., Gerdes S., Olsen G.J., Olson R., Overbeek R., Parrello B., Pusch G.D., Shukla M., Thomason J.A., Stevens R., Vonstein V., Wattam A.R., Xia F. RASTtk: A modular and extensible implementation of the RAST algorithm for building custom annotation pipelines and annotating batches of genomes // Sci. Rep. 2015. V. 5. P. 8365.
- Cheng T.W., Chang Y.H., Tang S.L., Tseng C.H., Chiang P.W., Chang K.T., Sun C.H., Chen Y.G., Kuo H.C., Wang C.H., Chu P.H., Song S.R., Wang P.L., Lin L.H. Metabolic stratification driven by surface and subsurface interactions in a terrestrial mud volcano // ISME J. 2012. V. 6. P. 2280–2290.
- Chun J., Oren A., Ventosa A., Christensen H., Arahall D.R., da Costa M.S., Rooney A.P., Yi H., Xu X.-W., De Meyer S., Trujillo M.E. Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2018. V. 68. P. 461–466.
- Cornish Shartau S.L., Yurkiw M., Lin S., Grigoryan A.A., Lambo A., Park H.S., Lomans B.P., van der Biezen E., Jetten M.S.M., Voordouw G. Ammonium concentrations in produced waters from a mesothermic oil field subjected to nitrate injection decrease through formation of denitrifying biomass and anammox activity // Appl. Environ. Microbiol. 2010. V. 76. P. 4977–4987.
- Dimitrov L.I. Mud volcanoes — a significant source of atmospheric methane // Geo-Mar. Lett. 2003. V. 23. P. 155–161.
- Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap // Evolution. 1985. V. 39. P. 783–791.
- Finster K., Liesack W., Tindall B.J. *Sulfurospirillum archaonense* sp. nov., a new microaerophilic sulfur-reducing bacterium // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 1997. V. 47. P. 1212–1217.
- GBIF Secretariat (2021). GBIF Backbone Taxonomy. Checklist dataset. <https://doi.org/10.15468/39omei>
- Ghosh W., Dam B. Biochemistry and molecular biology of lithotrophic sulfur oxidation by taxonomically and ecologically diverse bacteria and archaea // FEMS Microbiol. Rev. 2009. V. 33. P. 999–1043.
- Goris T., Schubert T., Gadkari J., Wubet T., Tarkka M., Buscot F., Adrian L., Diekert G. Insights into organohalide respiration and the versatile catabolism of *Sulfurospirillum multivorans* gained from comparative genomics and physiological studies // Env. Microb. Special Issue: Sulfur Cycle Ecology. 2014. V. 16. I. 11. P. 3562–3580.
- Grissa I., Vergnaud G., Pourcel C. The CRISPRdb database and tools to display CRISPRs and to generate dictionaries of spacers and repeats // BMC Bioinf. 2007. V. 8. P. 172.
- Gross R., Pisa R., Sanger M., Lancaster C.R.D., Simon J. Characterization of the menaquinone reduction site in the diheme cytochrome *b* membrane anchor of *Wolinella succinogenes* NiFe-hydrogenase // J. Biol. Chem. 2004. V. 279. P. 274–281.
- Hazkani-Covo E., Graur D. A comparative analysis of numt evolution in human and chimpanzee // Mol. Biol. Evol. 2007. V. 24. P. 13–18.
- Hubert C., Voordouw G. Oil field souring control by nitrate-reducing *Sulfurospirillum* spp. that outcompete sulfate-reducing bacteria for organic electron donors // Appl. Environ. Microbiol. 2007. V. 73. P. 2644–2652.
- Jensen A., Finster K. Isolation and characterization of *Sulfurospirillum carboxydovorans* sp. nov., a new microaerophilic carbon monoxide oxidizing epsilon *Proteobacterium* // Ant. van Leeuwenhoek. 2005. V. 87. P. 339–353.
- Kather B., Stingl K., van der Rest M.E., Altendorf K., Moleenaar D. Another unusual type of citric acid cycle enzyme in *Helicobacter pylori*: the malate:quinone oxidoreductase // J. Bacteriol. 2000. V. 182. P. 3204–3209.
- 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. 2020. V. 70. P. 4914–4919.
- Kodama Y., Ha L.T., Watanabe K. *Sulfurospirillum cavolei* sp. nov., a facultatively anaerobic sulfur-reducing bacterium isolated from an underground crude oil storage cavity // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2007. V. 57. P. 827–831.
- Kokoschka S., Dreier A., Romoth K., Taviani M., Schafer N., Reitner J., Hoppert M. Isolation of anaerobic bacteria from terrestrial mud volcanoes (Salse di Nirano, Northern Apennines, Italy) // Geomicrobiol. 2015. V. 32. P. 355–364.
- 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.
- Luijten M.L., de Weert J., Smidt H., Boschker H.T., de Vos W.M., Schraa G., Stams A.J. Description of *Sulfurospirillum halo-respirans* sp. nov., an anaerobic, tetrachloroethene-respiring bacterium, and transfer of *Dehalospirillum multivorans* to the genus *Sulfurospirillum* as *Sulfurospirillum multivorans* comb. nov. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2003. V. 53. P. 787–793.
- Malasarn D., Keeffe J.R., Newman D.K. Characterization of the arsenate respiratory reductase from *Shewanella* sp. strain ANA-3 // J. Bacteriol. 2008. V. 190. P. 135–142. <https://doi.org/10.1128/JB.01110-07>
- Merkel A.Y., Chernyh N.A., Pimenov N.V., Bonch-Osmolovskaya E.A., Slobodkin A.I. Metabolic potential of the terrestrial mud volcano microbial community with a high abundance of archaea mediating the anaerobic oxidation of methane // Life. 2021. V. 11. P. 953.
- Mazzini A., Etioppe G. Mud volcanism: An updated review // Earth-Science Rev. 2017. V. 168. P. 81–112.
- Overbeek R., Olson R., Push G.D., Olsen G.J., Davis J.J., Disz T., Edwards R.A., Gerdes S., Parrello B., Shukla M., Vonstein V., Wattam A.R., Xia F., Stevens R. The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST) // Nuclear Acids Res. 2014. V. 42. P. D206–D214.
- Preiss L., Hicks D.B., Suzuki S., Meier T., Krulwich T.A. Alkaliphilic bacteria with impact on industrial applications, concepts of early life forms, and bioenergetics of ATP synthesis // Front. Bioeng. Biotechnol. 2015. V. 3. P. 75.

- Ratnikova N.M., Slobodkin A.I., Merkel A.Y., Kopitsyn D.S., Kevbrin V.V., Bonch-Osmolovskaya E.A., Slobodkina G.B. *Sulfurimonas crateris* sp. nov., a facultative anaerobic sulfur-oxidizing chemolithoautotrophic bacterium isolated from a terrestrial mud volcano // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2020. V. 70. P. 487–492.
- Ross D.E., Marshall C.W., May H.D., Norman R.S. Comparative genomic analysis of *Sulfurospirillum cavolei* MES reconstructed from the metagenome of an electrosynthetic microbiome // *PLoS One*. 2016. V. 11. P. e0151214.
- Rousseau C., Gonnet M., Le Romancer M., Nicolas J. CRISPI: a CRISPR interactive database // *Bioinf.* 2009. V. 25. P. 3317–3318.
- Rowland H.A.L., Boothman C., Pancost R., Gault A.G., Polya D.A., Lloyd J.R. The role of indigenous microorganisms in the biodegradation of naturally occurring petroleum, the reduction of iron, and the mobilization of arsenite from West Bengal Aquifer Sediments // *J. Env. Qual.* 2009. V. 38. P. 1598–1607.
- Rzhetsky A., Nei M. A simple method for estimating and testing minimum-evolution trees // *Mol. Biol. Evol.* 1992. V. 9. P. 945–967.
- Sercu B., Jones A.D.G., Wu C.H., Escobar M.H., Serlin C.L., Knapp T.A., Andersen G.L., Holden P.A. The influence of *in situ* chemical oxidation on microbial community composition in groundwater contaminated with chlorinated solvents // *Microb. Ecol.* 2013. V. 65. P. 39–49.
- Schumacher W., Kroneck P.M.H., Pfennig N. Comparative systematic study on “*Spirillum*” 5175, *Campylobacter* and *Wolinella* species. Description of “*Spirillum*” 5175 as *Sulfurospirillum deleyianum* gen. nov., spec. nov. // *Arch. Microbiol.* 1992. V. 158. P. 287–293.
- Slobodkin A.I., Reysenbach A.-L., Slobodkina G.B., Baslerov R.V., Kostrikina N.A., Wagner I.D., Bonch-Osmolovskaya E.A. *Thermosulfurimonas dismutans* gen. nov., sp. nov. a novel extremely thermophilic sulfur-disproportionating bacterium from a deep-sea hydrothermal vent // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2012. V. 62. P. 2565–2571.
- Slobodkina G.B., Merkel A.Y., Novikov A.A., Bonch-Osmolovskaya E.A., Slobodkin A.I. *Pelomicrobium methylotrophicum* gen. nov., sp. nov. a moderately thermophilic, facultatively anaerobic, lithoautotrophic and methylotrophic bacterium isolated from a terrestrial mud volcano // *Extremophiles*. 2020. V. 24. P. 177–185.
- Søndergaard D., Pedersen C.N.S., Greening C. HydDB: A web tool for hydrogenase classification and analysis // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. P. 34212. <https://doi.org/10.1038/srep34212>
- 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., Tourova T.P., Muyzer G. Isolation and characterization of two novel alkalitolerant sulfidogens from a Thiopaq bioreactor, *Desulfonatatronum alkalitolerans* sp. nov., and *Sulfurospirillum alkalitolerans* sp. nov. // *Extremophiles*. 2013. V. 17. P. 535–543.
- Stolz J.F., Ellis D.J., Blum J.S., Ahmann D., Lovley D.R., Oremland R.S. *Sulfurospirillum barnesii* sp. nov. and *Sulfurospirillum arsenophilum* sp. nov., new members of the *Sulfurospirillum* clade of the ϵ -*Proteobacteria* // *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1999. V. 49. P. 1177–1180.
- Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D.G. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools // *Nucleic Acids Res.* 1997. V. 25. P. 4876–4882.
- van der Stel A.-X., Wösten M.M.S.M. Regulation of respiratory pathways in *Campylobacterota*: a review // *Front. Microbiol.* 2009. V. 10. P. 1719. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01719>
- Weisburg W.G., Barns S.M., Pelletier D.A., Lane D.J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study // *J. Bacteriol.* 1991. V. 173. P. 697–703.
- Wolin E.A., Wolin M.J., Wolfe R.S. Formation of methane // *J. Franklin Inst.* 1963. V. 176. P. 737.
- Yang H.M., Lou K., Sun J., Zhang T., Ma X.L. Prokaryotic diversity of an active mud volcano in the Usu City of Xinjiang, China // *J. Basic Microbiol.* 2012. V. 52. P. 79–85.
- Yun J.H., Sung H., Kim H.S., Tak E.J., Kang W., Lee J.-Y., Hyun D.-W., Kim P.S., Bae J.-W. Complete genome sequence of the halophile bacterium *Kushneria konosiri* X49T, isolated from salt-fermented *Konosirus punctatus* // *Stand. Genomic Sci.* 2018. 13:19. <https://doi.org/10.1186/s40793-018-0324-0>
- Zhang L., Qiu Y.Y., Zhou Y., Chen G.H., van Loosdrecht M.C.M., Jiang F. Elemental sulfur as electron donor and/or acceptor: Mechanisms, applications and perspectives for biological water and wastewater treatment // *Water Res.* 2021. V. 202. P. 117373.

***Sulfurospirillum tamanensis* sp. nov., a Facultative Anaerobic Alkaliphilic Bacterium from a Terrestrial Mud Volcano**

A. A. Frolova^{1,*}, A. Yu. Merkel¹, V. V. Kevbrin¹, D. S. Kopitsyn², and A. I. Slobodkin¹

¹Winogradsky Institute of Microbiology, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 199071 Russia

²Gubkin National University of Oil and Gas, Moscow 119991 Russia

*e-mail: romana2804@gmail.com

Received July 15, 2022; revised July 27, 2022; accepted July 29, 2022

Abstract—An alkaliphilic, facultatively anaerobic bacterium (strain T05b^T) was isolated from a terrestrial mud volcano on the Taman Peninsula, Russia. The cells of the isolate were motile spirilla 0.5 μm thick and 1.5–2.5 μm long. Strain T05b^T grew at 6–42°C (optimum at 30°C), pH 8.0–11.0 (optimum at 9.0), and 0–14% NaCl (wt/vol). Lactate, formate, malate, pyruvate, H₂, elemental sulfur, sulfite, thiosulfate, and sulfide were

used as electron donors; nitrate, fumarate, elemental sulfur, sulfite, thiosulfate, dimethyl sulfoxide, arsenate, and oxygen could be used as electron acceptors. Nitrate was reduced to ammonium. Malate, pyruvate, and fumarate were fermented. Microaerobic growth was possible at up to 3% O₂ (vol/vol). Strain T05b^T did not use sulfate and Fe(III) as electron acceptors, was unable of elemental sulfur, sulfite, or thiosulfate disproportionation, and did not ferment glucose, fructose, sucrose, lactate, formate, maleate, yeast extract, or peptone. The predominant fatty acids were C16:1 ω7 (45.9%), C16:0 (25.8%), and C18:1 ω7 (20.9%). The genome of strain T05b^T was 2.46 Mb in size and had the G + C DNA content of 45.5%. It contained the genes encoding the following enzymes of energy metabolism: Nap nitrate reductase periplasmic complex, Phs/Psr thiosulfate/polysulfide reductase, Sqr sulfide:quinone oxidoreductase, and Arr respiratory arsenate reductase. According to analysis of the 16S rRNA gene nucleotide sequence, strain T05b^T exhibited 98.61% similarity to the type strain of *Sulfurospirillum alkalitolerans* (phylum “*Campylobacterota*”). Based on its phenotypic characteristics and the results of phylogenetic analysis, assignment of the isolate to a new *Sulfurospirillum* species, *Sulfurospirillum tamanensis* sp. nov., is proposed, with the type strain T05b^T (=DSM 112596^T = VKM B-3538^T).

Keywords: alkaliphiles, anaerobic bacteria, mud volcano, nitrate reduction, *Campylobacterota*

LEUCOSPORIDIUM EGOROVIORUM F.A., SP. NOV., НОВЫЙ ВИД ДРОЖЖЕВЫХ ГРИБОВ, ВЫДЕЛЕННЫЙ ИЗ КАБАЧКОВ

© 2023 г. А. В. Качалкин^{a, b, *}, А. М. Глушакова^{a, c}, М. А. Томашевская^b

^aМосковский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

^bИнститут биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Пущино, 142290 Россия

^cНИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, 105064 Россия

*e-mail: kachalkin_a@mail.ru

Поступила в редакцию 17.08.2022 г.

После доработки 26.08.2022 г.

Принята к публикации 26.08.2022 г.

Новый анаморфный вид базидиомицетовых дрожжей *Leucosporidium egoroviorum* f.a., sp. nov. выделен в качестве эндофита из плодов *Cucurbita pepo* subsp. *pepo* (кабачок). По своим генетическим, физиологическим и морфологическим характеристикам новый вид принципиально отличается от близкородственных видов *L. fellii*, *L. intermedium* и *L. krinense*. Голотип нового вида – КБП Y-6804T, сохранен в метаболически неактивном состоянии, культуры изотипа: ВКМ Y-3065, DSM 113574 и CBS 17590; регистрация таксона в базе MocoBank MB 842805.

Ключевые слова: дрожжи, таксономия, эндофиты, *Leucosporidium*, *Leucosporidiales*, *Microbotryomycetes*, *Pucciniomycotina*

DOI: 10.31857/S0026365622600638, **EDN:** NMDAEF

В ходе изучения дрожжевого населения внутренних частей плодов сельскохозяйственных культур отечественного и импортного производства было обнаружено значительное количество эвритопных видов дрожжей с эндофитным образом жизни, развитие которых во внутренних тканях идет бессимптомно (Качалкин и соавт., 2021; Kachalkin et al., 2021). При выполнении исследования также были выделены и описаны новые виды, которые к настоящему времени известны только как обитатели сельскохозяйственных плодов: *Cyberlindnera dauci*, *Metschnikowia taurica*, *Vishniacozyma phoenicis* и *Yamadazyma cocois* (Crous et al., 2020a, 2020b, 2021; Maksimova et al., 2020). Помимо этого, обнаружен широко распространенный в плодах вид *Kwoniella endophytica*, находки которого в других местообитаниях также неизвестны (Crous et al., 2018).

Среди известных ранее видов дрожжей, из плодов *Cucurbita pepo* subsp. *pepo* (кабачок) были выделены непигментированные штаммы одноклеточных базидиомицетовых дрожжевых грибов, не продуцирующие крахмалоподобные соединения и не ассимилирующие инозит, с максимальной температурой роста 26°C. Видовая идентификация культур на основании нуклеотидных последовательностей ITS-региона рДНК показала, что они относятся к неизвестному ранее виду рода *Leucosporidium*.

Род *Leucosporidium* был описан при исследовании штаммов антарктических гетеробазидиомицетов (Fell et al., 1969). К настоящему времени к роду *Leucosporidium* относят не только телеоморфные формы дрожжей, но и родственные им анаморфы. Всего в роде 12 видов, которые, в большинстве своем, являются психротолерантными или психрофильными организмами и обнаруживаются в почве, на растительном материале и в морской среде, в высоких и умеренных широтах (Yurkov et al., 2012; Laich et al., 2014; de García et al., 2015; Mašínová et al., 2017; Crous et al., 2019). Дрожжи рода *Leucosporidium* являются биотехнологически значимыми микроорганизмами, как источник внеклеточных низкотемпературных ферментов, а также они обладают способностью к биодegradации фенольных соединений (de García et al., 2015).

В данной работе публикуется описание нового вида рода *Leucosporidium*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В сентябре 2021 г. были исследованы шесть кабачков из Владимирской области в период их зрелости и не имеющие нарушения покровных тканей. Поверхность плодов с целостностью покровных тканей, перед посевом обрабатывали 70% этанолом и 2% раствором гипохлорита натрия с последую-

щим удалением остатков растворов стерильной дистиллированной водой (Gai et al., 2009). После снятия покровных тканей стерильным скальпелем, вырезали участки внутренних тканей, измельчали и заливали стерильной водой в соотношении 1 : 10. Полученные суспензии обрабатывали на вортексе MultiReax (“Heidolph”, Германия) в течение 15 мин на скорости 2000 об./мин и высевали в трехкратной повторности на агаризованную глюкозо-пептонно-дрожжевую среду (ГРПА) с хлорамфениколом. Чашки инкубировали при 22–24°C в течение недели. Выросшие дрожжевые колонии учитывали дифференцированно на основании макро- и микроморфологических характеристик, представители морфогрупп были выделены в чистую культуру для видовой идентификации. Видовую идентификацию дрожжевых грибов проводили на основе анализа нуклеотидной последовательности ITS-региона рДНК. Выделение ДНК и постановку ПЦР проводили по ранее описанной методике (Glushakova, Kachalkin, 2017). Секвенирование ДНК осуществляли с помощью набора реактивов Big Dye Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit (“Applied Biosystems”, США) с последующим анализом продуктов реакции на секвенаторе Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer в ЗАО “Евроген” (Москва). Для секвенирования был использован праймер ITS5 (5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G). Идентификацию дрожжей на основании полученных результатов секвенирования проводили, используя данные генбанка NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) и базы данных MycoID (www.mycobank.org).

Для расширенной генетической характеристики нового вида дрожжевых грибов были исследованы последовательности других генов, а именно 18S (SSU) и D1/D3 домены 26S (LSU) рРНК, *TEF1*, *RPB1* и *RPB2*. Амплификация и секвенирование генов выполнялись с использованием следующих праймеров: LR5, NS1 и NS8, RPB1-Af и RPB1-Cr, RPB2-7cR и RPB2-5F, EF-983f и EF-2218r (подробнее данные указаны в работе Kachalkin et al., 2021). Сборку нуклеотидных последовательностей осуществляли с помощью программного обеспечения DNA Baser Sequence Assembler 4 (“Heracle BioSoft S.R.L.”). Для построения филогенетического дерева выравнивание нуклеотидных последовательностей для типовых культур осуществляли с использованием онлайн-версии алгоритма MAFFT (Katoh et al., 2019). Филогенетическое дерево для выравниваемых последовательностей ITS и D1/D2 регионов рДНК было построено в программе MEGA6 (Tamura et al., 2013) с использованием метода максимального правдоподобия на основе модели GTR с гамма-распределением инвариантных сайтов для 1000 альтернативных построений.

Штаммы нового вида были морфологически и физиологически охарактеризованы стандартны-

ми методами на твердых и жидких средах (Kurtzman et al., 2011).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе проведенного исследования дрожжевые грибы были обнаружены во всех исследованных образцах мякоти кабачков, их средняя численность составила 1.3×10^3 КОЕ/г. Проведенная видовая идентификация выделенных из кабачков штаммов дрожжей показала достаточно высокое разнообразие обнаруживаемых внутри дрожжей. Всего было выделено и идентифицировано 13 видов: *Aureobasidium pullulans* (относительное обилие – 17.26%), *Barnettozyma californica* (0.13%), *Candida parapsilosis* (6.12%), *C. sake* (2.41%), *Cystofilobasidium infirmominiatum* (9.24%), *Debaryomyces hansenii* (1.17%), *Hanseniopsis uvarum* (5.04%), *Metschnikowia pulcherrima* (7.67%), *Papiliotrema flavescens* (0.24%), *Rhodotorula babjevae* (1.21%), *Rh. mucilaginoso* (24.83%), *Vishniacozyma victoriae* (1.21%), а также дрожжи рода *Leucosporidium* (23.47%). Отдельно стоит отметить, что обнаруженные внутри мякоти дрожжи являются, в большинстве своем, типичными обитателями почвенно-растительных субстратов, а также эвритопными видами, ранее часто обнаруживаемыми и в других сельскохозяйственных плодах (Чернов и соавт., 2013; Kachalkin et al., 2021). Вероятнее всего, как было показано ранее, для многих дрожжевых грибов не составляет труда проникать во внутренние ткани плодов из внешней среды (Infante et al., 2012). Именно этим можно объяснить и находку в качестве эндофитов типичного почвенного вида *B. californica*, а также синантропного контаминанта почв – *Candida parapsilosis*.

Среди доминирующих видов в мякоти кабачков были обнаружены дрожжи рода *Leucosporidium*. Как было отмечено ранее, дрожжи данного рода являются психротолерантными или психрофильными организмами, которые обнаруживаются часто в почве и в разлагающемся растительном материале. Ранее нами были сделаны находки другого вида данного рода – *L. scottii* – в качестве минорного компонента в мякоти яблок, груш и в кизиле из Подмоскovie и в г. Москве (неопубликованные данные). Достаточно высокая доля в сообществе кабачков дрожжей рода *Leucosporidium* позволяет предположить, что именно из почвы эти дрожжи и попали в мякоть исследованных плодов.

Из разных образцов кабачков были выделены и исследованы три штамма рода *Leucosporidium*: КБП Y-6804, КБП Y-6805 и КБП Y-6806 (табл. 1). Для всех культур было проведено секвенирование регионов ITS1-5.8S-ITS2 (ITS регион) и D1/D3 доменов LSU, которое показало конспецифичность исследованных штаммов. Для штамма КБП Y-6804, помимо основных генетических маркеров,

Таблица 1. Информация об исследованных штаммах

Штамм	Номера в других коллекциях	Нуклеотидные последовательности				
		ITS-LSU	SSU	<i>TEF1</i>	<i>RPB1</i>	<i>RPB2</i>
КБП У-6804Г	ВКМ У-3065 DSM 113574 CBS 17590	OM038460	OM033544	OV309161	OV309162	OV309163
КБП У-6805	ВКМ У-3066	OM038461	—	—	—	—
КБП У-6806	ВКМ У-3067	OM038462	—	—	—	—

были получены нуклеотидные последовательности SSU региона рДНК и генов *TEF1*, *RPB1*, *RPB2*, которые были ранее исследованы для ряда других видов рода (Wang et al., 2015).

Результаты поиска полученных нуклеотидных последовательностей по генбанку NCBI показали, что по ITS-региону наибольшее сходство (93.99%) с видом *L. fellii* (CBS 7287^T, GenBank NR_073276; 30 замен, включая семь делеций), по данным LSU – наибольшее сходство (98.60%) с *L. intermedium* (CBS 11759, GenBank KY108447; 12 замен и одна делеция), по SSU – сходство 99.10% с *L. fellii* (JCM 9887^T, GenBank NG_063541; 15 замен, включая семь делеций), по *TEF1* – сходство 89.65% с *L. fellii* (JCM 9887^T, GenBank KJ707784; 113 замен, включая 18 делеций), по *RPB1* – сходство 80.54% с *L. fellii* (JCM 9887^T, GenBank KJ708030; 65 замен, включая 3 делеции), и по данным *RPB2* – сходство 78.61% с *L. golubevii* (CBS 9651^T, GenBank KJ708185; 151 замена, включая 21 делецию). Таким образом, полученные результаты по сравнению основных и дополнительных генетических маркеров указывают, что исследованные культуры принадлежат к новому виду рода *Leucosporidium* (Vu et al., 2016).

Филогенетическое положение вида *L. egoroviorum* sp. nov. продемонстрировано с использованием филогении на основе нуклеотидных последовательностей ITS и LSU регионов рДНК (Yurkov et al., 2012; Laich et al., 2014; Mašínová et al., 2017; Crous et al., 2019). Полученные результаты показали, что штаммы нового вида формируют хорошо поддержанный клад вместе телеоморфными видами *L. fellii* и *L. intermedium*, а также с анаморфным видом *L. krtinense* (рис. 1).

Штаммы нового вида были морфологически и физиологически охарактеризованы с помощью стандартных методов на твердой и жидкой средах. Проведенные тесты на скрещивание на разных средах (глюкозо-пептонный агар – GPYA, солодовый агар – MEA, картофельно-декстрозный агар – PDA, кукурузный агар – CMA) и морфологический агар) в течение трех месяцев при 10 и 22°C не дали никаких результатов. Описание нового вида выполняется на анаморфных культурах с обозначением

forma asexualis (f.a.), согласно опубликованным рекомендациям (Lachance, 2012). В будущем, при обнаружении новых изолятов, возможно, удастся изучить полный жизненный цикл нового вида и описать его совершенную форму.

Новый вид заметно отличается по физиологическим тестам от близкородственных видов рода (табл. 2). На основании физиологических тестов новый вид наиболее близок (7 отличий) к *L. fellii*, а с другими филогенетически близкими видами число отличий значительно больше (по данным Kurtzman et al., 2011; Mašínová et al., 2017).

Несмотря на филогенетическую и физиологическую близость *L. egoroviorum* f.a., sp. nov. к виду *L. fellii*, культуры заметно различаются по форме и размеру клеток. Клетки *L. fellii* вытянутые, сигаровидные, длиной 7–17 мкм (Kurtzman et al., 2011), а у нового вида более короткие, овальные, размером до 9 мкм (рис. 2). Кроме того, отличительной характеристикой нового вида является наличие на некоторых клетках коротких монополярных стебельков-конидиофоров с почкой, схожей с баллистоспорой. Однако тесты на образование баллистоспор, которые формируются у близкородственной культуры *L. intermedium*, показали, что у нового вида почкование идет без отстрела.

Таким образом, на основании генетических, физиологических и морфологических характеристик выделенные штаммы заметно отличаются от других видов рода *Leucosporidium*, что дает основание описать их как новый вид.

Описание нового вида *Leucosporidium egoroviorum* Kachalkin, A.M. Glushakova & M.A. Tomashevskaya, f.a., sp. nov.

Назван в честь двух российских ученых – микробиолога и биохимика Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова – Н.С. Егорова (1921–2021) и С.Н. Егорова (1948–2021).

На глюкозо-пептоновом агаре (GPYA) и 5% солодовым агаре (MEA) через 7 сут культивирования при 21°C, штрих цвета слоновой кости, гладкий, полуглянцевый, с ровным краем. Клетки от овальных до эллипсоидных (2.0–5.0 × 4.0–9.0 мкм),

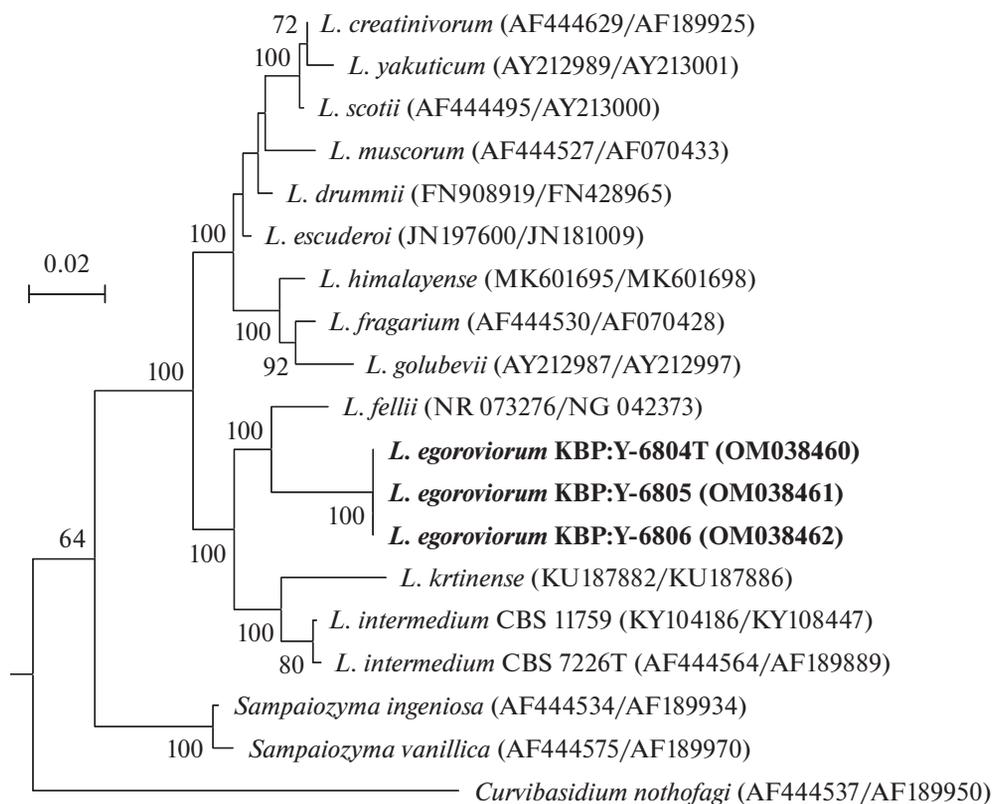


Рис. 1. Филогенетическое положение *L. egoroviorum* f.a., sp. nov. и других видов рода *Leucosporidium* на основе последовательностей ITS и LSU регионов рДНК. В скобках указаны номера нуклеотидных последовательностей GenBank. *Rhodotorula toruloides* (AF444489/AF070426) – скрытая внешняя группа.

встречаются поодиночке, парами или в небольших скоплениях и коротких цепочках, размножаются полярным почкованием, часто демонстрируя почкование на коротком или удлиненном (до 3.5 мкм длиной) монополярном стебельке. В старых культурах на ГРГА и картофельно-декстрозном агаре (PDA) могут присутствовать шаровидные клетки. В клетках присутствуют липидоподобные тела. Плохо развитый псевдомицелий образуются редко. Половые структуры, истинный мицелий и баллистоконидии обнаружены не были после культивирования в течение трех месяцев при 10 и 21°C (чистые культуры и в тесте на скрещивание) на средах ГРГА, МЕА, PDA, кукурузном агаре (СМА) и морфологическом агаре. Глюкозу не сбраживает. Ассимилирует следующие источники углерода: глюкоза, мальтоза, целлобиоза, трегалоза, мелезитоза, D-арабиноза (медленно), D-рибоза (слабо), L-рамноза, D-глюкозамин (слабо), этанол, глицерин, рибитол (слабо), D-маннитол, D-глюцитол, салицин, DL-молочная кислота (слабо), янтарная кислота, лимонная кислота, 2-кето-D-глюконат, 5-кето-D-глюконат, D-глюкуронат (слабо) и арбутин. Не растет на галактозе, L-сорбозе, лактозе, сахарозе, мелибиозе, раффинозе, инулине, растворимом крах-

мале, D-ксилозе, L-арабинозе, метаноле, эритри-те, галактитоле, инозите, метил- α -D-глюкозиде. Ассимиляция азотных соединений: положительная для сульфата аммония, нитрата калия и L-лизина, отрицательная для кадаверина. Рост на безвитаминной среде, на среде с 50% глюкозы и 0.5% дрожжевого экстракта, а также на среде МЕА с 10% NaCl положительный. Рост с 0.01 и 0.1% циклогексимида отрицательный. Крахмалоподобные соединения не образует. Окраска диазониевым синим В и уреазная реакция положительны. Максимальная температура роста 26°C.

Типовой штамм выделен как эндофит из мякоти кабачка (*Cucurbita pepo* subsp. *pepo*) из Владимирской области (Россия) в сентябре 2021 г. А.М. Глушковой (голотип КБП Y-6804T, сохранен в метаболически неактивном состоянии в коллекции дрожжей кафедры биологии почв МГУ (WDCM 1173), изотипы: ВКМ Y-3065, DSM 113574 и CBS 17590; нуклеотидные последовательности ITS-D1/D3 доменов LSU рДНК, SSU, генов *TEF1*, *RPB1* и *RPB2* размещены в генбанке NCBI: OM038460, OM033544, OV309161, OV309162 и OV309163; регистрация таксона в базе MucosBank MB 842805).

Таблица 2. Отличительные физиологические характеристики *L. egoroviorum* f.a., sp. nov.

	<i>L. egoroviorum</i> f.a., sp. nov.	<i>L. fellii</i>	<i>L. intermedium</i>	<i>L. krtinense</i>
Ассимиляция:				
Инулин	–	–	–	+
Сахароза	–	–	+	+
D-галактоза	–	–	+	+
Трегалоza	+	+	V	+
Мальтоза	+	–	V	+
Мелецитоза	+	–	–	+
Целлобиоза	+	+	+	–
Салицин	+	+	–	–
L-сорбоза	+	+	V	D
L-рамноза	+	+	–	–
D-ксилоза	–	+	–	+
L-арабиноза	–	–	–	+
D-арабиноза	S	+	–	–
D-рибоза	W	–	V	D
Этанол	+	–	+	+
Рибит	W	+	–	+
Молочная кислота	W	–	+	D
D-глюкозамин	W	+	–	–
Нитраты	+	+	–	+
Кадаверин	–	?	+	+
Рост при/с:				
50% глюкозы	+	?	–	?
10% NaCl и 5% глюкозы	+	?	–	W
0.01% циклогексимида	–	+	–	+
0.1% циклогексимида	–	+	–	+
Без витаминов	+	+	+	–
25°C	+	+	–	+
30°C	–	–	–	+

Примечание. D – задержка, S – медленно, V – переменный признак, W – слабо.

Description of *Leucosporidium egoroviorum* Kachalkin, A.M. Glushakova & M.A. Tomashevskaya, f.a., sp. nov.

Named in honour of two Russian scientists, microbiologist and biochemist at the Lomonosov Moscow State University, Nikolay S. Egorov (1921–2021) and Sergey N. Egorov (1948–2021).

On glucose peptone yeast extract agar (GPYA) and 5% malt extract agar (MEA), after 7 d at 21°C, streak is ivory coloured, smooth and semi-glossy, with an entire margin. Cells are subglobose to ellipsoidal (2.0–5.0 × 4.0–9.0 µm), occurring singly, in pairs or in small clusters and short chains, dividing by polar budding, often showing budding on short or elongated monopolar stalk (up to 3.5 µm long). Globose cells may be present in older cultures on GPYA and potato

dextrose agar (PDA). Lipid-like bodies presents in cells. Poorly developed pseudohyphae are rarely formed. Sexual structures, true hyphae and ballistocnidia have not been observed during 3 months at 10 and 21°C in culture (pure cultures and in mating test) grown on GPYA, MEA, PDA, cornmeal agar (CMA) and yeast morphology agar. Glucose is not fermented. Glucose, maltose, cellobiose, trehalose, melezitose, D-arabinose (slow), D-ribose (weak), L-rhamnose, D-glucosamine (weak), ethanol, glycerol, ribitol (weak), D-mannitol, D-glucitol, salicin, DL-lactic acid (weak), succinic acid, citric acid, 2-keto-D-gluconate, 5-keto-D-gluconate, D-glucuronate (weak) and arbutin are assimilated; no growth occurs on galactose, L-sorbose, lactose, sucrose, melibiose, raffinose, inulin, soluble starch, D-xylose, L-arabinose, methanol, erythritol, galactitol, *myo*-inositol, methyl α-D-glu-



Рис. 2. *Leucosporidium egoroviorum* f.a., sp. nov., штамм КБП Y-6804T: дрожжевые клетки на среде MEA (через 7 сут при 21°C). Масштабная линейка – 5 мкм.

coside. Assimilation of nitrogen compounds: positive for ammonium sulphate, potassium nitrate and L-lysine, and negative for cadaverine. Growth on vitamin-free medium, on 50% w/w glucose/yeast extract (0.5%) agar, on MEA with 10% NaCl is positive. Growth with 0.01 and 0.1% cycloheximide is negative. Starch-like compounds are not produced. Diazonium blue B colour and urease reactions are positive. Maximum growth temperature is 26°C.

Typus. Russia, Vladimir oblast, isolated as endophyte from the pulp of marrow squash (*Cucurbita pepo* subsp. *pepo*), Sep. 2021, A.M. Glushakova (holotype КБП Y-6804T, preserved in a metabolically inactive state in the Yeast collection of Department of Soil Biology of Lomonosov Moscow State University (WDCM 1173), isotypes: VKM Y-3065, DSM 113574, and CBS 17590; ITS-D1/D3 domains of LSU nrDNA, SSU, *TEF1*, *RPB1* and *RPB2* sequences GenBank OM038460, OM033544, OV309161, OV309162 and OV309163; MycoBank MB 842805).

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность др. К. Бенш (Институт грибного биоразнообразия Вестердейк, Утрехт) за корректировку латинского эпитета.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование нового вида выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2021-1051) и как часть темы государственного задания МГУ (№ 121040800174-6).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Качалкин А.В., Глушакова А.М., Стрелецкий Р.А., Савченко В.Е., Венжик А.С. Эндозитные дрожжи в плодах сельскохозяйственных культур // 3-й Российский микробиологический конгресс (г. Псков, 26 сентября–1 октября 2021 г.): Материалы конгресса. Псков: ООО Конкорд, 2021. С. 29–30.
- Чернов И.Ю., Глушакова А.М., Качалкин А.В. Аннотированный список видов дрожжей Московского региона // Микология и фитопатология. 2013. Т. 47. С. 103–115.
- Crous P.W., Carnegie A.J., Wingfield M.J., Sharma R., Mughini G. et al. Fungal Planet description sheets: 868–950 // Persoonia. 2019. V. 42. P. 291–473.
- Crous P.W., Cowan D.A., Maggs-Kölling G., Yilmaz N., Larsson E. et al. Fungal Planet description sheets: 1112–1181 // Persoonia. 2020a. V. 45. P. 251–409.
- Crous P.W., Cowan D.A., Maggs-Kölling G., Yilmaz N., Thangavel R. et al. Fungal Planet description sheets: 1182–1283 // Persoonia. 2021. V. 46. P. 313–528.
- Crous P.W., Luangsa-ard J.J., Wingfield M.J., Carnegie A.J., Hernández-Restrepo M. et al. Fungal planet description sheets: 785–867 // Persoonia. 2018. V. 41. P. 238–417.
- Crous P.W., Wingfield M.J., Chooi Y.-H., Gilchrist C.L.M., Lacey E. et al. Fungal Planet description sheets: 1042–1111 // Persoonia. 2020b. V. 44. P. 301–459.
- de García V., Coelho M.A., Maia T.M., Rosa L.H., Vaz A.M. et al. Sex in the cold: taxonomic reorganization of psychrotolerant yeasts in the order *Leucosporidiales* // FEMS Yeast Res. 2015. V. 15. Art. fov019. P. 1–12.
- Fell J.W., Stätzell A., Hunter I.L., Phaff H.J. *Leucosporidium* gen. nov. The heterobasidiomycetous stage of several yeasts of the genus *Candida* // Antonie van Leeuwenhoek. 1969. V. 35. P. 433–462.
- Gai C.S., Lacava P.T., Maccheroni W., Jr., Glienke C., Araujo W.L., Miller T.A., Azevedo J.L. Diversity of endophytic yeasts from sweet orange and their localization by scanning electron microscopy // J. Basic Microbiol. 2009. V. 49. P. 441–451.
- Glushakova A.M., Kachalkin A.V. Endophytic yeasts in *Malus domestica* and *Pyrus communis* fruits under anthropogenic impact // Microbiology (Moscow). 2017. V. 86. P. 128–135.
- Infante E., Marquinez X., Moreno G. Tomato peel (*Solanum lycopersicum* L.) colonization by the endophyte yeast *Candida guilliermondii* (Castellani) Langeron et Guerra // Agronomía Colombiana. 2012. V. 30. P. 388–394.
- Kachalkin A.V., Abdullabekova D.A., Magomedova E.S., Yurkov A.M. *Zygorulasporea dagestanica* sp. nov., a novel ascomycetous yeast species associated with the Georgian honeysuckle (*Lonicera iberica* M. Bieb.) // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2021. V. 71. Art. 004785. P. 1–6.

- Kachalkin A.V., Glushakova A.M., Venzhik A.S.* Presence of clinically significant endophytic yeasts in agricultural crops: monitoring and ecological safety assessment // IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science. 2021. V. 723. Art. 042005. P. 1–6.
- Katoh K., Rozewicki J., Yamada K.D.* MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization // Brief Bioinform. 2019. V. 20. P. 1160–1166.
- Kurtzman C.P., Fell J.W., Boekhout T., Roberts V.* Methods for isolation, phenotypic characterization and maintenance of yeasts // The Yeasts: A Taxonomic Study / Eds. Kurtzman C.P., Fell J.W. and Boekhout T. Amsterdam: Elsevier Science, 2011. P. 87–110.
- Kurtzman C.P., Fell J.W., Boekhout T.* (eds.). The Yeasts: A Taxonomic Study, Elsevier, 2011, 5th ed.
- Lachance M.A.* In defense of yeast sexual life cycles: the *forma asexualis*: an informal proposal // Yeast Newsl. 2012. V. 61. P. 24–25.
- Laich F., Chávez R., Vaca I.* *Leucosporidium escuderoi* f.a., sp. nov., a basidiomycetous yeast associated with an Antarctic marine sponge // Antonie van Leeuwenhoek. 2014. V. 105. P. 593–601.
- Maksimova I.A., Glushakova A.M., Thanh V.N., Kachalkin A.V.* *Yamadazyma cocois* f.a., sp. nov., an ascomycetous yeast isolated from coconuts // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2020. V. 70. P. 3491–3496.
- Mašíňová T., Pontes A., Carvalho C., Sampaio J.P., Baldrian P.* *Libkindia masarykiana* gen. et sp. nov., *Yurkovia mendeliana* gen. et sp. nov. and *Leucosporidium krtinense* f.a. sp. nov., isolated from temperate forest soils // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2017. V. 67. P. 902–908.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipiński A., Kumar S.* MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0 // Mol. Biol. Evol. 2013. V. 30. P. 2725–2729.
- Vu D., Groenewald M., Szöke S., Cardinali G., Eberhardt U. et al.* DNA barcoding analysis of more than 9000 yeast isolates contributes to quantitative thresholds for yeast species and genera delimitation // Stud. Mycol. 2016. V. 85. P. 91–105.
- Wang Q.M., Groenewald M., Takashima M., Theelen B., Han P.J. et al.* Phylogeny of yeasts and related filamentous fungi within *Pucciniomycotina* determined from multigene sequence analyses // Stud. Mycol. 2015. V. 81. P. 27–53.
- Yurkov A.M., Schäfer A.M., Begerow D.* *Leucosporidium drummii* sp. nov., a member of the *Microbotryomycetes* isolated from soil // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2012. V. 62. P. 728–734.

***Leucosporidium egoroviorum* f.a., sp. nov., a New Yeast Species Isolated from Zucchini**

A. V. Kachalkin^{1, 2, *}, A. M. Glushakova^{1, 3}, and M. A. Tomashevskaya²

¹*Moscow State University, Moscow, 119991 Russia*

²*Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Pushchino, 142290 Russia*

³*Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, 105064 Russia*

*e-mail: kachalkin_a@mail.ru

Received August 17, 2022; revised August 26, 2022; accepted August 26, 2022

Abstract—*Leucosporidium egoroviorum* f.a., sp. nov., a new anamorphic species of the basidiomycetous yeasts, was isolated as an endophyte from the fruits of *Cucurbita pepo* subsp. *pepo* (zucchini). According to its genetic, physiological, and morphological characteristics, the new species differed significantly from the closely related species *L. fellii*, *L. intermedium*, and *L. krtinense*. The holotype of the new species, KBP Y-6804T, is preserved in a metabolically inactive state; its isotype strains are VKM Y-3065, DSM 113574, and CBS 17590. The MycoBank number is MB 842805.

Keywords: yeasts, taxonomy, endophytes, *Leucosporidium*, *Leucosporidiales*, *Microbotryomycetes*, *Pucciniomycotina*

СОСТОЯНИЕ ЦИАНОБАКТЕРИИ *ARTHROSPIRA PLATENSIS*
И АССОЦИИРОВАННОЙ С НЕЙ МИКРОФЛОРЫ ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ
ХРАНЕНИИ В СОСТОЯНИИ АНГИДРОБИОЗА© 2023 г. И. А. Харчук^а, О. А. Рылькова^а, *, Н. М. Береговая^а^аФедеральный исследовательский центр “Институт биологии южных морей
им. А.О. Ковалевского РАН”, Севастополь, 299011 Россия

*e-mail: ol.rylkova@yandex.ru

Поступила в редакцию 05.04.2022 г.

После доработки 23.06.2022 г.

Принята к публикации 24.06.2022 г.

Стандартными методами определен биохимический состав *Arthrospira (Spirulina) platensis* (Nordstedt) Gomont после длительного хранения (4 года, 17 лет) в состоянии ангидробиоза. Показано, что количество белков (55.3–61.2%) и суммарных углеводов (13.0–15.6%) в клетках цианобактерий соответствовало данным, известным из литературы и полученным нами ранее при закладке этих же образцов на хранение. Содержание свободных нуклеотидов (1.8–2.6%), липидов (1.3–11.0%) и, особенно, пигментов было низким (0.5–1.3, 0.03–0.12, 1.4–2.0, 0.03–0.05% соответственно, для хлорофилла *a*, каротиноидов, С-фикоцианина и аллофикоцианина). Количество нуклеиновых кислот в пробах достигало: 3.1–24.0 и 0.11–0.16% соответственно, для РНК и ДНК. При микроскопическом исследовании *A. platensis* (17 лет хранения) показано наличие 34.2% необратимо поврежденных и 65.8% мертвых клеток. Для определения количественных и морфологических показателей ассоциированной микрофлоры предложено использовать комплексную физико-химическую обработку (метанол, ультразвук, центрифугирование) суспензии реактивированных цианобактерий. В морфологической структуре микробиома выделены 3 основные группы (палочковидные, округлые и извитые формы). В сообществе доминировали палочковидные формы: крупные палочки составляли 60.5%, мелкие палочки – 14.4%. Мицелиальные формы (тонкие нити), кокки и извитые формы встречались реже. В среднем объем бактериальной клетки составлял 0.27 ± 0.04 мкм³. Вклад бактерий составлял от 3.3 до 11.3% (в среднем $8.3 \pm 4.4\%$) от веса сухой биомассы *A. platensis*. Высказано предположение, что на биохимические показатели и жизнеспособность цианобактерий оказывала влияние сопутствующая микрофлора.

Ключевые слова: цианобактерии, *Arthrospira (Spirulina) platensis*, биохимический состав, жизнеспособность клеток, ассоциированная микрофлора, ангидробиоз

DOI: 10.31857/S002636562210024X, EDN: NNMNLXB

Цианобактерия *Arthrospira (Spirulina) platensis* содержит огромное количество белка, витаминов, минералов, кислот, около 2 тыс. ферментов, ценных пигментов; она используется в медицине как биологически активная добавка, применяется в косметологии, диетологии, является одним из популярных объектов культивирования (Vonshak 1997; Falquet, Hurni, 2006; Liu et al., 2016).

Цианобактерии сохраняют в альгологических и биотехнологических коллекциях с использованием широкого спектра методических подходов. Одним из способов является переводение культивируемых организмов в состояние анабиоза, чаще осуществляемое путем обезвоживания клеточной биомассы. Хранение культур в подобном состоянии обеспечивает долгосрочное сохранение клеток с поддержанием их высокой жизнеспособности,

предупреждает мутационные изменения, т.е. поддерживает организмы в максимально близком к естественному состоянию (Харчук, 2007, 2008). Известны данные, что при переводе в состояние ангидробиоза в клетках должна оставаться вода, что позволяет структурам клетки перейти в гелеобразное состояние, сохраняя жизнеспособность, а биохимические процессы приостанавливаются. При низкой остаточной влажности происходит деструкция клеточных элементов, что приводит к гибели клеток, а при высокой влажности могут начать развиваться гнилостные процессы (Бекер и соавт., 1981). Экспериментальным путем показано, что для сохранения жизнеспособности *A. platensis* остаточная влажность должна составлять 7–11% (Харчук, 2015).

Ранее установлено, что в нативной пробе *A. platensis* содержание основных биохимических показателей — белков, липидов и суммарных углеводов; пигментов (хлорофилла *a* и каротиноидов), свободных нуклеотидов, ДНК, РНК в целом соответствовало диапазону величин, описанных другими авторами (Vonshak, 1997; Falquet, Hurni, 2006; Харчук, 2008; Liu et al., 2016). В первый год хранения после обезвоживания, по сравнению с нативной пробой, в биохимическом составе *A. platensis* не было обнаружено достоверных изменений (Харчук, 2008). Установлено, что после 6-летнего хранения при реактивации *A. platensis* переходила в активную фазу роста, клетки приступали к делению, в культуре были обнаружены молодые трихомы (Харчук, 2007, 2008). Однако остается невыясненным вопрос о максимальной длительности хранения цианобактерий в обезвоженном состоянии, в течение которой способность к восстановлению и делению клеток будет сохраняться.

Широко известно, что при выращивании альгокультур в них всегда присутствует сопутствующая микрофлора (Тархова, 2005; Mogale, 2016; Vardaka et al., 2016), а также возможна контаминация, возникающая во время хранения сухой биомассы. В лабораторных условиях рост цианобактерий *A. platensis* сопровождается развитием протеолитических, амилолитических, липолитических и др. гетеротрофных микроорганизмов, среди которых чаще выделяют четыре доминирующих рода: *Flavobacterium*, *Mycobacterium*, *Achromobacter*, *Pseudomonas* (Тархова, 2005). Микроорганизмы могут влиять на жизнеспособность и биохимические показатели альгокультур.

Целью данной работы было исследование жизнеспособности и биохимического состава клеток *A. platensis* при длительном хранении в состоянии анабиоза, оценка морфологической структуры сопутствующей микрофлоры и ее вклада в биомассу *A. platensis*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Условия выращивания и перевод *A. platensis* в состояние ангидробиоза. Объектом исследования служила культура *Arthrospira (Spirulina) platensis* (Nordstedt) Gomont (штамм IBBS-31) из коллекции отдела биотехнологии и фиторесурсов ФИЦ ИнБЮМ РАН. Цианопрокариоты выращивались в режиме накопительного культивирования при постоянном круглосуточном освещении и автоматическом перемешивании с использованием насоса для удаления избытка кислорода из среды и равномерного прогрева всего слоя питательного раствора культуры. Барботировали атмосферным воздухом с общей скоростью подачи 1.42 л мин^{-1} , что составляло $0.35 \text{ л мин}^{-1} \text{ л}^{-1}$ культуры. Интенсивность света на поверхности раствора культуры

составляла 10.7 кЛк , для измерения использовали прибор квантометр Li-250A (“Li-Cor”, США). Температура среды изменялась в диапазоне $20\text{--}25^\circ\text{C}$. В качестве питательной среды для *A. platensis* использовали среду Заррука (Faucher et al., 1979). Культиваторами служили стеклянные стаканы объемом 2 дм^3 ; объем среды составлял 1 дм^3 при высоте слоя $14\text{--}15 \text{ см}$.

На стационарной стадии роста трихомы *A. platensis* концентрировали путем их фильтрации через мельничные газы $100\text{--}105 \text{ ПЭ}$. Сконцентрированную культуру *A. platensis* промывали дистиллированной водой в соотношении $1 : 3$ для полного отмывания от солей и сохранения клеточных мембран и оболочек; сохранность клеток контролировали микроскопированием. Затем полученную пасту водорослей разделяли на несколько частей и высушивали до воздушно-сухого состояния в термостате в температурном диапазоне $30\text{--}70^\circ\text{C}$ в течение 24 ч при остаточной влажности $8.5\text{--}9.5\%$. Обезвоженные клетки цианобактерий хранили в герметично закрытых полиэтиленовых упаковках в темноте при температуре $15\text{--}20^\circ\text{C}$.

Биохимические исследования *A. platensis*. В работе использовали высушенную биомассу *A. platensis*, которая ранее была исследована в нативном состоянии, после обезвоживания и через один год хранения (Харчук, 2008). Работы с этим же образцом *A. platensis* были продолжены через 4- и 17-летние сроки хранения. Пробы обрабатывали по схеме комплексного химического анализа гидробионтов (Копытов и соавт., 1985). Содержание пигментов определяли спектрофотометрическими методами на приборе СФ-2000 (“ЛОМО”, Россия). Хлорофилл *a* (Хл *a*) из сухих клеток *A. platensis* экстрагировали 90% ацетоном; оптическую плотность полученных супернатантов регистрировали при 664 и 647 нм . Каротиноиды (КР) оценивали в суммарной вытяжке пигментов *A. platensis* по поглощению в области 480 нм (Rowan, 1989). Массовую долю белка в цианобактериях определяли по методике Лоури (Lowry et al., 1951). Количество свободных нуклеотидов (СН), РНК и ДНК определяли спектрофотометрическим методом (Спирин, 1958). Общее содержание липидов находили спектрофотометрическим методом с фосфованилиновым реактивом. Определение углеводов проводили с помощью L-триптофанового реактива (Агапова, 2004). С-фикоцианин экстрагировали дистиллированной водой, его содержание рассчитали по формуле, приведенной в работе (Геворгиз, Нехорошев, 2017). Показатели биохимического состава выражали в процентах в пересчете на сухую массу (СМ). Остаточную влажность определяли стандартным методом доведения до постоянного веса.

Подготовка суспензии *A. platensis* для микроскопических исследований и оценки вклада бактери-

альной составляющей. Чтобы минимизировать внешнее загрязнение, все используемые растворы (фиксаторы, стерильную питательную среду Заррука, химические реагенты) непосредственно перед работой фильтровали через мембранные фильтры с диаметром пор 0.2 мкм (“Sartorius”, Германия). Для размачивания *A. platensis* использовали стерильные пластиковые пробирки, в которые помещали навеску цианобактерий (0.01–0.05 г) и добавляли 3 мл стерильной среды Заррука, разбавленной дистиллированной водой, в соотношении (1 : 2), по методике, описанной ранее (Харчук, 2015). Через 60 мин экспозиции при комнатной температуре аликвоту суспензии клеток *A. platensis* фиксировали в течение 60 мин глутаровым диальдегидом до конечной концентрации 2.5% и использовали для микроскопических исследований ассоциированной микрофлоры с помощью сканирующего электронного микроскопа (СЭМ) и расчета вклада бактерий в биомассу *A. platensis* методом взвешиваний. Остальную суспензию продолжали реактивировать в течение 30 сут с ежедневным определением жизнеспособности клеток (см. следующий раздел).

Определение жизнеспособности *A. platensis*. Выявление живых и мертвых клеток цианобактерий осуществляли с помощью светового микроскопа Carl Zeiss (“Axiostar plus”, Германия), снабженного камерой (“Canon A 620”, Япония) при увеличении от $\times 200$ до $\times 630$ методом дифференциального окрашивания клеток метиленовым синим (Сиренко, 1975). Одновременно учитывали общее количество реактивируемых клеток и определяли долю клеток, сохранивших жизнеспособность (под жизнеспособностью подразумевали способность *A. platensis* эндогенно поглощать краситель). Результаты интерпретировали по методике Мейселя (Мейсель и соавт., 1961), адаптированной авторами для цианобактерий.

Определение доли бактерий в культуре *A. platensis* методом взвешиваний. Суспензию клеток сразу после размачивания и фиксирования (контроль), осаждали на предварительно доведенные до постоянного веса нитроцеллюлозные фильтры с диаметром пор 0.2 мкм (фильтры и воронки “Sartorius”, Германия). Параллельно аликвоту суспензии, для более полного извлечения микрофлоры из суспензии цианобактерий, подвергали физико-химической обработке (Lunau et al., 2005; Kallmeyer et al., 2008; Rylkova et al., 2019). Для этого суспензию обрабатывали метанолом (конечная концентрация в пробе 10%), выдерживали в ультразвуковой установке (Unitra unima 01SZTYN UM-4, VA140, V220, Hz50) в течение 15 мин при 35°C, встряхивали с помощью вортекса (Microspin FV-2400, “Biosan”, Латвия) в течение 1 мин и центрифугировали (ОПн-ЗУ4.2, “ДАСТАН”, Кыргызская Республика) в течение 10 мин при 900 g. Супернатант использовали для исследова-

ния с помощью СЭМ (см. ниже), а осадок трижды промывали стерильной средой Заррука и центрифугировали (Lunau et al., 2005; Kallmeyer et al., 2008; Rylkova et al., 2019). При такой обработке бактериальная составляющая оставалась в супернатанте, а полученный осадок с клетками *A. platensis*, свободный от сопутствующей микрофлоры, отфильтровывали на предварительно доведенные до постоянного веса нитроцеллюлозные фильтры с диаметром пор 0.2 мкм. После фильтрации всех образцов их просушивали в сушильном шкафу (2В-151, Украина) при температуре 105°C в течение 24 ч и вновь взвешивали (Sartorius L220S, “Sartorius”, Германия). По разнице между контролем и осадками, подвергшимся физико-химической обработке, определяли вклад бактерий в биомассу *A. platensis*.

Морфологические исследования клеток бактерий.

При подготовке образцов для сканирующего электронного микроскопа (СЭМ) аликвоту (0.5–2 мл) надосадочной жидкости после физико-химической обработки (см. выше) пробы из реактивированной культуры *A. platensis* концентрировали на поликарбонатный фильтр с диаметром пор 0.2 мкм (“ОИЯИ”, Россия). Далее проводили дегидратацию, используя серию разведений этанола: 20, 30, 50, 75, 96, 100% (Vratbak et al., 1993). Для сушки образцов в критической точке (1.5–2.5 ч) использовали устройства Leica EM CPD300 (Германия). Для напыления (Au/Pd; 0.5–1.0 мин) применяли прибор Leica EM ACE200 (Германия). Просматривали образцы с помощью сканирующего электронного микроскопа Hitachi SU3500 (Япония) при увеличении от $\times 5000$ до $\times 35000$. На 40 случайно выбранных полях зрения определяли линейные размеры (длина, ширина, диаметр) 300 бактериальных клеток и процент встречаемости каждой из морфологических групп. Размеры бактерий по микрофотографиям определяли с помощью программы ImageJ 1.50i (National Institutes of Health, США, Java 1.6.0_20 (32-bit)). Объем кокков рассчитывали по формуле объема шара, объем палочек и извитых форм определяли по формуле объема цилиндра.

Статистический анализ проводили в пакете STATISTICA (data analysis software system), версия 10 (“StatSoft, Inc.”, www.statsoft.com), построение графиков – в программах SigmaPlot 10.0 (“SYSTAT Software, Inc.”) и Grapher 8 (“Golden Software, Inc.”). Полученные данные обработаны с использованием параметрических критериев и представлены в виде средней арифметической (M) из пяти повторностей (n), стандартной ошибки среднего (mM); доверительного интервала (CI); статистическую значимость различий оценивали по t -критерию Стьюдента ($p < 0.05$).

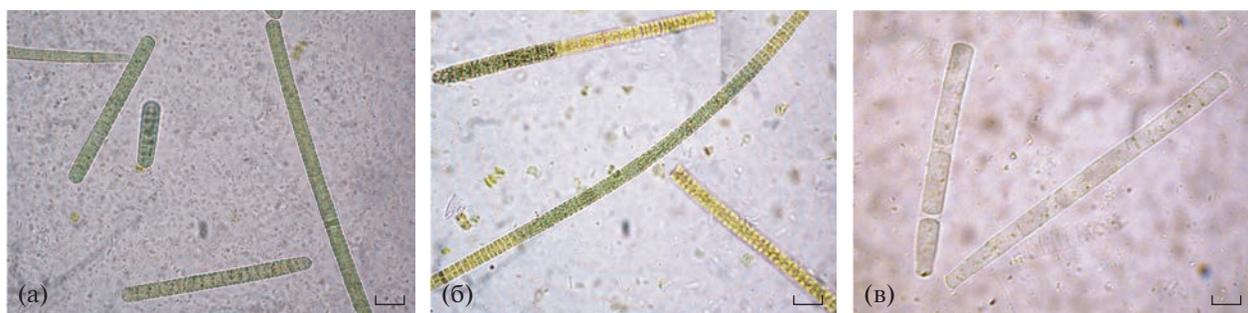


Рис. 1. Исследование культуры *A. platensis* после 17-ти лет хранения с помощью световой микроскопии: а – сразу после реактивации; б – 3 сут эксперимента; в – 30 сут эксперимента. Масштабная линейка – 10 мкм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Микроскопические исследования культуры *Arthrospira platensis*. Показано, что в первые часы реактивации через 17 лет хранения *A. platensis* в обезвоженном состоянии преобладали внешне неповрежденные клетки цианобактерий (рис. 1а). При увеличении времени реактивации обнаружено увеличение доли клеток с разрушающимся пигментом (рис. 1б). Через 30 сут после начала эксперимента мы наблюдали доминирование клеток с разрушенным содержимым, но сохранивших трихомы (рис. 1в). Применение к этим же образцам *A. platensis* адаптированной классификации Мейселя (1961) показали наличие необратимо поврежденных и мертвых клеток: 65.8 и 34.2% соответственно (рис. 2).

Ранее было обнаружено, что в этих же пробах после 1 года хранения доминировали неповрежденные или слегка поврежденные клетки, способные к

делению (I группа); их доля составляла 76.6%. На необратимо поврежденные клетки, продолжающие осуществлять нарушенный обмен веществ, быстро восстанавливающие свои нативные размеры и переходившие к репарации поврежденных клеточных структур (III группа), приходилось 16%. Такое восстановление было длительным (до 30 сут), однако к делению клетки не переходили и постепенно разрушались. На долю мертвых клеток (IV группа) приходилось 7.4% (Харчук, 2007) (рис. 2). Через 4 года хранения произошло значительное перераспределение вкладов клеток различных групп: содержание I группы снизилось в 1.6 раза и составило 48.6%; появились клетки II группы (11.4%), сильно поврежденные, медленно восстанавливающие функции, но способные к делению; увеличился вклад клеток III группы в 1.5 раза (24.6%) и IV группы в 2 раза (15.4%) (Харчук, 2007) (рис. 2).

Содержание биохимических соединений в клетках *A. platensis*. Ранее установлено, что в нативной пробе *A. platensis*, перед ее обезвоживанием и закладкой на хранение, содержание основных биохимических показателей составляло: 58, 14.8 и 17.3% соответственно, для белков, липидов и суммарных углеводов. Количество пигментов составляло 1.8 и 0.6% (для хлорофилла *a* и каротиноидов), свободных нуклеотидов – 4.7%, ДНК – 0.13% и РНК – 2.5%. Сразу после обезвоживания *A. platensis* количество белка, суммарных углеводов, пигментный состав и содержание ДНК практически не менялись, для липидов и свободных нуклеотидов обнаружено небольшое снижение, а для белка и РНК – увеличение содержания. Через 1 год хранения отмечено стабильное содержание белка и углеводов, незначительное снижение остальных показателей, за исключением содержания ДНК и РНК. Однако все величины для этих периодов по сравнению с нативной пробой были статистически незначимы (парный *t*-тест, $p > 0.05$) (Харчук, 2008) (рис. 3).

Установлено, что обезвоживание цианобактерий с целью сохранения их в жизнеспособном со-

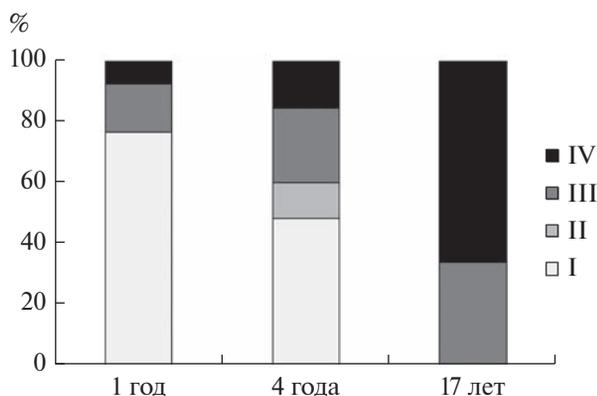


Рис. 2. Содержание клеток различных групп в культуре *A. platensis* на различных сроках хранения в состоянии ангидриобиоза (приведены данные при температуре обезвоживания 60°C): I – неповрежденные или слегка поврежденные клетки; II – сильно поврежденные; III – необратимо поврежденные; IV – мертвые клетки. Данные по пробам после 1 и 4 года хранения приведены по (Харчук, 2007), 17 лет хранения – данные настоящего исследования.

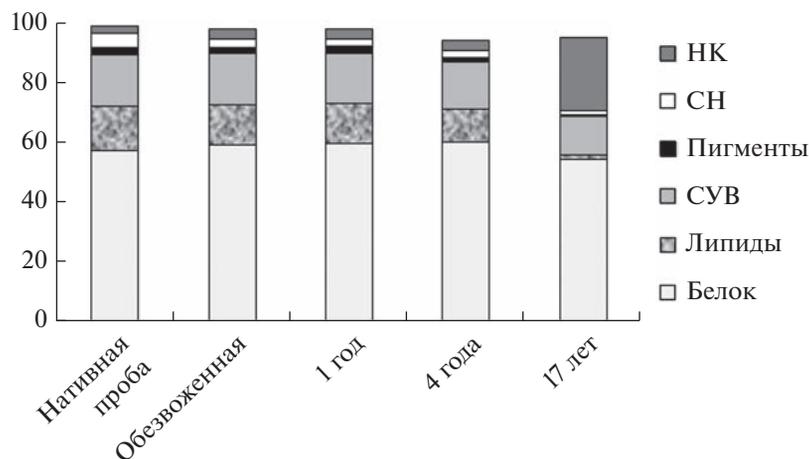


Рис. 3. Биохимический состав *A. platensis* (% от сухой биомассы) при температуре обезвоживания 60°C. НК – суммарные нуклеиновые кислоты; СН – свободные нуклеотиды; СУВ – суммарные углеводы. Данные по нативной, обезвоженной пробам и после 1 года хранения приведены по (Харчук, 2008), через 4 года, 17 лет хранения – данные настоящего исследования.

стоянии необходимо проводить в температурном диапазоне 30–60°C (Харчук, 2015, 2018). В данном исследовании для всех биохимических показателей *A. platensis* отсутствовала достоверная разница при температуре обезвоживания 30 и 60°C (парный *t*-тест, $p > 0.05$). При сравнении биохимических показателей, полученных для разных сроков хранения, мы ориентировались на оптимальную температуру сушки 60°C и установленную остаточную влажность для исследуемых образцов 8.5–9.5%.

По сравнению с обезвоженной пробой (рис. 3) для образцов *A. platensis* после 4-х и 17-ти лет хранения обнаружено недостоверное снижение содержания белка (с 61.2 ± 0.8 до $55.3 \pm 1.2\%$), сум-

марных углеводов (с 15.6 ± 0.3 до $13.0 \pm 0.4\%$) и свободных нуклеотидов (с 2.6 ± 0.02 до $1.8 \pm 0.15\%$); во всех случаях парный *t*-тест, $p > 0.05$.

Количество липидов за этот период снизилось в 8.3 раза с 11.0 ± 0.03 до $1.3 \pm 0.11\%$, хлорофилла *a* – почти втрое (с 1.3 ± 0.01 до $0.46 \pm 0.02\%$), каротиноидов – в четыре раза (с 0.12 ± 0.01 до $0.03 \pm 0.002\%$). Во всех случаях различия были достоверными (парный *t*-тест, $p < 0.05$) (табл. 1, рис. 3).

Фикобилипротеины (ФБП) *A. platensis*, входящие в пул белковых веществ, были представлены С-фикоцианином (С-ФК) и аллофикоцианином (АФЦ) (Стадничук, 1990). При длительном хра-

Таблица 1. Биохимический состав и показатели жизнеспособности клеток цианобактерий *Arthrospira platensis*, после 4 и 17 лет хранения в состоянии ангидробриоза (приведены средние значения с доверительным интервалом при температуре обезвоживания 60°C)

Биохимические показатели, % СВ	4 года	17 лет
Белок	61.2 ± 0.8	55.3 ± 1.2
Липиды	11.0 ± 0.03	1.3 ± 0.11
Суммарные углеводы	15.6 ± 0.3	13.0 ± 0.4
Хлорофилл <i>a</i>	1.3 ± 0.01	0.46 ± 0.02
Каротиноиды	0.12 ± 0.01	0.03 ± 0.002
С-фикоцианин	2.0 ± 0.15	1.4 ± 0.07
Аллофикоцианин	0.05 ± 0.01	0.03 ± 0.01
Свободные нуклеотиды	2.6 ± 0.02	1.8 ± 0.15
РНК	3.1 ± 0.05	24.0 ± 1.4
ДНК	0.11 ± 0.01	0.16 ± 0.03

нении нами отмечена деструкция С-ФК (снижение содержания с 2.0 ± 0.15 до $1.4 \pm 0.07\%$) и почти полное разрушение АФЦ (с $0.05 \pm 0.01\%$ до $0.03 \pm 0.01\%$) (табл. 1).

Количество ДНК возросло с 0.11 ± 0.005 до $0.16 \pm 0.03\%$, а РНК достоверно увеличивалось в 7.9 раз, с 3.1 ± 0.05 до $24.0 \pm 1.41\%$ (парный *t*-тест, $p < 0.05$). Необходимо отметить, что данные по содержанию нуклеиновых кислот для клеток *A. platensis* немногочисленны, однако известно, что количество РНК в 3–4 раза больше, чем ДНК (Ciferri, 1983). Величины всех биохимических показателей *A. platensis*, сохраняемой 4 года и 17 лет в состоянии ангидробиоза, представлены в табл. 1.

Таким образом, через 4 года хранения образцов были выявлены значимые изменения биохимического состава цианобактерий. По сравнению с только что обезвоженной пробой, на фоне стабильного содержания белка и углеводов, обнаружено снижение величин остальных показателей в 1.2–4.5 раза; для липидов, свободных нуклеотидов и пигментов различия были достоверными (парный *t*-тест, $p < 0.05$) (рис. 3, табл. 1). Вероятно, этот период являлся переломным при хранении клеток в обезвоженном состоянии.

После 17-ти лет хранения в ангидробиозном состоянии (по сравнению с обезвоженной пробой; Харчук, 2008) нами зафиксированы стабильное содержание белка и суммарных углеводов; однако количество липидов снизилось на порядок, свободных нуклеотидов – в 1.4 раза; для хлорофилла и каротиноидов снижение составляло 3.8 и 18 раз соответственно (рис. 3, табл. 1). Кроме того, отмечено снижение в 4–12 раз содержания С-ФЦ, белка фотосинтетического аппарата, собирающего свет и связывающего пигменты (Liu et al., 2016); аллофиоцианин разрушился практически полностью (табл. 1) (парный *t*-тест, $p < 0.05$). Известно, что С-ФЦ чувствителен к действию протеаз, света, кислорода, влаги и температуры, то есть легко разлагается в естественном состоянии (Kannaujia, Sinha, 2015). Соотношение С-ФЦ/АФЦ определяет перенос энергии от фикобилисом к хлорофиллу *a* во время фотосинтеза (Vonshak, 1997). Вероятно, полученные нами низкие величины содержания липидов и пигментов (хлорофилла *a*, каротиноидов, С-ФЦ, АФЦ) в клетках цианопрокариот (табл. 1, рис. 3) косвенно указывают на деструкцию пигментно-липидного комплекса.

Известно, что *A. platensis* обладает мощным потенциалом аминокислотного синтеза, поэтому уровень белка может достигать чрезвычайно высоких величин до 70–74% сухого вещества (Vonshak, 1997). Белки составляют более половины сухого вещества цитоплазматической мембраны цианопрокариот, входят в состав клеточной оболочки. Фикобилипротеины фотосинтетического аппа-

рата (которые тоже входят в белковый пул) могут достигать 20% массы всех водорастворимых белков, выполняя при этом роль резервных веществ (Rowan, 1989; Стадничук, 1990). Однако, как указывалось выше, при длительном хранении нами обнаружены крайне низкие величины С-ФЦ, АФЦ. Вероятно, относительно высокие показатели содержания белка (55.3–61.2%) в клетках цианобактерий при длительном хранении объясняются другими факторами.

Следует отметить, что после 4-х лет хранения *A. platensis* количество РНК практически не изменилось по сравнению с только что обезвоженной пробой (Харчук, 2008), а через 17 лет наблюдалось достоверное увеличение содержания в 6.9 раз (парный *t*-тест, $p < 0.05$) (рис. 3, табл. 1). Возможно, высокие показатели содержания белка в обезвоженной биомассе цианобактерий, а также увеличение содержания РНК (обнаруженное через 17 лет) можно объяснять вкладом ассоциированной микрофлоры.

Микроскопические исследования микрофлоры, ассоциированной с культурой *A. platensis*. Учитывая, что исследования были выполнены на альгологически чистой, но не аксеничной культуре цианобактерий, мы предположили, что на изменение биохимических показателей и на жизнеспособность клеток *A. platensis* действительно могла влиять сопутствующая микрофлора.

Прямым методом взвешиваний показано, что доля микрофлоры при физико-химической обработке метанолом, ультразвуком и центрифугированием составляла $8.3 \pm 4.4\%$ (при диапазоне 3.3–11.3%).

По данным электронной микроскопии бактериальные клетки были обнаружены вне клеток *A. platensis* (рис. 4а), а также в слизевом чехле (рис. 4б) и на поверхности цианобактерий (рис. 4в). В морфологической структуре микрофлоры в культуре *A. platensis*, реактивированной после состояния анабиоза, нами выделены 3 основные группы (табл. 2): палочковидные, округлые и извитые формы (Шлегель, 1987; Слизень и соавт., 2020). В сообществе преобладали палочковидные формы, среди которых доминировали крупные палочки (60.5%) объемом 0.33 ± 0.05 мкм³; длина клеток изменялась от 0.44 до 12.54 мкм, ширина – от 0.19 до 1.19 мкм (табл. 2, рис. 5а, 5б, 5г). Мелкие палочки объемом 0.13 ± 0.02 мкм³, длиной 0.45–2.01 мкм и шириной 0.26–0.58 мкм (рис. 5ж) встречались с частотой 14.4%. Мицелиальные формы (тонкие нити) длиной 1.08–8.49 мкм, шириной 0.13–0.25 мкм и объемом 0.11 ± 0.03 мкм³ составляли 12.4% от общего числа микроорганизмов (рис. 5а, 5в). Еще реже попадались округлые формы (кокки) (рис. 5д) диаметром 0.14–0.82 мкм, объемом 0.10 ± 0.04 мкм³ (6.5%) и извитые формы (4.4%) объемом 0.22 ± 0.10 мкм³ (рис. 5е). Единичными были цепочки

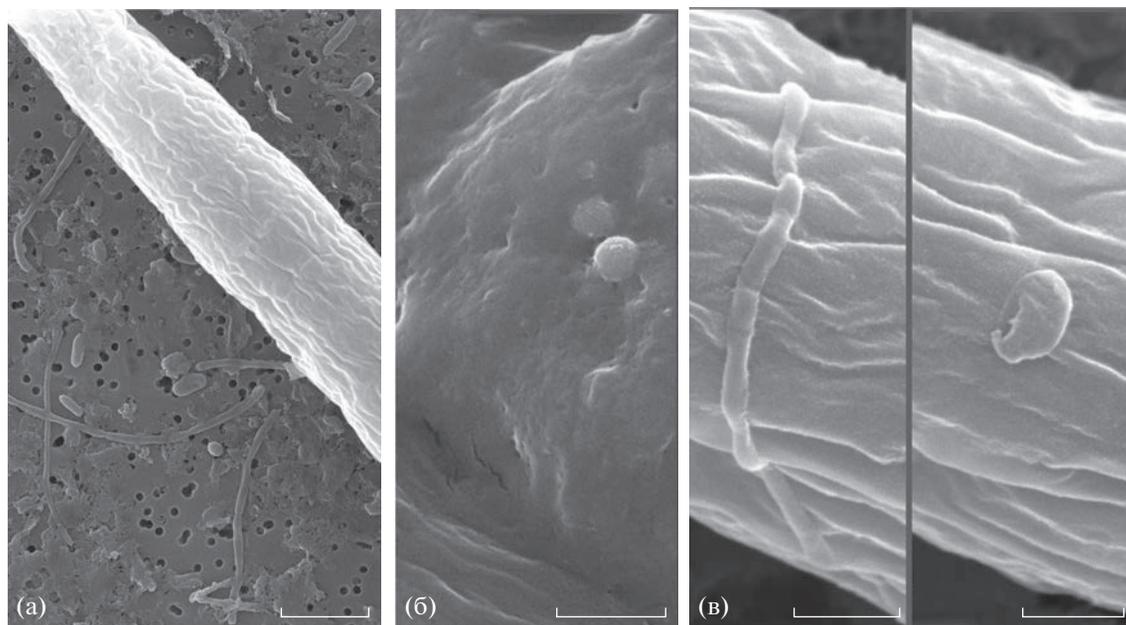


Рис. 4. Электронные микрофотографии сопутствующей микрофлоры в культуре *A. platensis*: а – общий вид микробиома; б – бактериальные клетки в слое слизи; в – бактерии на поверхности слизевого чехла *A. platensis*. Масштабная линейка: а – 3 мкм; б, в – 1 мкм.

Таблица 2. Морфологические показатели сопутствующей микрофлоры в культуре при реактивации *A. platensis*

Морфотипы	% встречаемости	Размеры, мкм		Объем, мкм ³
		длина/диаметр	ширина	
Крупные палочки	60.5	$\frac{1.53 \pm 0.23}{0.44-12.54}$	$\frac{0.48 \pm 0.06}{0.19-1.19}$	$\frac{0.33 \pm 0.05}{0.04-1.92}$
Мелкие палочки	14.4	$\frac{0.95 \pm 0.09}{0.45-2.01}$	$\frac{0.41 \pm 0.03}{0.26-0.58}$	$\frac{0.13 \pm 0.02}{0.04-0.20}$
Палочки в цепочках	1.8	$\frac{0.87 \pm 0.08}{0.63-1.32}$	$\frac{0.36 \pm 0.01}{0.29-0.40}$	$\frac{0.11 \pm 0.01}{0.03-0.16}$
Округлые формы (кокки)	6.5	$\frac{0.51 \pm 0.10}{0.14-0.82}$	–	$\frac{0.10 \pm 0.04}{0.001-0.29}$
Извитые формы	4.4	$\frac{3.14 \pm 1.17}{0.27-6.13}$	$\frac{0.30 \pm 0.09}{0.11-0.59}$	$\frac{0.22 \pm 0.10}{0.01-0.61}$
Мицелиальные формы (тонкие нити)	12.4	$\frac{3.54 \pm 0.72}{1.08-8.49}$	$\frac{0.20 \pm 0.01}{0.13-0.25}$	$\frac{0.11 \pm 0.03}{0.02-0.33}$
Средний объем бактерий				$\frac{0.27 \pm 0.04}{0.01-2.86}$

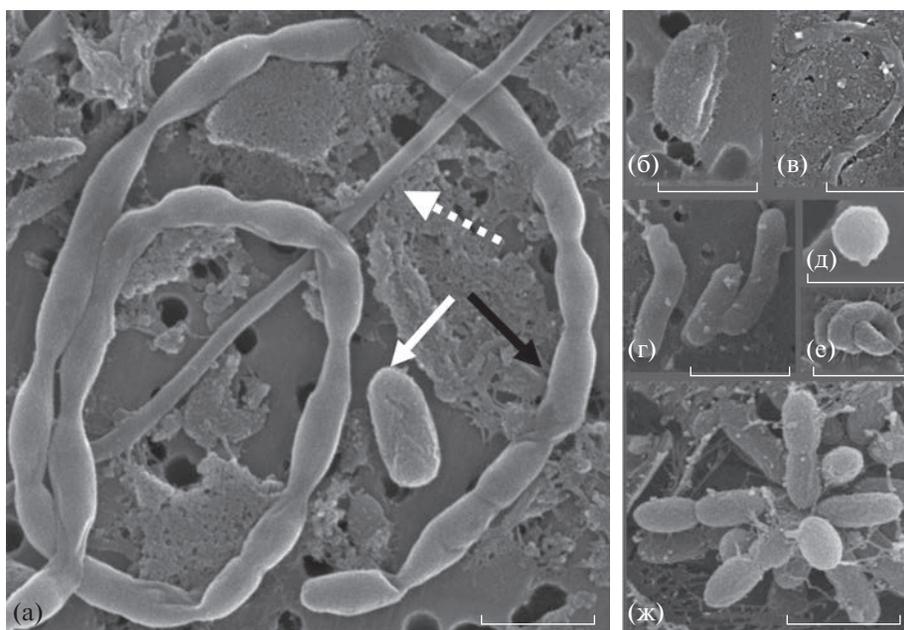


Рис. 5. Электронные микрофотографии сопутствующей микрофлоры в культуре реактивированной *A. platensis*: а – белой стрелкой обозначена крупная палочка; черной стрелкой – палочки, объединенные в цепочку; белой стрелкой с пунктирными линиями – мицелиальная форма микроорганизмов (тонкая нить); б – крупная палочка; в – мицелиальная форма; г – крупные палочки; д – кокк; е – извитая форма; ж – мелкие палочки. Масштабная линейка – 1 мкм.

палочек длиной 0.63–1.32 мкм, шириной 0.29–0.40 мкм и объемом 0.11–0.01 мкм³; длина таких цепочек достигала 7.38–27.06 мкм (рис. 5а).

В среднем объем бактериальной клетки, рассчитанный по измерениям 300 клеток, составлял 0.27 ± 0.04 мкм³ (изменяясь 0.001–2.86 мкм³). Интересно отметить, что среди крупных палочек и извитых форм часто встречались клетки с выростами, предположительно, пиями (белкового происхождения) или полисахаридными тяжами (рис. 5б, 5е).

Известно, что микрофлора, связанная с культурами *A. platensis*, как правило, немногочисленна и непатогенна. Высокая щелочность культуральной среды (рН 8.5–11.0) является барьером для проникновения бактерий, дрожжей, грибов или водорослей. Некоторые вещества, выделяемые *A. platensis* или содержащиеся в ней, обладают бактерицидным или бактериостатическим действием (Falquet, Hurni, 2006). Согласно литературным данным, в культуре спирулины обычно содержится от 3×10^4 до 6×10^5 кл. мл⁻¹; в сухой биомассе спирулины – от 10^3 до 10^6 жизнеспособных организмов на 1 г (Velji, Albright, 1986; Falquet, Hurni, 2006). Необходимо отметить, что подобные исследования были выполнены классическими микробиологическими методами посева бактерий на питательные среды. По данным прочной цитометрии для культур различных микроводорослей численность бактерий составляла около 10^5 – 10^7 кл. мл⁻¹ (Рауэн и соавт., 2011). На-

ми также подтверждено наличие большого количества бактериальных клеток в суспензии реактивированной *A. platensis* (рис. 4а).

Таким образом, изменения биохимического состава (разрушение липидно-пигментного комплекса), а также показатели жизнеспособности клеток цианобактерий (большая доля мертвых и необратимо поврежденных клеток) при длительном хранении *A. platensis* в обезвоженном состоянии указывают на глобальные негативные перестройки в культуре цианобактерий. За счет разрушенных клеток *A. platensis* повышается пул органических субстратов, что может стать толчком для развития гетеротрофных микроорганизмов (Тархова, 2008; Mogale, 2016; Vardaka et al., 2016). Возможно, полученное нами достаточно стабильное содержание белка и увеличение количества нуклеиновых кислот в трихомах *A. platensis* при длительном хранении и объясняется развитием ассоциированной микрофлоры. Известно, что в процентном отношении от сухого вещества (в целом для бактериальных клеток) доля белка достигает 72–78%, количество липидов и нуклеиновых кислот составляет 1.5–3 и 8–16% соответственно (Nalage et al., 2016).

Таким образом, обилие микрофлоры, обнаруженной в культуре реактивированных цианобактерий (рис. 4а), и рассчитанный вклад бактериальной составляющей (3.3–11.3%) в биомассу спирулины указывает на то, что влияние ассоциированной микрофлоры на биохимический со-

став высушенной биомассы *A. platensis* при длительном ее хранении в обезвоженном состоянии нельзя игнорировать. Кроме того, контроль количества гетеротрофных бактерий в сухой биомассе *A. platensis* является отправной точкой для дальнейших исследований по выращиванию и переработке биомассы цианобактерий в коммерческих целях (Vardaka et al., 2016).

Таким образом, результаты биохимического анализа *A. platensis*, сохраняемой в состоянии ангидробиоза длительное время (4 года и 17 лет), показали, что количество белка (55.3–61.2%) и суммарных углеводов (13.0–15.6%) в целом соответствовало данным, полученным ранее при закладке этих же образцов на хранение. Содержание липидов (1.3–11.0%), свободных нуклеотидов (1.8–2.6%) и пигментов было низким (0.46–1.3 и 0.03–0.12% соответственно для хлорофилла *a* и каротиноидов). Отмечена деструкция С-фикоцианина до 1.4–2.0% и почти полное разрушение аллофикоцианина 0.03–0.05%, что является косвенным признаком разрушения фотосинтетической системы. Микроскопические исследования показали, что в реактивированной культуре *A. platensis* (17 лет хранения) доминировали мертвые (65.8%) и необратимо поврежденные клетки (34.3%). Количество ДНК (через 4 г. и 17 лет хранения) увеличивалось с 0.11 до 0.16%, а РНК достигало 3.1–24.0%. Вероятно, стабильное содержание белка и возрастание количества нуклеиновых кислот (особенно РНК) происходило за счет активного развития сопутствующей микрофлоры, ассоциированной с *A. platensis*. В морфологической структуре микробиома (после 17 лет хранения сухой биомассы *A. platensis*) выделены 3 основные группы (палочковидные, округлые и извитые формы), среди которых доминировали палочковидные формы. Крупные палочки составляли 60.5%, мелкие палочки, нитевидные, извитые и округлые формы (кокки) встречались реже. В среднем объем бактериальной клетки составлял 0.27 ± 0.04 мкм³; вклад бактерий в биомассу *A. platensis* изменялся от 3.3 до 11.3% (в среднем $8.3 \pm 4.4\%$) от сухого вещества цианобактерий. Высказано предположение, что на биохимические показатели и жизнеспособность цианобактерий оказывала влияние сопутствующая микрофлора.

На основании полученных результатов показано, что хранение *A. platensis* в обезвоженном состоянии в течение 17 лет является нецелесообразным. Для длительного хранения рекомендовано использовать монокультуру цианобактерий, очищенную от сопутствующей микрофлоры и в стерильных вакуумных упаковках.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность В.Н. Лишаеву за помощь при работе на электронном микроскопе,

А.Б. Боровкову за ценные замечания, которые позволили улучшить текст статьи.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственного задания ФИЦ ИнБЮМ РАН по теме “Исследование механизмов управления продукционными процессами в биотехнологических комплексах с целью разработки научных основ получения биологически активных веществ и технических продуктов морского генезиса” (№ госрегистрации 121030300149-0).

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

- Агамова А.И. Руководство по современным биохимическим методам исследования водных экосистем, перспективных для промысла и марикультуры. М.: Изд-во ВНИРО, 2004. 123 с.
- Бекер М.Е., Дамберг Б.Э., Рапопорт А.И. Анабиоз микроорганизмов. Рига: Зинатне, 1981. 252 с.
- Гевориз Р.Г., Нехорошев М.В. Количественное определение массовой доли С-фикоцианина и аллофикоцианина в сухой биомассе *Spirulina (Arthrospira) platensis* North. Geitl. Холодная экстракция, Севастополь 2017 // Электронный ресурс <https://repository.marine-research.org/handle/299011/46> (дата обращения 19.10.2021).
- Копытов Ю.П., Дивавин И.А., Цымбал И.М. Схема комплексного биохимического анализа гидробионтов // “Рациональное использование ресурсов моря – важный вклад в реализацию продовольственной программы”: материалы конф. ИнБЮМ АН УССР. Севастополь, 1985. Т. 4.2. С. 227–231. Деп. в ВИНТИ 16.04.85, № 2556–85.
- Мейсель М.Н., Медведева Г.А., Алексеева В.М. О выявлении живых, поврежденных и мертвых микроорганизмов // Микробиология. 1961. Т. 30. С. 855–862.
- Рауэн Т.В., Ханайченко А.Н., Муханов В.С. Влияние микроводорослей и их фильтратов на численность бактерий в среде выращивания камбалы калкана // Морской экологический журн. 2011. Т. 10. № 3. С. 48–56.
- Рылькова О.А., Гулин С.Б., Пименов Н.В. Определение общей численности микроорганизмов в донных осадках Черного моря методом проточной цитометрии // Микробиология. 2019. Т. 88. С. 685–694.
- Rylkova O.A., Gulina S.B., Pimenov N.V. Determination of the total microbial abundance in Black Sea bottom sediments using flow cytometry // Microbiology (Moscow). 2019. V. 88. P. 700–708.
- Сиренко Л.А., Сакевич А.И., Осипович Л.Ф. Методы физиолого-биохимического исследования водорослей в

- гидробиологической практике. Киев: Наукова думка, 1975. 247 с.
- Слизень В.В., Кирильчик Е.Ю., Шабан Ж.Г., Черношей Д.А., Канашкова Т.А. Лабораторный практикум по общей микробиологии. 5-е изд. Минск: БГМУ, 2020. 80 с.
- Спирин А.С. Спектрофотометрическое определение суммарного количества нуклеиновых кислот // Биохимия. 1958. Т. 23. С. 656–662.
- Стадничук И.Н. Фикобилипротеины. Итоги науки и техники. Сер. Биол. химия. М. ВИНТИ, 1990. Т. 40. 196 с.
- Тархова Э.П. Микроорганизмы, сопутствующие *Spirulina platensis* в накопительной питательной культуре // Экология моря. 2005. Вып. 70. С. 49–52.
- Харчук И.А. Влияние длительности хранения на жизнеспособность клеток *Spirulina platensis* (Nordst.) в состоянии ангидробиоза // Экология моря. 2007. Вып. 74. С. 80–83.
- Харчук И.А. Динамика компонентов биохимического состава *Spirulina platensis* Nordst. при ангидробиозе // Экология моря. 2008. Вып. 76. С. 67–71.
- Харчук И.А. Способ длительного хранения микроводорослей. RU 2541452 С1 от 10.02.2015.
- Харчук И.А. Динамика жизнеспособности и компонентов биохимического состава *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* (Nordst) Gomont в зависимости от температуры дегидратации при переводе в состояние ангидробиоза // Вопросы современной альгологии. 2018. № 1(16). <http://algology.ru/1258>
- Шлегель Г. Общая микробиология. М.: Мир, 1987. 566 с.
- Bratbak G., Kemp P.F., Sherr B.F., Sherr E.B., Cole J.J. Microscope methods for measuring bacterial biovolume: Epifluorescence microscopy, scanning electron microscopy, and transmission electron microscopy // Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology / Eds. Cole J.J. Boca Raton: CRC Press, 1993. Ch. 36. P. 309–317. <https://doi.org/10.1201/9780203752746>
- Ciferri O. *Spirulina*, the edible microorganism // Microbiol. Rev. 1983. V. 47. P. 551–578.
- Falquet J., Hurni J.P. Spiruline Aspects Nutritionnels. Antenna Technologies, 2006. 41 p.
- Faucher O., Coupal B., Leduy A. Utilization of seawater – urea as a culture medium for *Spirulina maxima* // Can. J. Microbiol. 1979. V. 25. P. 752.
- Kallmeyer J., Smith D.C., Spivac A.J., D'Hondt S. New cell extraction procedure applied to deep subsurface sediments // Limnol. Oceanogr. Methods. 2008. V. 6. P. 236–245.
- Kannaujiya V.K., Sinha R.P. Thermokinetic stability of phycocyanin and phycoerythrin in food-grade preservatives // J. Appl. Phycol. 2016. V. 28. P. 1063–1070. <https://doi.org/10.1007/s10811-015-0638-x>
- Liu Q., Huang Y., Zhang R., Cai T., Cai Y. Medical application of *Spirulina platensis* derived C-phycoerythrin // Evid. Based Complement. Alternat. Med. 2016. V. 2016. 14 p. Art. 7803846. <https://doi.org/10.1155/2016/7803846>
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.P. Protein measurement with folin phenol reagent // J. Biol. Chem. 1951. V. 193. P. 265–275.
- Lunau M., Lemke A., Walther K., Martens-Habbena W., Simon M. An improved method for counting bacteria from sediments and turbid environments by epifluorescence microscopy // Environ. Microbiol. 2005. V. 7. P. 961–968.
- Mogale M. Identification and quantification of bacteria associated with cultivated *Spirulina* and impact of physiological factors. University of Cape Town, 2016. <http://hdl.handle.net/11427/22921>
- Nalage D., Khedkar G., Kalyankar A., Sarkate A., Ghodke S., Bedre V.B., Khedkar C.D. Single cell proteins // The Encyclopedia of Food and Health / Eds. Caballero B., Finglas P., Toldra F. London, UK: Oxford, Academic Press, 2016. V. 4. P. 790–794.
- Rowan K.S. Photosynthetic Pigments of Algae. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1989. 334 p.
- Vardaka E., Kormas K.A., Katsiapi M., Genitsaris S., Moustaka-Gouni M. Molecular diversity of bacteria in commercially available “*Spirulina*” food supplements // PeerJ. 2016. V. 4. P. 1610.
- Velji M.I., Albright L.J. Microscopic enumeration of attached marine bacteria of seawater, marine sediment, fecal matter and kelp blade samples following pyrophosphate and ultrasound treatments // Can. J. Microbiol. 1986. V. 32. P. 121–126.
- Vonshak A. (ed.) *Spirulina platensis* (*Arthrospira*). Physiology, Cell-Biology and Biotechnology. CRC Press, 1997. 233 p.

State of Cyanobacteria *Arthrospira platensis* and of Associated Microflora during Long-Term Storage in the State of Anhydrobiosis

I. A. Kharchuk¹, O. A. Rylkova¹, *, and N. M. Beregovaya¹

¹Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas, Russian Academy of Sciences, Sevastopol, 299011 Russia

*e-mail: ol.rylkova@yandex.ru

Received April 5, 2022; revised June 23, 2022; accepted June 24, 2022

Abstract—The biochemical composition of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* (Nordstedt) Gomont after long-term storage in the state of anhydrobiosis (4 years, 17 years) was determined by the standard methods. It was shown that protein content (55.3–61.2%) and total carbohydrates content (13.0–15.6%) in cyanobacterial cells were in agreement with the data known from the literature and with our results obtained at the onset of storage. The biomass had low content of free nucleotides (1.8–2.6%), lipids (1.3–11.0%), and especially pigments (0.5–1.3, 0.03–0.12, 1.4–2.0, 0.03–0.05% for chlorophyll *a*, carotenoids, C-phycoerythrin, and allophycoerythrin, respectively). The content of nucleic acids content was 3.1–24.0 and 0.11–0.16% for RNA and

DNA, respectively. Microscopic examination of *A. platensis* (17 years of storage) showed high numbers of irreversibly damaged and dead cells (34.2 and 65.8%, respectively). To determine the quantitative and morphological parameters of associated microflora, a complex physicochemical treatment (methanol, ultrasound, and centrifugation) of the reactivated cyanobacterial suspension proved the most efficient. Three main groups were distinguished in the morphological structure of the microbiome (rod-shaped, rounded, and convoluted forms). The community was dominated by rod-shaped forms: large and small rods accounted for 60.5 and 14.4%, respectively. Mycelial forms (thin filaments), cocci, and convoluted forms were less common. On average, the volume of a bacterial cell was $0.27 \pm 0.04 \mu\text{m}^3$. The contribution of bacteria to the biomass of *A. platensis* varied from 3.3 to 11.3% ($8.3 \pm 4.4\%$ on average) of the dry weight of *A. platensis*. It has been suggested that the biochemical parameters and viability of cyanobacteria were affected by the accompanying microflora.

Keywords: cyanobacteria, *Arthrospira (Spirulina) platensis*, biochemical composition, cell viability, associated microflora, anhydrobiosis

ОБНАРУЖЕНИЕ МИКРОЦИСТИН-ПРОДУЦИРУЮЩИХ ЦИАНОБАКТЕРИЙ *MICROCYSTIS*, *PLANKTOTHRIX* И *DOLICHOSPERMUM* С ПОМОЩЬЮ МУЛЬТИПРАЙМЕРНОЙ АМПЛИФИКАЦИИ ГЕНОВ *mscY*

© 2023 г. С. И. Сиделев*

Ярославский государственный университет, Ярославль, 150057 Россия

*e-mail: Sidelev@mail.ru

Поступила в редакцию 19.05.2022 г.

После доработки 22.06.2022 г.

Принята к публикации 24.06.2022 г.

На основе мультипраймерной ПЦР разработан способ одновременной молекулярной детекции продуцентов микроцистинов – планктонных цианобактерий родов *Microcystis*, *Planktothrix* и *Dolichospermum*. Отобраны три пары родоспецифичных праймеров для амплификации генов *mscY* биосинтеза микроцистинов; четвертая пара праймеров использована для амплификации межгенного спейсера (IGS) *srcBA*, служащего внутренним положительным контролем присутствия цианобактериальной ДНК в анализируемых образцах. Успешно амплифицированы четыре ПЦР-продукта ожидаемого размера с использованием смеси матриц ДНК микроцистин-продуцирующих штаммов *Microcystis aeruginosa*, *Planktothrix agardhii* и природных колоний *Dolichospermum lemmermannii*, а также матрицы “природной” ДНК из озерного планктона. Предлагаемый способ может найти применение для разработки удобных тест-систем мониторинга водоемов с целью предотвращения и/или оценки риска накопления опасных цианобактериальных токсинов.

Ключевые слова: гены *mscY*, микроцистины, мультипраймерная ПЦР, цианобактерии

DOI: 10.31857/S0026365622600420, **EDN:** NMQRUZ

Токсичные цианобактериальные цветения, вызванные неконтролируемым антропогенным загрязнением водоемов фосфором и азотом, весьма распространены (Toxic Cyanobacteria..., 2021). В пресной воде чаще всего встречаются гепатотоксичные микроцистины (MC). Они относятся к классу циклических пептидов и имеют общую структуру: цикло-(DAla–X–DMeAsp–Z–AddA–DGlu–Mdha), где DAla – D-аланин, X и Z – L-аминокислоты (лейцин, аргинин и др.), DMeAsp – D-эритро-β-метиласпарагиновая кислота, AddA – (2S,3S,8S,9S)-3-амино-9-метокси-2,6,8-триметил-10-фенилдека-4,6-диеновая кислота, DGlu – D-глутаминовая кислота и Mdha – N-метилдегидроаланин. MC продуцируются планктонными цианобактериями из родов *Microcystis*, *Dolichospermum* и *Planktothrix*; неоднократно были описаны случаи массового отравления животных и людей, в том числе со смертельным исходом (Toxic Cyanobacteria..., 2021).

В отношении биологической активности MC являются ингибиторами эукариотических протейнфосфатаз 1 и 2A; они вызывают окислительный стресс с разрушением гепатоцитов, а также служат канцерогенными и мутагенными факторами (Toxic Cyanobacteria..., 2021). Из-за их чрезвычай-

но высокой токсичности ВОЗ ввела безопасный норматив содержания MC-LR в питьевой воде – 1 мкг/л, который был недавно утвержден СанПиНом РФ 1.2.3685-21 в качестве ПДК для поверхностных водных объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования.

Генетические основы биосинтеза MC хорошо изучены. Кластер генов микроцистинсинтетаз (*mscY*) обнаружен и секвенирован, в частности, у представителей родов *Microcystis* (Tillett et al., 2000), *Planktothrix* (Christiansen et al., 2003) и *Dolichospermum* (Rouhiainen et al., 2004). MC синтезируются мультиферментным комплексом, состоящим из пептидсинтетаз (NRPS), поликетидсинтаз (PKS) и ряда модифицирующих ферментов. Он осуществляет активацию, модификацию и включение аминокислот в состав молекул MC. Кластер генов *mscY* *M. aeruginosa* имеет размер 55 тысяч пар нуклеотидов (т.п.н.) и состоит из 10 генов, объединенных в опероны *mscYABC* и *mscYDEFGHIJ*, которые транскрибируются в противоположных направлениях от промоторного участка, расположенного между генами *mscYA* и *mscYD* (Tillett et al., 2000). Установлено (Molecular Tools..., 2017), что кластеры *mscY* у вышеуказанных родов цианобактерий

различаются как в расположении и количестве, так и в нуклеотидных последовательностях генов. Это заложило основу для разработки способов обнаружения токсичных цианобактерий в природных образцах с помощью метода полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Таксономическое определение продуцентов МС играет важную роль во всех существующих программах контроля и предупреждения вредоносных цианобактериальных цветений (англ. cyanobacterial Harmful Algal Blooms), притом что токсигенные и нетоксигенные штаммы цианобактерий морфологически не отличаются друг от друга (Molecular Tools..., 2017). После идентификации потенциальных продуцентов МС рекомендуется мониторинг их природного развития, особенно в водоемах питьевого назначения, с использованием доступных и дешевых методов, таких как световая микроскопия (Toxic Cyanobacteria..., 2021).

Одно время единственным способом диагностики потенциальных продуцентов МС было выделение штаммов из природных образцов и подтверждение этого свойства в культуре. Однако для рутинного экологического мониторинга данный подход слишком трудоемок.

Диагностика планктонных продуцентов МС на уровне рода без выделения и культивирования штаммов стала возможной благодаря использованию родоспецифичных праймеров для амплификации генов биосинтеза МС с использованием матрицы природной ДНК (англ. environmental DNA). Для молекулярной детекции МС-продуцирующих цианобактерий в обход их таксономической идентификации разработано и апробировано много надежных протоколов монопраймерной ПЦР (Molecular Tools..., 2017).

В настоящей работе исследована возможность одновременной идентификации в природных образцах продуцентов МС из родов *Microcystis*, *Planktothrix* и *Dolichospermum* с использованием мультипраймерной амплификации генов *msc*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализируемые объекты. МС-продуцирующие коллекционные штаммы *M. aeruginosa* (PCC 7806) и *P. agardhii* (NIVA-CYA 126/8) были любезно предоставлены профессором Элькой Диттманн (Университет Потсдама, Германия) и выращивались в питательной среде BG11 (Rippka et al., 1979) при температуре 25°C и 12-часовом световом периоде (плотность потока ФАР 30 мкмоль квантов м⁻² с⁻¹). Природные колонии *D. lemmermannii* были изолированы из планктона оз. Рюмниково (Ярославская обл.) согласно методике, описанной в работе (Kurmayer, 2017), и использовались для выделения из них ДНК.

“Природная” ДНК была выделена из планктона водоемов, в которых ранее (Сиделев, 2014; Chernova et al., 2020): а) были обнаружены МС-продуцирующие представители родов *Microcystis*, *Planktothrix* и *Dolichospermum* с помощью молекулярных методов; б) были детектированы эти токсины в биомассе фитопланктона и в воде с помощью хромато-масс-спектрометрии.

Выделение ДНК. Препараты ДНК были выделены сорбционным методом с помощью набора Diatom DNA Prep 200 (“Лаборатория Изоген”, Россия) согласно инструкции производителя.

Подбор праймеров. Ключевым критерием подбора праймеров из имеющихся в свободном доступе была их специфичность в отношении генов *msc* *Microcystis*, *Planktothrix* и *Dolichospermum*. Причем были отобраны те пары праймеров, специфичность которых ранее была доказана как для культивируемых штаммов МС-продуцирующих цианобактерий, так и образцов планктона (Vaitomaa et al., 2003; Ouahid et al., 2005; Ostermaier, Kurmayer, 2009). Кроме того, при подборе праймеров были учтены различия в температуре плавления и размерах ПЦР-продуктов. Все праймеры были проанализированы с помощью программы OligoAnalyzer 1.0.2 (“Teemu Kuulasmaa”, Финляндия) на возможность образования вторичных структур (гомо- и гетеродимеров, шпилек) при проведении мультиплексной ПЦР. В итоге для мультипраймерной амплификации генов *msc* были отобраны три пары родоспецифичных праймеров. В качестве внутреннего положительного контроля присутствия в образцах цианобактериальной ДНК была использована четвертая пара праймеров – РСβF/РСαR, специфичных для спейсера *srcVA-IGS* между генами *srcA* и *srcB* (Neilan et al., 1995), участвующими в синтезе фикоцианина (табл. 1).

Условия проведения ПЦР. Реакция амплификации была проведена с использованием набора GenPak PCR Core (“Лаборатория Изоген”, Россия). Реакционная смесь объемом 40 мкл содержала по 2 мкл ДНК (исходная концентрация 10–100 нг/мкл) и 2 мкл каждого из праймеров (10 пкмоль/мкл). Программа амплификации: предварительная денатурация – 95°C/3 мин; 37 циклов амплификации – 95°C/30 с, 58°C/30 с, 72°C/1 мин; элонгация – 72°C/10 мин. Продукты ПЦР (ампликоны) были разделены методом электрофореза в геле 2%-ной агарозы и визуализированы в УФ-свете после окрашивания бромистым этидием.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты проведения мультипраймерной амплификации генов *msc* приведены на рис. 1. На дорожке 1 находятся полосы, соответствующие четырем ампликонам ожидаемых размеров, полученным из смеси ДНК *M. aeruginosa* PCC 7806,

Таблица 1. Общие сведения о мультипраймерной амплификации трех генов *msc* и межгенного спейсера *cpcBA*-IGS

Аmplифицируемый ген	Пара праймеров	Нуклеотидная последовательность праймера (5'→3')	Температура отжига, °С	Размер ампликона, п.н.
<i>mscD</i> (у микроцистин-продуцирующих видов р. <i>Microcystis</i>)	PKDF2 PKDR2	AGTTATTCTCCTCAAGCC CATTCGTTCCACTAAATCC (Ouahid et al., 2005)	52	859
<i>mscB</i> (у микроцистин-продуцирующих видов р. <i>Planktothrix</i>)	<i>mscB</i> A1F <i>mscB</i> A1R	ATTGCCGTTATCTCAAGCGAG TGCTGAAAAAACTGCTGCATTA (Ostermaier, Kurmayer, 2009)	60	76
<i>mscE</i> (у микроцистин-продуцирующих видов р. <i>Dolichospermum</i>)	<i>mscE</i> F2 AnamcyE-12R	GAAATTTGTGTAGAAAGGTGC CAATCTCGGTATAGCGGC (Vaitooma et al., 2003)	58	250
<i>cpcBA</i> -IGS (у фикоцианин-содержащих цианобактерий)	PCβF PCαR	GGCTGCTTGTTTACGCGACA CCAGTACCACCAGCAACTAA (Neilan et al., 1995)	55	685

P. agardhii NIVA–CYA 126/8 и *D. lemmermannii*. Такой же результат был получен для “природной” ДНК (дорожка б). Для сравнения приведены результаты независимо проведенных (в четырех ПЦР-системах) амплификаций ДНК разных МС-продуцирующих цианобактерий (дорожки 2–5).

Ранее были предприняты успешные попытки мультипраймерной амплификации генов *msc* с детекцией результатов методом гель-электрофореза (Ouahid et al., 2005; Valério et al., 2010). Однако эти исследования проводились с целью повы-

шения надежности обнаружения продуцентов МС за счет амплификации в одной реакционной пробирке нескольких генов из кластера *msc*. В настоящей работе продемонстрирована возможность идентификации родов МС-продуцирующих цианобактерий в ходе одной мультипраймерной ПЦР. Подобный подход по сравнению с монопраймерной ПЦР удобен тем, что значительно экономит реактивы и сокращает время получения результата при проведении экологического мониторинга токсичных цианобактерий.

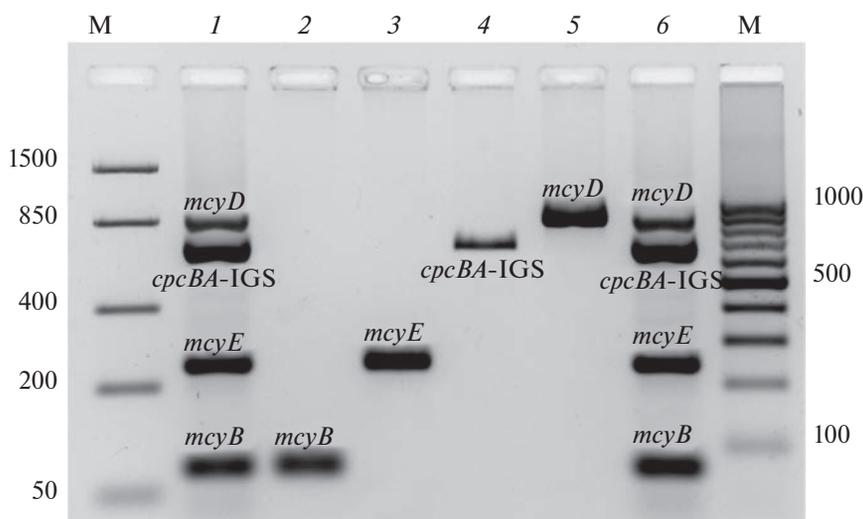


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов мультипраймерной амплификации трех генов *msc* и межгенного спейсера *cpcBA*-IGS. Дорожки: 1 – ампликоны *cpcBA*-IGS и трех генов биосинтеза МС *P. agardhii*, *M. aeruginosa* и *D. lemmermannii*; 2 – ампликон гена *mscB* *P. agardhii*; 3 – ампликон гена *mscE* *D. lemmermannii*; 4 – ампликон *cpcBA*-IGS; 5 – ампликон гена *mscD* *M. aeruginosa*; 6 – ампликоны *cpcBA*-IGS и трех генов биосинтеза МС “природной” ДНК. М – маркер молекулярной массы (п.н.).

Таким образом, на основе мультиплексной ПЦР разработан эффективный способ одновременной молекулярной детекции продуцентов МС — цианобактерий родов *Microcystis*, *Planktothrix* и *Dolichospermum*. Данный способ может найти применение для разработки удобных тест-систем мониторинга водоемов с целью предотвращения и/или оценки риска накопления опасных цианобактериальных токсинов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено в рамках Программы развития ЯрГУ (НИР № Р2-GL3-2022 “Молекулярно-генетические исследования, оценка физиолого-биохимического статуса и биотехнологического потенциала живых систем”).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет, что у него нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Сиделев С.И.* Молекулярно-генетическая идентификация микроцистин-продуцирующих таксонов цианобактерий в озере Неро (Россия) // *Микробиология*. 2014. Т. 83. С. 626–628.
- Sidelev S.I.* Molecular genetics identification of microcystin-producing cyanobacteria taxa in Lake Nero (Russia) // *Microbiology (Moscow)*. 2014. V. 83. P. 709–711.
- Chernova E., Sidelev S., Russkikh I., Korneva L., Solovyova V., Mineeva N., Stepanova I., Zhakovskaya Z.* Spatial distribution of cyanotoxins and ratios of microcystin to biomass indicators in the reservoirs of the Volga, Kama and Don rivers, the European part of Russia // *Limnologica*. 2020. V. 84. Art. 125819.
- Christiansen G., Fastner J., Erhard M., Börner T., Dittmann E.* Microcystin biosynthesis in *Planktothrix*: genes, evolution and manipulation // *J. Bacteriol.* 2003. V. 185. P. 564–572.
- Molecular Tools for Detection and Quantification of Toxic Cyanobacteria* / Eds. Kurmayer R., Sivonen K., Wilmotte A., Salmaso N. Hoboken, NJ: Wiley, 2017. 402 p.
- Kurmayer R.* Isolation of single cyanobacteria colonies/filaments // *Molecular Tools for Detection and Quantification of Toxic Cyanobacteria* / Eds. Kurmayer R., Sivonen K., Wilmotte A., Salmaso N. Hoboken, NJ: Wiley, 2017. P. 32–34.
- Neilan B., Jacobs D., Goodman A.E.* Genetic diversity and phylogeny of toxic cyanobacteria determined by DNA polymorphisms within the phycocyanin locus // *Appl. Environ. Microbiol.* 1995. V. 61. P. 3875–3883.
- Ostermaier V., Kurmayer R.* Distribution and abundance of nontoxic mutants of cyanobacteria in lakes of the Alps // *Microb. Ecol.* 2009. V. 58. P. 323–333.
- Ouahid Y., Pérez-Silva G., del Campo F.F.* Identification of potentially toxic environmental *Microcystis* by individual and multiple PCR amplification of specific microcystin synthetase gene regions // *Environ. Toxicol.* 2005. V. 20. P. 235–242.
- Rippka R., Deruelles J., Waterbury J.B., Herdman M., Stanier R.Y.* Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria // *J. Gen. Microbiol.* 1979. V. 111. P. 1–61.
- Rouhiainen L., Vakkilainen T., Siemer B.L., Buikema W., Haselkorn R., Sivonen K.* Genes coding for hepatotoxic heptapeptides (microcystins) in the cyanobacterium *Anabaena* Strain 90 // *Appl. Environ. Microbiol.* 2004. V. 70. P. 686–692.
- Tillett D., Dittmann E., Erhard M., von Döhren H., Börner T., Neilan B.A.* Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated peptide polyketide synthetase system // *Chem. Biol.* 2000. V. 7. P. 753–764.
- Toxic Cyanobacteria in Water* / Eds. Chorus I., Welker M. Boca Raton: CRC Press, 2021. 839 p.
- Vaitomaa J., Rantala A., Halinen K., Rouhiainen L., Tallberg P., Mokolke L., Sivonen K.* Quantitative real-time PCR for determination of microcystin synthetase gene *E* copy numbers for *Microcystis* and *Anabaena* in lakes // *Appl. Environ. Microbiol.* 2003. V. 69. P. 7289–7297.
- Valério E., Chambel L., Paulino S., Faria N., Pereira P., Tenreiro R.* Multiplex PCR for detection of microcystins-producing cyanobacteria from freshwater samples // *Environ. Toxicol.* 2010. V. 25. P. 251–260.

Detection of Microcystin-Producing Cyanobacteria *Microcystis*, *Planktothrix*, and *Dolichospermum* Using Multiprimer Amplification of the *mcy* Genes

S. I. Sidelev*

Yaroslavl State University, Yaroslavl, 150057 Russia

*e-mail: Sidelev@mail.ru

Received May 19, 2022; revised June 22, 2022; accepted June 24, 2022

Abstract—A multiprimer PCR-based technique for the joint molecular detection of microcystin-producing planktonic cyanobacteria of the genera *Microcystis*, *Planktothrix* and *Dolichospermum* was developed. To amplify the *mcy* genes of microcystin biosynthesis, three pairs of genus-specific primers were selected, while the

fourth pair was used to amplify the inter-gene spacer (IGS) *cpcBA* acting as an inner positive control for the presence of cyanobacterial DNA in the analyzed samples. Four PCR products of predicted size were successfully amplified using a mixture of DNA templates isolated from microcystin-producing strains of *M. aeruginosa*, *P. agardhii*, and field colonies of *D. lemmermannii* colonies retrieved from the environment, as well as an environmental DNA template from lake plankton. The proposed multiprimer PCR-based approach may be used to design convenient test systems for monitoring aquatic ecosystems to prevent and/or assess the risk of accumulation of harmful cyanobacterial toxins.

Keywords: *mcy* genes, microcystins, multiprimer PCR, cyanobacteria

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИ**

СИСТЕМА “КВОРУМ СЕНСИНГА” У *CHROMOBACTERIUM SUBTSUGAE* (РАНЕЕ *C. VIOLACEUM*) ИНГИБИРУЕТСЯ ГАММА-ЛАКТОНАМИ – МИНОРНЫМИ КОМПОНЕНТАМИ ЭКСТРАКТА ЛИСТЬЕВ ЭВКАЛИПТА

© 2023 г. К. С. Инчагова^а, Г. К. Дускаев^а, Д. Г. Дерябин^{а, *}

^аФедеральный научный центр биологических систем и агротехнологий
Российской академии наук, Оренбург, 460000 Россия

*e-mail: dgderabin@yandex.ru

Поступила в редакцию 16.08.2022 г.

После доработки 01.09.2022 г.

Принята к публикации 01.09.2022 г.

Целью работы является исследование природы ингибирования системы “кворум сенсинга” (QS) модельной бактерии *Chromobacterium subtsugae* 026 (ранее – *C. violaceum* 026) экстрактом листьев эвкалипта прутовидного (*Eucalyptus viminalis* Labill) с идентификацией в его составе молекул с соответствующим вариантом биологической активности. Тестирование цельного экстракта показало выраженную QS-ингибирующую активность, развивающуюся в широком диапазоне концентраций, в несколько десятков раз ниже требуемых для подавления бактериального роста (соотношение МИК₅₀/ЕС₅₀ = 43.6). Химический анализ обнаруживал в экстракте присутствие шести малых молекул растительного происхождения (пирогаллол, 2,3-дигидро-3,5-дигидрокси-6-метил-4Н-пиран-4-1, цимол, 4-((1E)-3-гидрокси-1-пропенил)-2-метоксифенол, галловая и пальмитиновая кислоты). QS-ингибирующий эффект этих соединений в отношении *Chromobacterium* spp. ранее был показан в экспериментах *in vitro* или предсказан на моделях *in silico*. Среди минорных компонентов анализируемого экстракта идентифицированы γ -капролактон и γ -октанолактон, структуры которых демонстрировали сходство с аутоиндукторами QS – ацилированными гомосеринлактонами. Исследование химически синтезированных аналогов данных молекул в биотесте на *C. subtsugae* 026 впервые показало наличие у них QS-ингибирующей активности, характеризуемой величинами ЕС₅₀ = 354.2 и 145.6 мкг/мл соответственно. Обогащение цельного экстракта листьев эвкалипта прутовидного γ -капролактоном или γ -октанолактоном существенно усиливало QS-ингибирующее действие подобных композиций, при изоболографическом анализе оцениваемое как взаимодополняющий (аддитивный) или взаимно потенцируемый (супераддитивный) эффекты.

Ключевые слова: quorum sensing, *Chromobacterium subtsugae*, *Eucalyptus viminalis*, γ -капролактон, γ -октанолактон

DOI: 10.31857/S0026365622600626, **EDN:** NMRUHT

“Кворум сенсинг” (англ.: quorum sensing, QS) – это процесс химической коммуникации между бактериальными клетками, основанный на осуществляемых ими биосинтезе, секреции, рецепции и скоординированном ответе на малые сигнальные молекулы, называемые аутоиндукторами (Whiteley et al., 2018). Итоговым результатом подобного взаимодействия является синхронное изменение профиля транскрипционной активности бактериальной популяции, наделяющее прокариотические сообщества некоторыми свойствами многоклеточных организмов (Mukherjee, Bassler, 2019).

Известным таксоном, реализующим феномен “кворум сенсинга”, является род *Chromobacterium*, у представителей которого межклеточная коммуникация опосредуется аутоиндукторами из группы ацилированных гомосеринлактонов (АГЛ),

образуемых синтазой CviI и воспринимаемых белком-рецептором CviR. Последний, присутствующий в цитоплазме бактериальных клеток в виде гомодимера, после взаимодействия с двумя молекулами АГЛ переходит из “закрытой” в “открытую” конформацию и связывается С-концевыми доменами с хромосомной ДНК в зонах палиндромов STGNCCNNNNGGNCAG, где активирует транскрипцию расположенных рядом генов: системы секреции VI типа (CV_1432), хитиназы (CV_4240), транскрипционного регулятора (CV_0577) и гуаниндезаминазы (CV_0578), а также синтазы *cviI*, что в последнем случае формирует каноническую петлю положительной обратной связи аутоиндукции (Stauff, Bassler, 2011). Наиболее же известным фенотипическим проявлением, находящимся под контролем “кворум

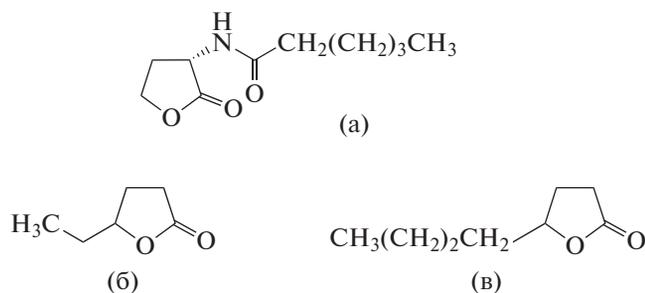


Рис. 1. Структурные формулы N-гексаноил-L-гомосерин лактона (а), γ -капролактона (б) и γ -октанолактона (в).

сенсинга” у *Chromobacterium* spp., является образование сине-фиолетового пигмента виолацеина, синтезируемого из аминокислоты триптофана под контролем *vioABCDE*-оперона, промотор которого также имеет сайт для специфического связывания белка CviR (Swem et al., 2009).

Поскольку биосинтез виолацеина позволяет прямо оценивать активность системы QS, хорошо визуально обнаруживается и доступен для количественной регистрации, основанный на нем биотест стал популярной моделью при исследовании различных аспектов “кворум сенсинга” у бактерий (Kothari et al., 2017). При этом наиболее востребованным для указанных целей является лабораторный штамм *C. violaceum* 026, производный от “дикого” изолята *C. violaceum* ATCC 31532, но, в отличие от последнего, имеющий инсерцию транспозона mini-Tn5 в гене синтазы *cviI* (McClellan et al., 1997). В результате указанного мутационного события *C. violaceum* 026 утратил способность к образованию собственного аутоиндуктора N-гексаноил-L-гомосеринлактона (C_6 -АГЛ) и, как следствие, спонтанному синтезу пигмента виолацеина, но сохранил возможность его восстановления в присутствии экзогенно вносимого C_6 -АГЛ. Несколько лет назад *C. violaceum* ATCC 31532 и производный от него лабораторный штамм CV026 были реклассифицированы как *C. subtsugae* (Hargison, Soby, 2020) с сохранением за ними исходных номеров в международных коллекциях и неизменности представлений о реализуемых ими механизмах межклеточной химической коммуникации.

Одним из направлений использования биотеста на основе *C. subtsugae* 026 является поиск ингибиторов “кворум сенсинга”, актуальность которого определяется наличием аналогичных стереотипно устроенных систем у широкого круга зоопатогенных и фитопатогенных протеобактерий, использующих химическую коммуникацию для скоординированной экспрессии факторов вирулентности и образования биопленок (Remy et al., 2018). При этом на фоне разнообразия предлагаемых подхо-

дов, включающих химическую инактивацию аутоиндукторов, блокаду воспринимающих их рецепторных белков, а также запускаемых ими внутриклеточных сигнальных каскадов (Zhou et al., 2020), привлекательной альтернативой является поиск природных ингибиторов “кворум сенсинга”, присутствующих в составе лекарственных растений, используемых традиционной (народной) медициной для терапии широкого спектра инфекционных состояний (Дерябин и соавт., 2021). В частности, в одной из наших предшествующих работ скрининг широкого спектра восточно-европейских лекарственных растений показал наиболее выраженную способность к ингибированию “кворум сенсинга” у экстрактов коры дуба и листьев эвкалипта (Tolmacheva et al., 2014). В свою очередь химический анализ экстракта коры дуба позволил идентифицировать в нем молекулярную композицию из семи биоактивных соединений, в совокупности воспроизводящих не менее 95% QS-ингибирующего эффекта исходного растительного экстракта (Deryabin, Tolmacheva, 2015).

Целью настоящего исследования явилось продолжение работ в обозначенном направлении, а именно – анализ природы QS-ингибирующей активности экстракта листьев эвкалипта с идентификацией в нем известных и новых растительных молекул, эффективно ингибирующих “кворум сенсинг” в биотесте на *C. subtsugae* 026 (ранее – *C. violaceum* 026).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Бактериальный штамм. В работе использован лабораторный штамм *C. subtsugae* 026 = NCTC 13274, полученный из National Collection of Type Cultures (UK Health Security Agency, Великобритания). Его генетические особенности, включающие инсерцию транспозона mini-Tn5 в ген синтазы *cviI*, а также сохранение функциональных *cviR* гена и *vioABCDE*-оперона, описаны выше.

Культивирование данного штамма проводили на LB-бульоне при 27°C. Индукцию QS-контролируемого биосинтеза виолацеина запускали внесением химически синтезированного аналога C_6 -АГЛ с чистотой $\geq 98\%$ (CAS 147852-83-3) (“Cauman Chemicals”, США), структурная формула которого приведена на рис. 1а.

Растительный материал. Объектом исследования являлись листья эвкалипта прутовидного (международное название согласно APG II – *Eucalyptus viminalis* Labill), находящиеся в сухом измельченном виде в составе коммерчески доступного препарата производства АО “Красногорсклексредства” (Россия); № ЛСР-000609/08, дата выпуска – 11/2021.

Для получения экстракта, в соответствии с инструкцией производителя, к 24 г растительного материала добавляли 200 мл стерильной дистиллированной воды, кипятили на водяной бане (100°C) в течение 15 мин, после чего охлаждали при комнатной температуре в течение 45 мин. Полученный водный экстракт центрифугировали при 1000 об./мин в течение 10 мин для удаления твердых частиц, а супернатант дополнительно фильтровали через шприцевой фильтр из полиэфирсульфона (“Membrane Solutions LLC”, США) с размером пор 0.4 мкм. Полученный экстракт высушивали при 60°C, взвешивали (выход составил 2.94 г или 12.25% от веса исходного растительного материала) и хранили при –20°C. Дальнейшие эксперименты выполняли исходя из весовых характеристик сухого экстракта, перерабатывая его в метаноле (для химического анализа) или стерильной дистиллированной воде (для биологического тестирования).

Химический анализ. Исследование компонентного состава экстракта листьев эвкалипта прутовидного проводили методом газовой хроматографии с масс-спектрометрией (ГХ-МС).

Предварительно 10 мг исследуемого сухого экстракта вносили в 1 мл метанола и тщательно перемешивали. Последующий анализ выполняли с использованием газового хроматографа с масс-селективным детектором QCMS-QP 2010 Plus (“Shimadzu”, Япония), снаряженного колонкой HP-5MS (длина 30.0 м, диаметр 0.25 мм). Исследуемый образец объемом 10 мкл вводили в аналитическую ячейку хроматографа с помощью микрошприца Gastight 1700 (“Hamilton”, США). В качестве газа-носителя использовали гелий (99.999%) при постоянной скорости потока 1 мл/мин. Исходная температура печи колонки составляла 100°C; температуру повышали со скоростью 20°C/мин до 290°C. Инжектор устанавливали на 200°C, а детектор на 290°C.

Первичную обработку полученных хроматограмм и масс-спектров проводили с использованием штатного программного обеспечения: GC-MS Solutions и GC-MS PostRun Analysis (“Shimadzu”, Япония). Окончательную идентификацию соединений осуществляли путем сопоставления времени их удерживания и характерных масс-спектров, представленных в библиотеках NIST, Mainlib, CAS, Wiley9 и DD2012. Относительное присутствие отдельных идентифицированных компонентов в экстракте выражали в процентах, соответствующих площади определенного пика в сравнении с суммарной площадью всех пиков на хроматограмме.

Химические соединения — аналоги малых молекул растительного происхождения. По результатам химического анализа в исследование были включены γ -капролактон (CAS: 695-06-7) и γ -октано-

лактон (CAS: 104-50-7) со степенью чистоты 98 и 97% соответственно, предоставленные “Sigma-Aldrich” (США). Структурные формулы этих молекул приведены на рис. 1б, 1в.

Исследование антибактериальной и QS-ингибирующей активностей растительного экстракта и малых молекул растительного происхождения в биотесте на *C. subtsugae* 026 проводилось методом серийных разведений в жидкой питательной среде, что позволило количественно охарактеризовать выраженность искомым эффектом величинами минимальных рост-ингибирующих (МИК) и эффективных QS-ингибирующих концентраций (ЕС).

На подготовительном этапе в LB-бульоне формировали серии двукратных разведений исследуемого растительного экстракта или малых молекул растительного происхождения в диапазоне концентраций от 0.3 до 10000 мкг/мл. В каждое исследование включали дополнительные пробы LB-бульона, не содержащие названных компонентов и используемые в качестве положительного (рост тест-штамма) и отрицательного (стерильного) контролей. На следующем этапе подготовленными пробами в объемах по 100 мкл заполняли ячейки стерильных 96-луночных планшетов (“Jet Biofil”, Канада-Китай), в которые дополнительно вносили по 100 мкл C_6 -АГЛ в концентрации 0.02 мкг/мл и инокулировали 20 мкл суточной культуры *C. subtsugae* 026. Для развития анализируемых эффектов в отношении используемого тест-штамма в условиях его контролируемой индукции планшеты инкубировали при 27°C в течение 1 сут.

Оценку результатов эксперимента проводили с использованием многофункционального микропланшетного ридера Infinite 200 PRO (“Tecan”, Австрия), последовательно регистрируя: (1) оптическую плотность биомассы при 450 ± 5 нм как показатель влияния исследуемых компонентов на рост тест-штамма; (2) количество пигмента виолацеина после его этанольной экстракции при 600 ± 5 нм как показатель влияния на активность системы “кворум сенсинга”. Для этого биомассу осаждали при 13000 об./мин в течение 5 мин, супернатант удаляли, пигмент извлекали путем добавления к каждой пробе по 230 мкл 96% этанола, после чего депигментированную биомассу осаждали центрифугированием в том же режиме, а полученный этанольный экстракт переносили в ячейки 96-луночного планшета для измерений. Значения поглощения отрицательного контроля вычитали, значения положительного контроля принимали за 100%.

При исследовании эффектов композиций из растительного экстракта и малых молекул растительного происхождения их в объемах по 100 мкл попарно вносили в лунки стерильных 96-луночных планшетов в перпендикулярных друг другу направлениях, в результате чего сформирован-

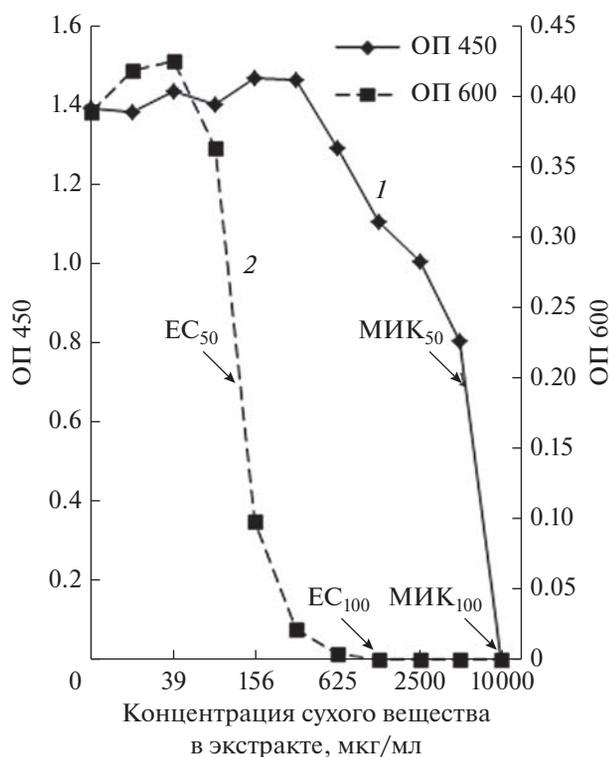


Рис. 2. Оценка рост-ингибирующего и QS-ингибирующего эффектов цельного экстракта эвкалипта прутовидного в биотесте на *C. subtsugae* 026. Обозначения: по оси абсцисс — концентрации действующих соединений (мкг/мл); по оси ординат слева, сплошная линия на графиках (1) — оптическая плотность биомассы (ОП₄₅₀); по оси ординат справа, пунктирная линия на графиках (2) — оптическая плотность пигмента (ОП₆₀₀).

ные объемы по 200 мкл содержали различные концентрационные соотношения. Пробами сравнения являлись ряды разведений, содержащие только один из тестируемых компонентов, а также положительный и отрицательный контроли. Дальнейшие инокуляцию *C. subtsugae* 026, его индукцию С₆-АГЛ, культивирование и учет результатов исследования проводили, как описано выше.

Статистическая обработка результатов исследования. Все эксперименты выполнены не менее чем в пяти повторностях. Полученные результаты обработаны в программе Excel для Windows 10. Антибактериальный эффект выражен значениями МИК₅₀ и МИК₁₀₀, соответствующими 50 и 100% подавления роста тест-штамма. В свою очередь, QS-ингибирующая активность охарактеризована величинами ЕС₅₀ и ЕС₁₀₀, соответствующими аналогичной интенсивности воздействия на биосинтез пигмента виолацеина в растущей культуре. Эффекты композиций растительного экстракта и малых молекул растительного происхождения оценены методом изоболографического анализа (Tallarida, 2006), предусматривающим

учет расположения результативных точек в системе координат, описывающих значения ЕС₅₀ для каждого из исследованных компонентов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Дизайн исследования предусматривал использование биотеста на *C. subtsugae* 026 для первичной характеристики цельного экстракта листьев эвкалипта прутовидного, идентификацию присутствующих в нем природных компонентов с последующим доказательством собственной биоактивности отдельных обнаруженных химических соединений или сформированных на их основе композиций.

Анализ эффектов цельного растительного экстракта в биотесте на *C. subtsugae* 026. Выполнение количественного биотеста на жидкой питательной среде с использованием предварительно высушенного экстракта листьев эвкалипта прутовидного в концентрациях от 0.3 до 10000 мкг/мл позволило констатировать существование широкого диапазона концентраций, в котором его QS-ингибирующая активность развивалась в отсутствие или при слабой выраженности рост-ингибирующего эффекта (рис. 2). Так, если для полного подавления бактериального роста (МИК₁₀₀) требовалась максимальная концентрация тестируемого экстракта, то абсолютное блокирование биосинтеза виолацеина (ЕС₁₀₀) достигалось уже в концентрации 1250 мкг/мл (табл. 1). В свою очередь, концентрация экстракта, обуславливающая 50%-ое ингибирование QS-контролируемого биосинтеза пигмента виолацеина в биотесте на *C. subtsugae* 026, составляла 130 мкг/мл против 5666.7 мкг/мл, требующихся для 50%-го подавления бактериального роста (соотношение МИК₅₀/ЕС₅₀ = 43.6). Следует также отметить, что если рост-ингибирующий эффект развивался при концентрациях, лишь незначительно уступающих присутствию экстрагируемых компонентов в препарате, приготовленном в соответствии с инструкцией производителя (по сухому веществу 14700 мкг/мл), то QS-ингибирующая активность сохранялась при его более чем 100-кратном разведении.

Тем самым результаты проведенного исследования расширяют представления о природе биологической (в т.ч. терапевтической) активности экстрактов листьев эвкалипта. При этом полученные данные хорошо согласуются с недавно описанным QS-ингибирующим действием экстракта листьев эвкалипта клубовидного (*Eucalyptus camaldulensis*), в биотесте на *C. subtsugae* 026 развивающимся в сходном диапазоне концентраций — от 97 до 780 мкг/мл (Moradi et al., 2020). Аналогичные эффекты зафиксированы и при исследовании экстракта листьев эвкалипта шаровидного (*Eucalyptus globulus*), ингибирующее дей-

Таблица 1. Характеристика эффектов экстракта листьев эвкалипта прутовидного и идентифицированных в его составе γ -лактонов в количественном биотесте на *C. subtsugae* 026

Исследуемый экстракт или химическое соединение	Параметры рост-ингибирующей активности, мкг/мл		Параметры QS-ингибирующей активности, мкг/мл	
	МИК ₁₀₀	МИК ₅₀	ЕС ₁₀₀	ЕС ₅₀
Экстракт листьев эвкалипта прутовидного	10000	5666.7	1250	130
γ -Капролактон	10000	2666.7	2500	354.2
γ -Октанолактон	5000	708.3	625	145.6

ствии которого на биосинтез виолацеина у дикого штамма *C. violaceum* ATCC 12472 дополнялось подавлением QS-контролируемого роения, образования пиоцианина и формирования биопленки у коллекционных и клинических изолятов *Pseudomonas aeruginosa* со стереотипно организованными системами плотностно-зависимой химической коммуникации (Sagar et al., 2022).

Химический анализ экстракта листьев эвкалипта прутовидного. Использование метода ГХ-МС обеспечило достаточно высокое разрешение между большинством компонентов (пиков) на полученной хроматограмме, среди которых 31 соединение со временем удержания на колонке в диапазоне от 2.595 до 11.070 мин были идентифицированы с вероятностью не менее 80%.

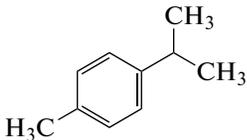
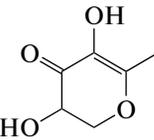
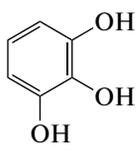
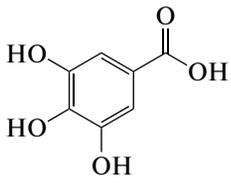
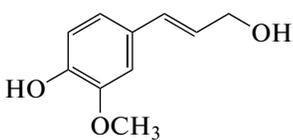
Наиболее значительным присутствием в анализируемом экстракте характеризовались четыре соединения: гидроксиметилфурфурол (время удержания 4.830 мин; относительное содержание 4.2%), 1,2,3-бензентриол/пирогаллол (время удержания 5.990 мин; относительное содержание 4.0%), 2,3-дигидро-3,5-дигидрокси-6-метил-4Н-пиран-4-1 (время удержания 4.180 мин; относительное содержание 3.8%) и розифолиол (время удержания 8.935 мин; относительное содержание 3.8%). Пятое соединение со временем удержания на колонке 7.600 мин, также характеризующееся относительно высоким содержанием в анализируемом экстракте (6.4%), идентифицировалось с вероятностью менее 75%, в связи с чем было исключено из последующего анализа.

При этом для двух из названных компонентов различные варианты QS-ингибирующей активности ранее уже были экспериментально показаны, или ее наличие предполагалось по результатам молекулярного докинга (табл. 2). Наиболее хорошо подобные эффекты документированы для пирогаллола, биосинтетически связанного с галловой кислотой (которая также обнаруживается в анализируемом экстракте) и образующегося при ее декарбоксилации в процессе частичной ферментации растительного сырья (Tor et al., 1996). Впервые ингибирующее воздействие пирогаллола и его аналогов на систему “кворум сен-

синга” описано на примере морской люминесцирующей бактерии *Vibrio harveyi* (Ni et al., 2008) и после критического обсуждения (Defoirdt et al., 2013; Bali et al., 2019) подтверждено в биотесте на *C. subtsugae* 026 (Инчагова и соавт., 2019). В свою очередь аналогичная активность 2,3-дигидро-3,5-дигидрокси-6-метил-4Н-пиран-4-1 к настоящему времени проанализирована только на модели *in silico*, показавшей возможность его результативного связывания с рецепторным белком CviR у *C. violaceum* ATCC 12472 (Mashamba et al., 2022), но пока не получившей своего экспериментального подтверждения на моделях *in vitro*.

Среди других 27 компонентов, характеризующихся относительным содержанием в диапазоне 0.4–2.8%, по результатам проведенного химического анализа было идентифицировано еще 4 соединения с ранее показанной активностью в отношении системы “кворум сенсинга” у *Chromobacterium* spp. (табл. 2). Подобное заключение было сделано в отношении 1-метил-4-пропан-2-илбензола/цимола (время удержания 3.185 мин; относительное содержание 0.2%), описанного среди растительных монотерпенов, подавляющих QS-контролируемый биосинтез виолацеина у *C. violaceum* ATCC 12472 (Ahmad et al., 2015); 4-((1E)-3-гидрокси-1-пропенил)-2-метоксифенола, известного также как “конифероловый спирт” (время удержания 8.410 мин; относительное содержание 1.3%) и ранее показавшего свою активность в биотесте на *C. subtsugae* 026 (Deryabin, Tolmacheva, 2015); 3,4,5-тригидроксибензойной/галловой кислоты (время удержания 6.895 мин; относительное содержание 0.1%), на модели *in silico* описанной среди других растительных фенолов, формирующих аффинные взаимодействия с рецептором CviR (Santos et al., 2021) и в эксперименте *in vitro* обусловившей умеренное подавление биосинтеза виолацеина у *C. violaceum* ATCC 12472 (Borges et al., 2014); а также гексадекановой/пальмитиновой кислоты (время удержания 9.480 мин; относительное содержание 0.9%), по результатам молекулярного докинга показавшей возможность результативного взаимодействия с белком CviR (Vargas et al., 2021).

Таблица 2. Малые молекулы растительного происхождения с ранее показанной активностью в отношении системы “кворум сенсинга” у *Chromobacterium* spp., идентифицированные в составе экстракта листьев эвкалипта прутовидного

Идентифицированное соединение	Структурная формула	Относительное содержание в экстракте, %	Варианты активности <i>in silico</i> или <i>in vitro</i>
1-Метил-4-пропан-2-илбензол (цимол)		0.2	Ингибирование биосинтеза виолацеина у <i>C. violaceum</i> ATCC 12472
2,3-Дигидро-3,5-дигидрокси-6-метил-4Н-пиран-4-1		3.8	Связывание с рецепторным белком CviR у <i>C. violaceum</i> ATCC 12472
1,2,3-Бензентриол (пирогаллол)		4.0	Ингибирование биосинтеза виолацеина в биотесте на <i>C. subtsugae</i> 026
3,4,5-Тригидроксибензойная (галловая) кислота		0.1	Связывание с рецепторным белком CviR; ингибирование биосинтеза виолацеина у <i>C. violaceum</i> ATCC 12472
4-((1E)-3-Гидрокси-1-пропенил)-2-метоксифенол (конифериловый спирт)		1.3	Ингибирование биосинтеза виолацеина в биотесте на <i>C. subtsugae</i> 026
Гексадекановая (пальмитиновая) кислота	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_2\text{COOH}$	0.9	Связывание с рецепторным белком CviR у <i>Chromobacterium</i> spp.

Таким образом, результаты проведенного химического анализа свидетельствовали о присутствии в составе анализируемого растительного экстракта сразу нескольких малых молекул (10.3% от общей массы экстрагированных компонентов) с прогнозируемой или доказанной QS-ингибирующей активностью, что согласуется с представлениями о существовании аналогичных молекулярных композиций, ранее описанных в составе экстрактов коры дуба (Deryabin, Tolmacheva, 2015) или семян авокадо (Dereli et al., 2022).

Кроме того, среди обнаруженных молекул обращали на себя внимание два минорных компо-

нента со временем удерживания на колонке в узком диапазоне от 4.525 до 4.700 мин, идентифицированные как γ -капролактон и γ -октанолактон (относительное содержание в экстракте по 0.4% каждый). При этом их структурные особенности, заключающиеся в наличии пятичленного лактонного кольца с присоединенным к нему линейными радикалами различного химического состава и полярности (рис. 1), демонстрировали близость с природными аутоиндукторами плотностно-зависимой коммуникации – ацилированными гомосеринлактонами, что позволяло предполагать возможность функциональной интерференции между названными группами малых молекул. В

то же время в доступной литературе сведения о QS-ингибирующей активности γ -лактонов растительного происхождения до настоящего времени отсутствуют.

Характеристика QS-ингибирующей активности γ -лактонов, обнаруженных в экстракте листьев эвкалипта прутовидного. В исследование были включены химически синтезированные аналоги γ -капролактона и γ -октанолактона (степень чистоты 97–98%). Их тестирование в количественном биотесте на *C. subtsugae* 026 позволило впервые выявить и охарактеризовать рост-ингибирующий и QS-ингибирующий эффекты данных молекул (табл. 1). При этом γ -октанолактон показал себя как более активное соединение, значения $EC_{50} = 145.6$ мкг/мл и $EC_{100} = 625$ мкг/мл которого оказывались в 2–4 раза ниже требуемых для подавления QS-контролируемого биосинтеза виолацеина с использованием γ -капролактона ($EC_{50} = 354.2$ мкг/мл и $EC_{100} = 2500$ мкг/мл). Кроме того, у обоих названных соединений зафиксирован слабый рост-ингибирующий эффект, формирующийся в концентрациях, кратно превосходящих требуемые для развития QS-ингибирующего эффекта (соотношения MIK_{50}/EC_{50} соответствовали 7.5 для γ -капролактона и 4.9 для γ -октанолактона).

В то же время использование анализируемых γ -лактонов в количествах, соответствующих их содержанию в составе экстракта листьев эвкалипта прутовидного, позволило зафиксировать достаточно слабый эффект (не достигающий 50% подавления QS-контролируемого биосинтеза виолацеина) при использовании γ -октанолактона или его отсутствие при использовании γ -капролактона, что может объясняться выходом из диапазона их эффективных концентраций. Указанное обстоятельство явилось основанием для предположения о том, что в естественных условиях биоактивность γ -лактонов реализуется в составе молекулярной композиции из нескольких химических соединений, присутствующих в экстракте листьев эвкалипта прутовидного (см. выше) и обеспечивающих совместный QS-ингибирующий эффект.

Оценка воздействия молекулярных композиций с участием γ -лактонов на QS-контролируемый биосинтез виолацеина у *C. subtsugae* 026. Эффекты γ -лактонов как участников молекулярных композиций проанализированы при обогащении ими цельного экстракта листьев эвкалипта прутовидного, содержащего всю совокупность малых молекул растительного происхождения. При этом серии разведений цельного экстракта были обогащены γ -капролактоном или γ -октанолактоном в диапазоне концентраций 1–10000 мкг/мл, что делало их относительное содержание сопоставимым с таковым у основных компонентов, обнаруженных в анализируемом растительном экстракте.

Исследование комбинированного действия сформированных композиций с последующим анализом полученного результата методом изоболографического анализа позволило констатировать увеличение выраженности QS-ингибирующего эффекта в отношении *C. subtsugae* 026, превосходящего таковой при использовании как индивидуальных молекул, так и цельного растительного экстракта. Так анализ композиций с участием γ -капролактона показал сосредоточение большинства экспериментальных точек вдоль линии изоболы (рис. 3а), что указывало на развитие взаимодополняющего (аддитивного) эффекта. В свою очередь, обогащение экстракта листьев эвкалипта прутовидного γ -октанолактоном приводило к формированию взаимно потенцируемого (супераддитивного) эффекта, показателем которого являлось расположение большинства экспериментальных точек существенно ниже линии изоболы, соединяющей значения EC_{50} при изолированном использовании каждого из участников композиции (рис. 3б). Соответственно, в широком диапазоне концентраций γ -октанолактона концентрации цельного растительного экстракта, требуемые для достижения 50% ингибирования QS-контролируемого биосинтеза виолацеина у *C. subtsugae* 026, могли быть снижены в 4–6 раз относительно эффектов при их раздельном использовании.

Лекарственные растения традиционно рассматриваются в качестве важнейших источников природных соединений с различными вариантами биологических активностей, значимых для медицинского и ветеринарного использования. При этом одним из актуальных направлений подобного поиска является обнаружение и исследование их воздействия на системы плотности-зависимой химической коммуникации у зоопатогенных и фитопатогенных бактерий, в настоящее время рассматриваемых в качестве новой перспективной “мишени” для антимикробной терапии.

Результатом проведенного исследования явилась демонстрация подобной активности у экстракта листьев эвкалипта прутовидного с идентификацией в нем композиции растительных молекул, ингибирующих систему химической коммуникации лабораторного штамма *C. subtsugae* 026 (ранее — *C. violaceum* 026). При этом полученные данные хорошо согласуются с ранее описанными аналогичными эффектами экстрактов листьев эвкалипта клубовидного и эвкалипта шаровидного, что свидетельствует о типичности QS-ингибирующего эффекта у названных растительных субстратов и объясняет эффективность их использования для профилактики и терапии широкого круга инфекционных состояний. В свою очередь, проведение химического анализа позволило обнаружить в экстракте листьев эвкалипта прутовидного

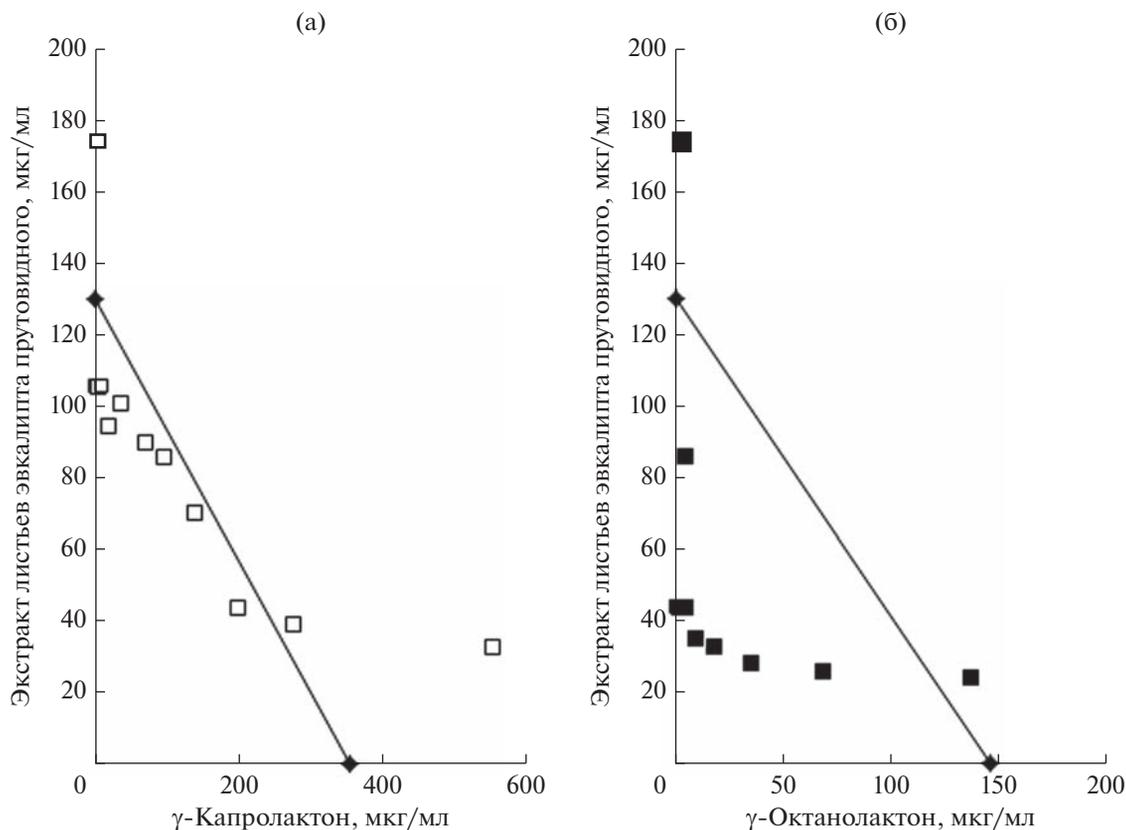


Рис. 3. Изоболографический анализ эффекта комбинаций γ -капролактона (а) и γ -октанолактона (б) с цельным экстрактом листьев эвкалипта прутовидного на QS-контролируемый биосинтез пигмента виолацеина в биотесте на *C. subtilisugae* 026. Изоболы представлены в виде прямых линий, соединяющих значения EC_{50} для каждого отдельного компонента. Результат совместного действия показан путем нанесения на график точек с координатами, соответствующими концентрациям в композиции, обеспечивающим достижение EC_{50} .

цельный ряд малых молекул растительного происхождения (пирогаллол; 2,3-дигидро-3,5-дигидрокси-6-метил-4Н-пиран-4-1; цимол; 4-((1E)-3-гидрокси-1-пропенил)-2-метоксифенол; галловая и пальмитиновая кислоты), ингибирующее воздействие которых на систему плотностно-зависимой химической коммуникации у *Chromobacterium* spp. ранее уже было показано в экспериментах *in vitro* или предсказано на моделях *in silico*.

Среди минорных соединений, также идентифицированных в исследуемом растительном экстракте, наше внимание было обращено на γ -лактоны, структуры которых демонстрировали существенное сходство с природными аутоиндукторами плотностно-зависимой коммуникации у бактерий – ацилированными гомосеринлактонами, что предполагает возможность функциональной интерференции между названными группами малых молекул. Проведенный анализ их химически синтезированных аналогов в биотесте на *C. subtilisugae* 026 подтвердил данное предположение и впервые показал наличие QS-ингибирующей активности у γ -капролактона и γ -октанолактона. В то же время использование названных γ -лактонов

в количествах, соответствующих присутствию в экстракте листьев эвкалипта прутовидного, не позволяло достичь выраженного QS-ингибирующего эффекта, что объяснялось их выходом из диапазона биоактивных концентраций.

Последующее обогащение γ -лактонами исходного растительного экстракта показало возможность существенного усиления совместной QS-ингибирующей активности, при использовании γ -капролактона развивающегося как взаимодополняющий (аддитивного) эффект, а при использовании γ -октанолактона позволяющего достичь взаимно потенцируемого (супераддитивного) эффекта.

Обсуждая фундаментальный аспект полученного результата, следует указать на развитие представлений о многокомпонентной природе QS-ингибирующего эффекта растительных экстрактов, функционирующих по принципу молекулярных композиций с взаимодополняющими и взаимно усиливающими эффектами. Кроме того, в качестве “нового” участника подобных композиций результаты проведенного исследования впервые показывают соединения из группы γ -лак-

тонов, ранее преимущественно описываемые как вкусовые и ароматические компоненты растительного происхождения (Labuda, 2009). В свою очередь практически-ориентированный аспект проведенного исследования определяется демонстрацией возможности использования γ -лактонов для обогащения цельных растительных экстрактов или формирования на их основе композиций из малых молекул растительного происхождения, что позволяет существенно усилить воздействие на системы плотностно-зависимой химической коммуникации. При этом отсутствие у γ -лактонов токсических или иных нежелательных свойств, а также разрешенное использование некоторых из них в качестве вкусо-ароматических добавок, существенно снижает порог для их возможного включения в схемы фитотерапии инфекционных заболеваний.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследования выполнены при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 22-16-00036).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Статья не содержит материалов, полученных с использованием животных в качестве объектов исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Дерябин Д.Г., Галаджиева А.А., Косян Д.Б., Дускаев Г.К. Растительные ингибиторы плотностно-зависимой коммуникации у бактерий: разнообразие структур, механизмов действия и источников происхождения // Микробиология. 2021. Т. 90. С. 660–680.
- Deryabin D.G., Galadzhieva A.A., Kosyan D.B., Duskaev G.K. Plant-derived inhibitors of density-dependent communication in bacteria: diversity of structures, bioactivity mechanisms, and sources of origin // Microbiology (Moscow). 2021. V. 90. P. 702–720.
- Инчагова К.С., Дускаев Г.К., Дерябин Д.Г. Подавление “кворум сенсинга” *Chromobacterium violaceum* при воздействии комбинаций амикацина с активированным углем или малыми молекулами растительного происхождения (пирогаллолом и кумарином) // Микробиология. 2019. Т. 88. С. 72–82.
- Inchagova K.S., Duskaev G.K., Deryabin D.G. Quorum sensing inhibition in *Chromobacterium violaceum* by amikacin combination with activated charcoal or small plant-derived molecules (pyrogallol and coumarin) // Microbiology (Moscow). 2019. V. 88. P. 63–71.
- Ahmad A., Viljoen A.M., Chenia H.Y. The impact of plant volatiles on bacterial quorum sensing // Lett. Appl. Microbiol. 2015. V. 60. P. 8–19.
- Bali E.B., Turkmen K.E., Erdonmez D., Saglam N. Comparative study of inhibitory potential of dietary phytochemicals against quorum sensing activity of and biofilm formation by *Chromobacterium violaceum* 12472, and swimming and swarming behaviour of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 // Food Technol. Biotechnol. 2019. V. 57. P. 212–221.
- Borges A., Serra S., Cristina Abreu A., Saavedra M.J., Salgado A., Simoes M. Evaluation of the effects of selected phytochemicals on quorum sensing inhibition and *in vitro* cytotoxicity // Biofouling. 2014. V. 30. P. 183–195.
- Defoirdt T., Pande G.S., Baruah K., Bossier P. The apparent quorum-sensing inhibitory activity of pyrogallol is a side effect of peroxide production // Antimicrob. Agents Chemother. 2013. V. 57. P. 2870–2873.
- Dereli F.T.G., Onem E., Arin E., Ozaydin A.G., Muhammed M.T. *Persea americana* Mill.: as a potent quorum sensing inhibitor of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 virulence // Int. J. Second. Metabol. 2022. V. 9. P. 14–26.
- Deryabin D.G., Tolmacheva A.A. Antibacterial and anti-quorum sensing molecular composition derived from *Quercus cortex* (Oak bark) extract // Molecules. 2015. V. 20. P. 17093–17108.
- Harrison A.M., Soby S.D. Reclassification of *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532 and its quorum biosensor mutant CV026 to *Chromobacterium subtsugae* // AMB Express. 2020. V. 10. P. 202.
- Kothari V., Sharma S., Padia D. Recent research advances on *Chromobacterium violaceum* // Asian Pac. J. Trop. Med. 2017. V. 10. P. 744–752.
- Labuda I. Flavor compounds // Encyclopedia of Microbiology. 3rd ed. / Editor-in-Chief: Schaechter M. Oxford: Academic Press, 2009. P. 305–320.
- Mashamba T.G., Adeosun I.J., Baloyi I.T., Tshikalange E.T., Cosa S. Quorum sensing modulation and inhibition in biofilm forming foot ulcer pathogens by selected medicinal plants // Heliyon. 2022. V. 8. P. e09303.
- McClellan K.H., Winson M.K., Fish L., Taylor A., Chhabra S.R., Camara M., Daykin M., Lamb J.H., Swift S., Bycroft B.W., Stewart G.S.A.B., Williams P. Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones // Microbiology (Reading). 1997. V. 143. P. 3703–3711.
- Moradi F., Hadi N., Bazargani A. Evaluation of quorum-sensing inhibitory effects of extracts of three traditional medicine plants with known antibacterial properties // New Microbes New Infect. 2020. V. 38. P. 100769.
- Mukherjee S., Bassler B.L. Bacterial quorum sensing in complex and dynamically changing environments // Nat. Rev. Microbiol. 2019. V. 17. P. 371–382.
- Ni N., Choudhary G., Li M., Wang B. Pyrogallol and its analogs can antagonize bacterial quorum sensing in *Vibrio harveyi* // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2008. V. 18. P. 1567–1572.
- Remy B., Mion S., Plener L., Elias M., Chabriere E., Daude D. Interference in bacterial quorum sensing: a biopharmaceutical perspective // Front. Pharmacol. 2018. V. 9. P. 203.
- Sagar P.K., Sharma P., Singh R. Inhibition of quorum sensing regulated virulence factors and biofilm formation by

- Eucalyptus globulus* against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* // J. Pharmacopuncture. 2022. V. 25. P. 37–45.
- Santos C.A., Lima E.M.F., Franco B.D.G.M., Pinto U.M. Exploring phenolic compounds as quorum sensing inhibitors in foodborne bacteria // Front. Microbiol. 2021. V. 12. P. 735931.
- Stauff D.L., Bassler B.L. Quorum sensing in *Chromobacterium violaceum*: DNA recognition and gene regulation by the CviR receptor // J. Bacteriol. 2011. V. 193. P. 3871–3878.
- Swem L.R., Swem D.L., O'loughlin C.T., Gatmaitan R., Zhao B., Ulrich S.M., Bassler B.L. A quorum-sensing antagonist targets both membrane-bound and cytoplasmic receptors and controls bacterial pathogenicity // Mol. Cell. 2009. V. 35. P. 143–153.
- Tallarida R.J. An overview of drug combination analysis with isobolograms: perspectives in pharmacology // Pharmacol. Exp. Ther. 2006. V. 319. P. 1–7.
- Tolmacheva A.A., Rogozhin E.A., Deryabin D.G. Antibacterial and quorum sensing regulatory activities of some traditional Eastern-European medicinal plants // Acta. Pharm. 2014. V. 64. P. 173–186.
- Tor E.R., Francis T.M., Holstege D.M., Galey F.D. GC/MS determination of pyrogallol and gallic acid in biological matrices as diagnostic indicators of oak exposure // J. Agric. Food Chem. 1996. V. 44. P. 1275–1279.
- Vargas E.L.G., de Almeida F.A., de Freitas L.L., Pinto U.M., Vanetti M.C.D. Plant compounds and nonsteroidal anti-inflammatory drugs interfere with quorum sensing in *Chromobacterium violaceum* // Arch. Microbiol. 2021. V. 203. P. 5491–5507.
- Whiteley M., Diggle S.P., Greenberg E.P. Progress in and promise of bacterial quorum sensing research // Nature. 2017. V. 551. P. 313–320.
- Zhou L., Zhang Y., Ge Y., Zhu X., Pan J. Regulatory mechanisms and promising applications of quorum sensing-inhibiting agents in control of bacterial biofilm formation // Front. Microbiol. 2020. V. 11. P. 589640.

Quorum Sensing in *Chromobacterium subtsugae* (Previously – *C. violaceum*) Is Inhibited by Gamma-Lactones, the Minor Components of Eucalyptus Leaf Extract

K. S. Inchagova¹, G. K. Duskaev¹, and D. G. Deryabin¹, *

¹Federal Scientific Center for Biological Systems and Agrotechnologies, Russian Academy of Sciences, Orenburg, 460000 Russia

*e-mail: dgderabin@yandex.ru

Received August 16, 2022; revised September 1, 2022; accepted September 1, 2022

Abstract—The goal of the study was to investigate the mechanism of quorum sensing (QS) inhibition in the model bacterium *Chromobacterium subtsugae* 026 (previously – *C. violaceum* 026) by *Eucalyptus viminalis* Labillard leaf extract, and to identify the plant-derived components that provide this biological activity. The raw extract showed pronounced anti-QS activity within a broad concentrations range which were an order of magnitude lower than required for bacterial growth suppression (the MIC₅₀/EC₅₀ ratio of 43.6). Chemical analysis of the extract revealed six small plant-derived molecules: pyrogallol, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-1, *p*-cymene, 4-((1E)-3-hydroxy-1-propenyl)-2-methoxyphenol, gallic and palmitic acids, whose inhibitory effect on QS in *Chromobacterium* spp. has previously been shown by *in vitro* experiments or predicted by *in silico* models. In addition, minor components γ -caprolactone and γ -octanolactone, structurally similar to acylated homoserine lactones, QS autoinducers in *Chromobacterium* spp., were found in the extract. Chemically synthesized analogs of these molecules showed anti-QS activity in the *C. subtsugae* 026 bioassay (EC₅₀ = 354.2 and 145.6 μ g/mL, respectively). Enrichment of the *E. viminalis* leaf extract with γ -caprolactone or γ -octanolactone significantly increased the anti-QS activity of these compositions, which was determined by isobolographic analysis as additive or superadditive effects.

Keywords: quorum sensing, *Chromobacterium subtsugae*, *Eucalyptus viminalis*, γ -caprolactone, γ -octanolactone

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА СТРЕССОВЫХ ОТВЕТОВ
МИКРОВОДОРОСЛЕЙ *PROROCENTRUM CORDATUM* (OSTENFELD)
DODGE И *DUNALIELLA SALINA* (TEOD.) НА ПРИСУТСТВИЕ
В СРЕДЕ НАНОЧАСТИЦ МЕДИ

© 2023 г. Е. С. Соломонова^а, *, Н. Ю. Шоман^а, А. И. Акимов^а, О. А. Рылькова^а

^аФедеральный исследовательский центр “Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского
Российской академии наук”, Севастополь, 299011 Россия

*e-mail: solomonov83@mail.ru

Поступила в редакцию 25.05.2022 г.

После доработки 23.08.2022 г.

Принята к публикации 24.08.2022 г.

Проведена сравнительная оценка стрессовых реакций двух видов микроводорослей *Prorocentrum cordatum* и *Dunaliella salina*, существенно различающихся как в клеточном строении, так и ареале обитания, на присутствие в среде наночастиц оксида меди. Установлено, что воздействие наночастиц на исследуемые микроводоросли носило схожий характер. Токсический эффект влияния поллютанта проявлялся в прогрессирующей продукции активных форм кислорода в клетках водорослей на фоне снижения их удельной скорости роста, что, вероятно, объясняется высвобождением ионов меди Cu^{2+} из оксида или проникновением отдельных наночастиц внутрь клеток. При механическом воздействии наночастиц (НЧ) наблюдалась их агрегация на поверхности клеток и деформация клеточных оболочек. Присутствие токсиканта в культуральной среде приводило к достоверному увеличению клеточных объемов, перфорации плазмалеммы, преобладанию деформированных клеток неправильной формы в культурах микроводорослей. В то же время показана разная устойчивость исследуемых видов к воздействию CuO НЧ. Сублетальные и летальные концентрации CuO НЧ для *P. cordatum* составили 400 и 520 мкг/л, тогда как для *D. salina* 3000 и 3750 мкг/л соответственно. Предложены гипотезы, объясняющие устойчивость *D. salina* к воздействию CuO НЧ. Во-первых, *D. salina* способна продуцировать высокие концентрации лигандов (фитохелатины и металлотиионеины), выделяемых клетками в среду для связывания ионов меди. Во-вторых, ареал существования *D. salina* приурочен к экстремальным условиям среды, что может способствовать ее толерантности к стрессу, что, по-видимому, является генетически закрепленным свойством и частью общей устойчивости водорослей и к другим видам загрязнителей. Кроме того, высокая устойчивость *D. salina* к воздействию CuO НЧ может объясняться ее способностью секретировать в условиях стресса внеклеточные полимерные соединения для формирования защитного слоя, предотвращающего взаимодействие микроводорослей с наночастицами. Предлагается применение *P. cordatum* в биомониторинге морских экосистем, загрязненных наночастицами, тогда как зеленая микроводоросль *D. salina* является перспективным видом для биоремедиации вод.

Ключевые слова: культуры микроводорослей, EC_{50} , активные формы кислорода, морфология клеток, проточная цитометрия, сканирующая электронная микроскопия, загрязнение металлическими наночастицами

DOI: 10.31857/S0026365622600468, **EDN:** NMVTMJ

Инженерные наночастицы являются новыми материалами, широко применяемыми во многих областях деятельности человека. Рост объемов их производства и успешное внедрение вызывают естественные опасения по поводу проявления специфических наноразмерных эффектов для живых организмов. При этом в опасной зоне риска находятся водные организмы (Klaine et al., 2008). Считается, что негативное влияние наночастиц металлов на живые организмы обусловлено ком-

плексным эффектом ряда различных механизмов. В их числе: 1) механическое повреждение мембран клеток, адсорбция отдельных НЧ и их агрегатов на поверхности клеточной стенки, что нарушает ее проницаемость и дыхательную функцию; 2) высвобождение ионов металлов и 3) окислительный стресс (Wang et al., 2020). Отдельные эксперименты по оценке токсичности НЧ на микроводоросли трудно сопоставимы как по видовой специфике объекта исследования, так и по свойствам самих

наночастиц, вследствие чего полученные результаты неоднозначны, а иногда противоречивы. Степень токсичности НЧ зависит от их типа, размера, формы, физико-химических свойств и концентрации в среде (Miller et al., 2010). В целом, разрозненность экспериментальных данных в настоящий момент не позволяет исследователям прийти к единому мнению о степени воздействия наноматериалов на живые организмы. В то время как установление допустимых диапазонов концентрации, проведение полной оценки рисков применения НЧ, а также выяснение биологической безопасности наночастиц с учетом всех их физико-химических свойств и иных характеристик являются актуальной задачей.

В данной работе предпринята попытка на модели двух видов микроводорослей — *Prorocentrum cordatum* и *Dunaliella salina*, оценить влияние наночастиц оксида меди, которые входят в состав широко используемых противообрастающих красок и, соответственно, выщелачиваются из них в воду в большом количестве (Adeleye et al., 2016). Выбор объектов исследования обусловлен их значительными различиями как в клеточном строении, так и в условиях их существования. Тестируемый вид *P. cordatum* — это планктонная водоросль, вызывающая массовые цветения в Черном море в летний период (Сеничева, 2008). Кроме того, *P. cordatum* относится к потенциально токсичным видам водорослей за счет своей способности выделять водорастворимые токсины (Neil et al., 2005), которые могут представлять серьезную опасность для рыболовства, общественного здравоохранения и морских экосистем. Ранее сообщалось, что увеличение в морской среде концентрации загрязняющих веществ, в частности, наноматериалов, может усугубить данную проблему (Li et al., 2019). Зеленая микроводоросль *D. salina* представляет собой один из наиболее перспективных объектов для промышленного получения β -каротина и вегетирует в условиях экстремальных экосистем. Ареалом ее обитания являются гиперсоленые озера, характеризующиеся сильным загрязнением, гипоксией и аноксией (Anufrieva et al., 2018). Также выбранные объекты исследования имеют различное строение клеточной оболочки, что особенно важно для оценки механического воздействия НЧ на клетки микроводорослей. *P. cordatum* характеризуется наличием целлюлозной клеточной стенки в виде текальных пластинок, на которых имеется около 20 пор (Matantseva et al., 2020), в то время как у *D. salina* клеточная стенка отсутствует, что делает данный вид микроводоросли, вероятно, более чувствительным к действию НЧ.

Таким образом, цель данного исследования заключалась в сравнительной оценке физиологических и морфологических реакций микроводорослей *P. cordatum* и *D. salina* в ответ на присутствие в среде наночастиц оксида меди.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования. В качестве объекта исследования были использованы альгологически чистые культуры динофитовой микроводоросли *Prorocentrum cordatum* (Ostenfeld) Dodge, 1975 (штамм IBSS-64) и зеленой микроводоросли *Dunaliella salina* (Teod.) (штамм IBSS-1) из коллекции культур микроводорослей и цианобактерий (IBSS) научно-образовательного центра коллективного пользования “Гидробионты мирового океана” (WDCM № 1201) Федерального исследовательского центра “Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН”.

Условия проведения экспериментов. В ходе эксперимента водоросли выращивали на модифицированной питательной среде f/20 (разбавленная в 10 раз среда f/2; Guillard, Ryther, 1962) без добавления меди и ЭДТА, способного связывать растворенные в воде ионы металлов в хелатные комплексы, тем самым уменьшая их активность и токсическое действие на клетки. Питательную среду готовили на основе фильтрованной и пастеризованной морской воды соленостью 18‰. Культивирование водорослей проводили в конических колбах с объемом культуральной суспензии 150 мл при интенсивности света 85 мкЭ/(м² с) (5 клк), свето-темновом периоде 14/10 ч и температуре 20°C. Освещение колб осуществляли снизу светодиодами холодного света. Уровень освещенности определяли зондирующим 4π датчиком квантометра QSL 2101 (“Biospherical Instruments Inc.”, США). Барботаж культур осуществляли аквариумными компрессорами, скорость подачи воздуха составляла 0.5 л/л культуры в минуту, величина pH культуральной среды находилась в пределах 8.2–8.5. Предварительно до начала эксперимента водоросли адаптировали к заданным абиотическим условиям роста в течение 2 сут. При этом плотность культур поддерживали примерно на одном уровне в экспоненциальной фазе роста (порядка $(1-1.2) \times 10^4$ кл./мл у *P. cordatum* и $(2-2.2) \times 10^4$ кл./мл у *D. salina*) путем ежедневного разбавления свежей питательной средой. На 3 сут эксперимента в колбы вносили растворы поллютантов.

Для приготовления растворов токсикантов использовали нанопорошок оксида меди (размер частиц 50, “Sigma-Aldrich”, № 544868). Раствор, содержащий наночастицы оксида меди, предварительно обрабатывали ультразвуком с помощью ультразвуковой ванны “Сапфир” в течение 1 ч для диспергирования частиц.

Эксперимент проводили в два этапа. На первом исследовали действие наночастиц меди на скорость роста и продукцию активных форм кислорода (АФК) в клетках *P. cordatum* и *D. salina*. Для этого в культуральные сосуды вносили CuO НЧ в концентрациях 0, 100, 200, 300, 520 мкг/л (в пере-

счете на ионы Cu^{2+}) для *P. cordatum* и 0, 250, 665, 1330, 2000, 2500, 3750 мкг/л для *D. salina*. Выбор исследуемых концентраций токсикантов обусловлен предварительно полученными данными о степени устойчивости исследуемых видов водорослей к воздействию CuO НЧ. После добавления поллютантов культуры выращивали в накопительном режиме в заданных абиотических условиях в течение 5 сут.

На втором этапе эксперимента исследовали возможность восстановления продукционных показателей водорослей при добавлении в среду сублетальных концентраций CuO НЧ: 400 мкг/л для *P. cordatum* и 3000 мкг/л для *D. salina* (выбор концентраций обусловлен результатами первого этапа эксперимента). В ходе эксперимента культуры *P. cordatum* и *D. salina* выращивали в накопительном режиме в течение 5 и 8 сут соответственно. Измерение численности клеток проводили через 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 168 и 192 ч после добавления поллютанта.

Методы измерений. Цитометрический анализ проб проводили в центре коллективного пользования “Спектрометрия и хроматография” Федерального исследовательского центра “Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН” на проточном цитометре MACS Quant Analyzer (“Miltenyi Biotec”, Германия), оборудованном тремя лазерами (405, 488 и 635 нм). Для обработки данных использовали программу FSC Express 7 Research Edition. Общую численность микроводорослей в культурах определяли в кластере на 2-х параметрических цитограммах по прямому светорассеянию (FS) и флуоресценции отдельных клеток в красной спектральной области (FL4, 675 нм) на безразмерных логарифмических шкалах. Концентрацию клеток рассчитывали по скорости потока пробы (25 мкл/мин) и количеству событий зарегистрированных в определенный промежуток времени. Контроль качества измерений численности производили с помощью калибровочных флуоросфер (Flow-Check™, “Beckman Coulter”) с известной концентрацией в пробе. Также в работе использовали показатель SS (боковое светорассеяние) проточного цитометра, характеризующий гранулярность клеток и их зернистость.

Производство активных форм кислорода у исследуемых культур водорослей оценивали по флуоресценции красителя 2-7-дихлорфлуоресцеиндиацетат (D2CFH-DA; “Merck”, Германия). D2CFH-DA — клеточно-проницаемый индикатор АФК, наиболее часто используемый для количественной оценки количества генерируемых АФК (Wang, Joseph, 1999). Рабочий раствор красителя и окраску суспензии клеток проводили в соответствии с протоколом, опубликованным в работе (Wang, Joseph, 1999). Интенсивность флу-

оресценции D2CFH-DA оценивали по свечению клеток в зеленой области спектра (525 нм), предварительно вычитали значения автофлуоресценции клеток *P. cordatum* и *D. salina* в данной области спектра.

Удельную скорость роста микроводорослей рассчитывали по формуле (Финенко, Ланская, 1971):

$$\mu = \frac{\ln N_t - \ln N_0}{t}, \quad (1)$$

где: μ — удельная скорость роста водорослей, сут⁻¹; N_0 и N_t — исходная концентрация клеток и их количество через время t , клеток · л⁻¹; t — время между измерениями, сут.

Токсическое воздействие наночастиц на исследуемые тест-объекты оценивали по показателю EC_{50} — концентрации поллютанта, при которой численность клеток в культурах и удельная скорость роста водорослей снижались на 50% по отношению к контролю.

Микроскопия. При подготовке образцов для сканирующего электронного микроскопа (СЭМ) 1–2 мл фиксированной пробы концентрировали на трековую мембрану с диаметром пор 3.0 мкм (производства ОИЯИ, г. Дубна, Россия). Далее проводили дегидратацию, используя серию разведения этанола: 20, 30, 50, 75, 96 и 100% (Murtey, Ramasamy, 2016). Для сушки образцов в критической точке (1.5–2.5 ч) использовали устройство Leica EM CPD 300 (Германия). Для напыления (Au/Pd; 0.5–1.0 мин) применяли прибор Leica EM ACE 200 (Германия). Просматривали образцы с помощью сканирующего электронного микроскопа Hitachi SU3500 (Япония), при увеличении от $\times 500$ до $\times 5000$.

В клетках *P. cordatum* и *D. salina* измеряли длину (h) и ширину (d); объем для каждого вида рассчитывали по формулам, приведенным в работе (Брянцева и соавт., 2005).

Микроскопию клеток проводили через 72 ч инкубирования водорослей в среде с НЧ CuO в концентрациях 300 и 2500 мкг/л для *P. cordatum* и *D. salina* соответственно.

Статистическая обработка данных выполнялась по стандартным программным пакетам Microsoft Excel 7.0, Grapher-16 для персонального компьютера. Значения, указанные на графиках и в таблице, представляют собой среднее из трех повторностей. Бары на графиках показывают среднеквадратичное отклонение измеряемых величин. Достоверность различий между выборками оценивали по t -критерию Стьюдента, при уровне значимости $p < 0.05$.

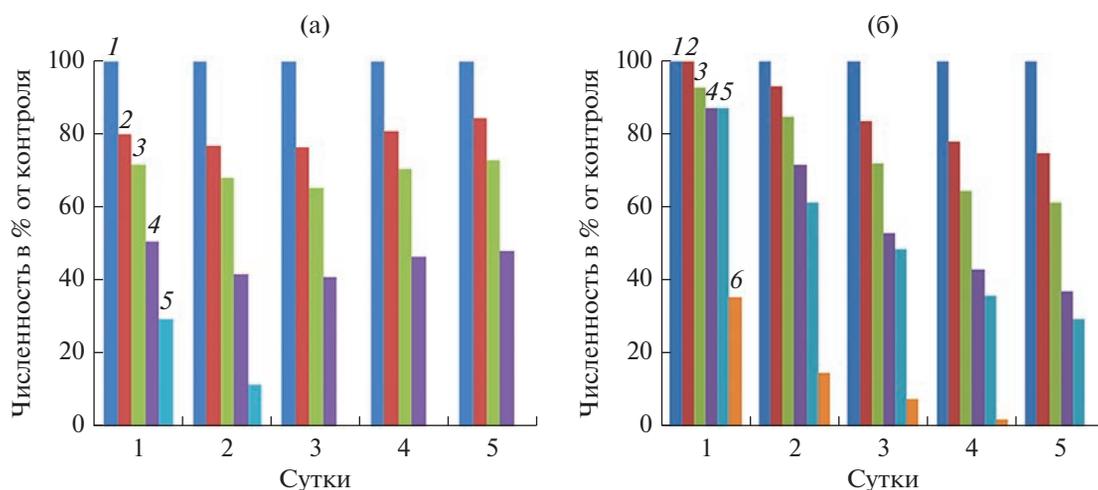


Рис. 1. Изменение численности клеток *P. cordatum* (а) и *D. salina* (б) в накопительной культуре в зависимости от концентрации CuO НЧ (мкг/л): (а) 1 – 0, 2 – 100, 3 – 200, 4 – 300, 5 – 520; (б) 1 – 0, 2 – 250, 3 – 665, 4 – 1330, 5 – 2000, 6 – 2500.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние наночастиц меди на скорость роста и продукцию активных форм кислорода у *P. cordatum* и *D. salina*. На рис. 1 представлена динамика изменения численности культур *P. cordatum* и *D. salina* при добавлении в среду наночастиц оксида меди различной концентрации. У обоих исследуемых видов наблюдалось закономерное снижение скорости роста с увеличением концентрации поллютанта. Однако *P. cordatum* был более чувствителен к воздействию CuO НЧ, чем *D. salina*. Так, через 72 ч после внесения поллютанта 50%-е снижение численности *P. cordatum* относительно контроля отмечено при концентрации CuO НЧ 280 мкг/л, в то время как для *D. salina* данная величина была на порядок выше и составляла 2500 мкг/л. Двукратное снижение удельной скорости роста на участке экспоненциального роста водорослей наблюдалось при 290 мкг/л CuO НЧ у *P. cordatum* и при 1900 мкг/л у *D. salina*. Летальное воздействие наночастиц меди на микроводоросли отмечено при их концентрации в среде 520 и 3750 мкг/л для *P. cordatum* и *D. salina* соответственно. В ряде работ с пресноводными представителями фитопланктона показано стимулирующее действие низких концентраций наночастиц меди на рост водорослей. Так называемый эффект гормезиса был отмечен у *Chlorobion braunii* (Echeveste et al., 2017), *Chlorella* sp. (Wan et al., 2018).

Установлено, что исследуемые виды водорослей по-разному реагировали на добавление в среду сублетальных концентраций наночастиц оксида меди (400 мкг/л для *P. cordatum* и 3000 мкг/л для *D. salina*). Результаты представлены на рис. 2. У обоих видов ингибирующее воздействие поллютанта на микроводоросли отмечено уже в первые

часы после его внесения в среду. Через 3 ч культивирования, как у *D. salina*, так и у *P. cordatum*, наблюдалось 30%-е снижение численности клеток. Однако для *D. salina* оно имело обратимый характер. Так, через 6 ч после внесения поллютанта отмечено восстановление роста культуры, но с более низкой скоростью, чем в контроле. Удельная скорость роста на участке экспоненциального роста составила 0.1 сут^{-1} . Через 6 сут культивирования водорослей в данных условиях отмечен выход кривой роста на стационарную фазу при численности клеток в культуре 2.8×10^4 кл./мл. В то же время в контрольном варианте эксперимента (без добавления НЧ) удельная скорость роста водорослей была в 3 раза выше, а конечная плотность культуры достигала 12.4×10^4 кл./мл.

У *P. cordatum* отмечен иной физиологический отклик на воздействие сублетальных концентраций исследуемого поллютанта. Как было отмечено выше, внесение в культуральную среду CuO НЧ в концентрации 400 мкг/л на начальном этапе эксперимента (первые 3 ч) приводило к 30%-ому снижению числа клеток в культуре до $0.7\text{--}0.8 \times 10^4$ кл./мл. Дальнейшее культивирование водорослей в этих условиях в течение 4 сут не оказывало существенного влияния на их численность. При этом клетки сохраняли свою жизнеспособность, однако отмечено значительное уменьшение их подвижности. Такие поведенческие реакции водорослей на длительное культивирование в условиях пороговых концентраций CuO НЧ связаны с физиологическими особенностями исследуемых видов водорослей. Отсутствие роста у *P. cordatum*, вероятно, обусловлено формированием неподвижных стадий или покоящихся цист, которое свойственно данному виду в случае наступления неблагоприятных условий для

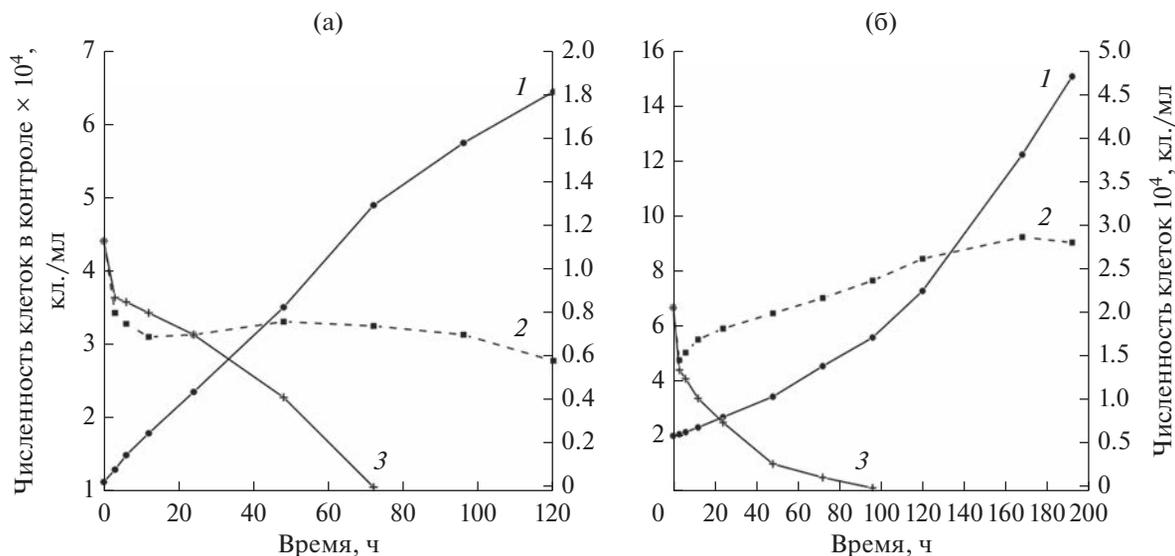


Рис. 2. Динамика численности клеток *P. cordatum* (а, 1 – контроль, 2 – 400 мкг/л CuO НЧ, 3 – 520 мкг/л CuO НЧ) и *D. salina* (б, 1 – контроль, 2 – 3000 мкг/л CuO НЧ, 3 – 3750 мкг/л CuO НЧ) после добавления в среду сублетальных и летальных концентраций наночастиц оксида меди.

вегетации (Matantseva et al., 2020). Однако агрегация наночастиц на клеточной стенке *P. cordatum*, отчетливо наблюдаемая в ходе микроскопирования, и, возможно, интернализация их через поры или в ходе экдизиса (сбрасывание клеточных покровов для формирования цист) приводила к дальнейшему разрушению клеток и гибели культуры. Описываемый характер роста *D. salina* в условиях сублетальных концентраций наночастиц в среде может быть объяснен адаптационными механизмами, направленными на предотвращение токсического влияния поллютантов, путем производства внеклеточных полимерных веществ и элиминации соединений во внешнюю среду (Sendra et al., 2018a).

У обоих исследуемых видов после добавления в среду НЧ CuO отмечено резкое увеличение продукции АФК, приводящее к развитию окислительного стресса в клетках. Максимальные значения флуоресценции D2CFH-DA, отражающей продукцию АФК в клетках, наблюдались через 72 ч после добавления поллютанта. Изменение флуоресценции D2CFH-DA в зависимости от концентрации наночастиц в среде на 3 сут эксперимента представлено на рис. 3а. Полученные данные демонстрируют видоспецифичность физиологического отклика микроводорослей к действию поллютанта: CuO НЧ более токсичны для *P. cordatum*, чем для *D. salina*. Так, у *P. cordatum* трехкратное увеличение значений флуоресценции D2CFH-DA относительно контроля отмечено уже при 100 мкг/л CuO НЧ, а при концентрации нанопорошка 520 мкг/л величина D2CFH-DA повышалась до максимальных 300 отн. ед. У *D. salina* в диапазоне концентраций НЧ 0–2500 мкг/л флуоресценция

D2CFH-DA повышалась от 40 до 110 отн. ед., резкое увеличение исследуемого параметра до 220 отн. ед. отмечено только при концентрации меди 3750 мкг/л. Следует отметить, что прогрессирующая продукция АФК в клетках двух исследуемых видов водорослей происходит на фоне снижения их удельной скорости роста (рис. 3б), что указывает на токсическое воздействие меди на клетку. Такой эффект CuO НЧ может объясняться высвобождением ионов меди Cu²⁺ из оксида или проникновением отдельных наночастиц внутрь клеток (Wang et al., 2020).

Известно, что эукариотические водоросли способны продуцировать хелатирующие медь лиганды (фитохелатины) (Ahner et al., 1995; Ahner, Morel, 1995), которые связывают растворенные в воде ионы металлов в хелатные комплексы, тем самым уменьшая их активность и токсическое действие на клетки. Исследования данной направленности проводились с разными представителями фитопланктона (Sunda, Huntsman, 1998) и показали, что скорость и способность продуцирования органических лигандов видоспецифична (Ahner et al., 1995; Ahner, Morel, 1995; Shafik, 2008). По мнению многих авторов именно это является основной причиной наблюдаемых различий в чувствительности видов микроводорослей к действию токсикантов (Ahner et al., 1995; Ahner, Morel, 1995; Echeveste et al., 2018). Так в исследовании (Ahner et al., 1995) отмечено, что у динофитовой микроводоросли *Heterocapsa pygmaea*, в отличие от других исследованных в работе видов (диатомеи *Thalassiosira weissflogii* и *T. oceanica*, зеленые микроводоросли *Dunaliella tertiolecta* и *Tet-*

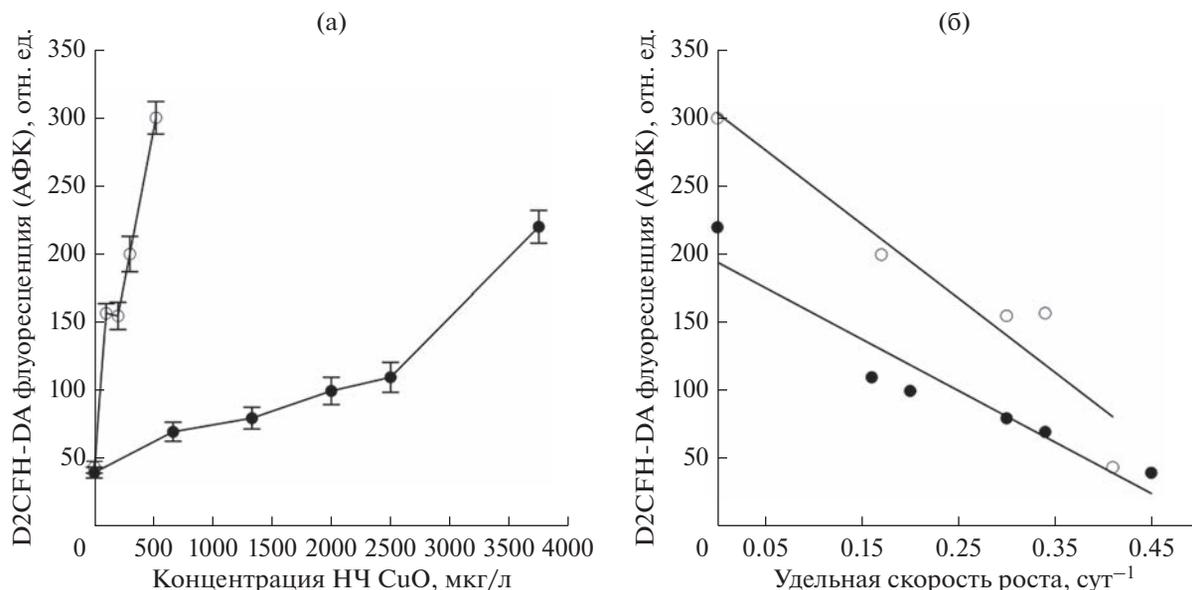


Рис. 3. (а) Изменение флуоресценции D2CFH-DA (продукция активных форм кислорода) в зависимости от концентрации CuO НЧ в среде у *P. cordatum* (○) и *D. salina* (●) через 72 ч после добавления поллютанта; (б) связь флуоресценции D2CFH-DA и удельной скорости роста у *P. cordatum* (○) и *D. salina* (●) при воздействии CuO НЧ.

raselmis maculata, кокколитофориды *Pleurochrysis carterae*, *Emiliania huxleyi* и *Pavlova lutheri*), не наблюдалось увеличения продукции фитохелатина с ростом концентрации кадмия в культуральной среде. Это, по мнению авторов, может свидетельствовать о высокой чувствительности таксономической группы динофитовых водорослей к загрязнениям тяжелыми металлами. Данные, подтверждающие данную гипотезу, представлены и в ряде других работ, основным объектом исследования которых являлся *P. cordatum*, а в качестве поллютантов использовались гербицид (Ebenezer, Ki, 2013) и биоцид сульфата меди (Guo et al., 2016). Ссылаясь на полученные результаты, авторы вышеуказанных работ предлагают рассматривать *P. cordatum* как наиболее подходящий модельный организм для оценки экотоксичности в морской среде. В то время как *D. salina*, наоборот, способна уменьшать токсическое действие меди на клетки путем производства внеклеточных полимерных веществ, связывающих ионы меди, и элиминации токсиканта во внешнюю среду (Shafic, 2008). Поэтому *D. salina*, как и ряд других зеленых микроводорослей (Shafic, 2008), не только является перспективным видом для промышленного получения каротиноидов, но и может активно использоваться в биоремедиации вод, загрязненных металлами.

Очевидно, что способность продуцировать хелатирующие лиганды является не единственным объяснением степени толерантности разных систематических групп водорослей к действию поллютантов. В ходе эволюции микроводоросли выработали и ряд других ответных реакций (включение

антиоксидантной системы, изменение проницаемости клеточных мембран и другие), позволяющих им адаптироваться в среде, подверженной загрязнению металлами (Ahner et al., 1995; Ahner, Morel, 1995; Wang et al., 2020). Кроме того, в работе (Blanck, 2002) показано, что различная устойчивость видов к действию поллютантов может быть объяснена различием их условий существования, т.е. виды, вегетирующие в экстремальных экосистемах (*D. salina* является типичным представителем флоры гиперсоленых озер), будут более толерантны и к другим антропогенным загрязнителям.

Влияние наночастиц оксида меди на морфологию клеток *P. cordatum* и *D. salina*, объем клеток и их гранулярность. Морфометрические исследования клеток *D. salina* в нативной пробе (контроль) показали, что *D. salina* была представлена большей частью грушевидными (56%), а также шаровидными (44%) формами, снабженными двумя жгутиками одинаковой длины (рис. 4в). Клетки *P. cordatum* имели уплощенную форму, варьирующую от овально-округлой до сердцевидной, при этом в культуре доминировали водоросли обычной формы с плотным клеточным содержимым (84%), единично встречались клетки округлой формы (рис. 4а). Добавление наночастиц меди вызывало значительное увеличение клеточных объемов и гетерогенности размерной структуры исследуемых видов водорослей. Средний объем клеток *D. salina* в контроле составлял 390 ± 80 мкм³, тогда как при добавлении в среду CuO НЧ в концентрации 2500 мкг/л он достоверно

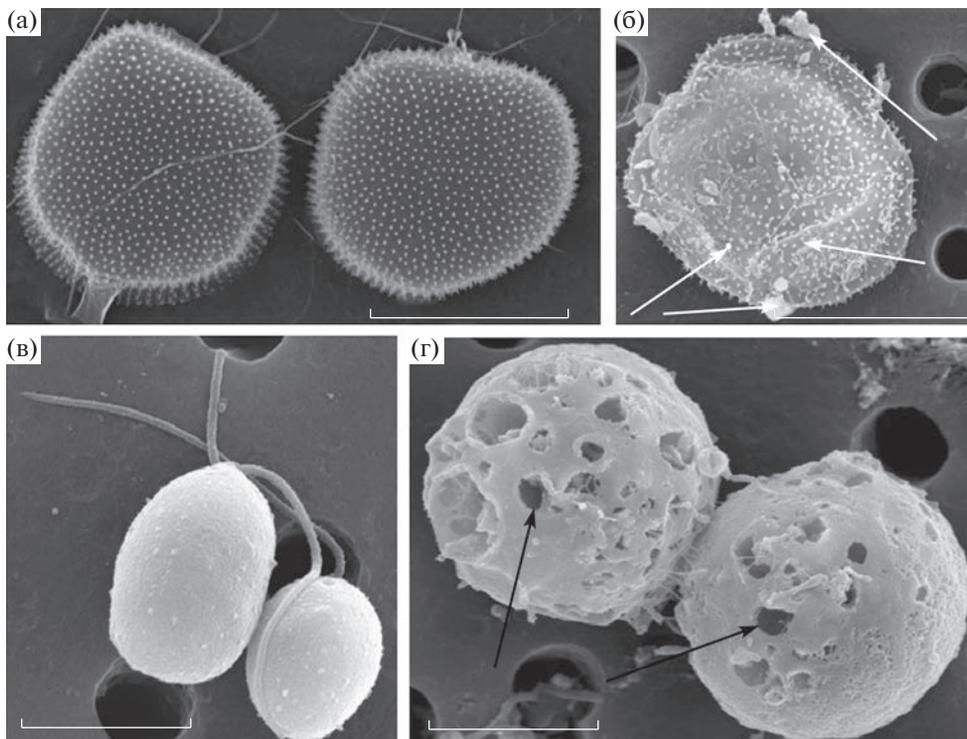


Рис. 4. Микрофотографии *P. cordatum* и *D. salina* при различных условиях культивирования: (а) – нативная проба *P. cordatum* (контроль), (б) – культивирование *P. cordatum* с добавлением CuO НЧ 300 мкг/л; (в) – нативная проба *D. salina* (контроль), (г) – культивирование *D. salina* с добавлением CuO НЧ 2500 мкг/л (по данным СМ через 72 ч культивирования). Масштабная линейка соответствует 5 мкм для *D. salina* и 10 мкм для *P. cordatum*.

увеличивался в 1.3 раза до 530 ± 87 мкм³ по сравнению с контролем (непарный *t*-тест, $p < 0.05$).

У *P. cordatum* через 72 ч после внесения в среду CuO НЧ в концентрации 300 мкг/л средний объем клеток также достоверно повышался до 1530 ± 230 мкм³ по сравнению с контролем 960 ± 70 мкм³ (непарный *t*-тест, $p < 0.05$). Добавление поллюта в культуральную среду у обоих видов водорослей вызывало изменение их клеточной формы (рис. 4б, 4г). Так, доля грушевидных клеток в культуре *D. salina* снижалась до 29%, что было в 2 раза ниже, чем в контроле, а количество шаровидных форм увеличивалось до 71%. У *P. cordatum* количество клеток нормальной формы снижалось в 9.3 раза (до 9%), а также наблюдалось увеличение в 1.4 раза числа клеток с ретракцией цитоплазмы (до 23%). У обоих видов микроводорослей обнаруживались клетки неправильной формы, полупрозрачные с разрушенным содержимым.

Округление клеток и увеличение их линейных размеров, как известно, является реакцией на стрессовые условия роста (Антоненко и соавт., 2010). В работе (Alho et al., 2020) с пресноводным видом *Raphidocelis subcapitata* авторами также отмечены значительные морфологические изменения клеток, вызванные CuO НЧ: увеличение объемов клеток и их зернистости при концентрации

наночастиц в среде свыше 0.97 мг/л. Кроме того, инкубирование *P. cordatum* в среде с добавлением сублетальных концентраций наночастиц оксида меди приводило к перестройке клеточных покровов водорослей после стрессового воздействия. В литературе этот процесс описан как экдизис – сбрасывание клеточных покровов (Morrill, Loebllich, 1983). Подобные перестройки чаще всего происходят при формировании неподвижных стадий, временных или покоящихся цист, в ответ на неблагоприятные условия роста (Matantseva et al., 2020).

Анализ морфологической структуры *D. salina* и *P. cordatum* с помощью сканирующего электронного микроскопа показал, что большинство клеток характеризуются значительной деформацией клеточной стенки и изменением формы клеток; черными стрелками на микрофотографиях обозначены места очевидных повреждений. При воздействии НЧ на клетки *P. cordatum* отмечено “сморщивание” и усадка клеточной стенки (рис. 4б, белые стрелки), а также адсорбция агрегатов НЧ на поверхности клетки (рис. 4б, белые стрелки), происходящая за счет электростатических взаимодействий и химических связей, как указано в работе (Adeleye, Keller, 2016). Отметим, что подобного рода реакции на присутствие в среде на-

ночастиц являются типичными и наблюдаются у многих других видов микроводорослей (Wang et al., 2020), в том числе и у пресноводных микроводорослей (Aruoja et al., 2009).

У обоих исследованных видов увеличение концентрации CuO НЧ в среде приводило к линейному повышению гранулярности клеток (боковое светорассеяние SS). Так, через 72 ч культивирования *D. salina* при концентрации поллютанта от 0 до 2500 мкг/л SS клеток составляла от 75 до 160, у *P. cordatum* гранулярность клеток изменялась от 211 до 345 в диапазоне концентраций CuO НЧ 0 до 300 мкг/л. Закономерное повышение SS, очевидно, обусловлено механическим воздействием наночастиц на микроводоросли, приводящим к ультраструктурным повреждениям клеток. Аналогичные результаты, где механическое воздействие металлических НЧ на клетки микроводорослей подтверждалось одновременно данными СЭМ и увеличением сигнала бокового светорассеяния, были отмечены в ряде работ (Saison et al., 2009; Oukarroum et al., 2019). Так, в исследовании (Xia et al., 2015) показано, что при добавлении в культуральную среду 5 мг/л TiO₂ НЧ у *Nitzschia closterium* обнаружено значительное повышение интенсивности бокового светорассеяния по сравнению с контролем. Авторы полагают, что увеличение интенсивности SS указывает на поглощение/интернализацию TiO₂ НЧ водорослями.

Считается, что виды с тонкой клеточной стенкой более чувствительны к воздействию НЧ, чем виды с плотными целлюлозными, кремниевыми или карбонатными клеточными оболочками (Oukarroum et al., 2015). Основываясь на этом положении, стоило бы полагать, что *D. salina*, из-за отсутствия клеточной стенки в качестве “защитного барьера”, менее устойчива к механическому воздействию наночастиц по сравнению с *P. cordatum*, клетки которого покрыты армированным целлюлозным панцирем. Однако в нашем исследовании данная теория не нашла своего подтверждения. Кроме того, данная гипотеза опровергается и в ряде других исследований (Rohder et al., 2015; Sendra et al., 2018). Так, в работе (Rohder et al., 2015) показано, что чувствительность к воздействию наночастиц CeO₂ и Ce(NO₃)₃ у штамма пресноводной водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* с плотной клеточной стенкой и мутантного штамма без клеточной стенки была одинаковой, указывая на то, что оболочка клетки не препятствовала негативному воздействию поллютантов. Мы полагаем, что *D. salina*, как и ряд других микроводорослей, лишенных клеточной стенки, в стрессовых условиях способна к формированию плотной многослойной структуры, которая представляет собой внеклеточные полимерные вещества (полисахариды, белки, ДНК и липиды), окружающие клетки микроводорослей (Tang et al., 2018). Эта способность опреде-

ленных видов водорослей к синтезу данной структуры, выступающей в качестве внешнего барьера от воздействия НЧ и их проникновения внутрь клетки, делает их более устойчивыми к подобному виду загрязнителя.

Таким образом, по результатам экспериментального исследования установлены основные закономерности изменения ростовых, морфологических и функциональных показателей *P. cordatum* и *D. salina* при добавлении в культуральную среду CuO НЧ в разной концентрации. Анализ собственных и литературных данных показал, что механизм негативного влияния CuO НЧ на микроводоросли схож для разных видов и определяется совокупным эффектом двух разнонаправленных процессов: токсического воздействия на клетки и механического повреждения клеточных покровов. Токсический эффект влияния поллютанта проявляется в прогрессирующем увеличении продукции активных форм кислорода в клетках водорослей, индуцирующей окислительный стресс, на фоне снижения их удельной скорости роста, что, вероятно, объясняется высвобождением ионов меди Cu²⁺ из оксида или проникновением отдельных наночастиц внутрь клеток. Механическое воздействие НЧ вызывает деформацию и повреждение клеточных оболочек, а также наблюдается их агрегация на поверхности водорослей. Существующая гипотеза о защитной “барьерной” роли клеточной стенки от механического воздействия металлических наночастиц (Saison et al., 2010; Tang et al., 2018) не нашла подтверждения в нашем исследовании. Так, наличие плотного армированного целлюлозного панциря у *P. cordatum* не обеспечивало клеткам большую устойчивость от механического воздействия CuO НЧ по сравнению с *D. salina* с ультратонкой клеточной оболочкой.

Однако, несмотря на схожий механизм действия исследуемого поллютанта, разные виды водорослей сильно различаются по степени устойчивости к воздействию CuO НЧ, что обусловлено видоспецифическими особенностями их морфологии и физиологии. Одной из основных причин толерантности микроводорослей к воздействию металлических НЧ служит их способность продуцировать высокие концентрации лигандов (фитохелатины и металлотионеины), выделяемых клетками в среду для связывания ионов меди. Кроме того защитным механизмом микроводорослей с тонкими клеточными стенками, предотвращающим их взаимодействие с наночастицами, является способность секретировать в условиях стресса внеклеточные полимерные соединения (полисахариды, белки, липиды), для формирования вокруг клетки плотной многослойной защитной структуры. Устойчивость видов к воздействию CuO НЧ зависит также от ареала и условий их существования: виды, приуроченные к экстремаль-

ным экосистемам, более толерантны к воздействию поллютанта, чем представители морского и пресноводного фитопланктона, также как и виды из загрязненных мест обитания будут более устойчивы к поллютантам, чем микроводоросли чистых мест.

Учитывая разную степень толерантности и особенности физиологического отклика на воздействие CuO НЧ, динофлагеллят *P. cordatum* может эффективно применяться в качестве модельного организма для оценки качества морской воды в результате ее загрязнения наночастицами оксида меди. Тогда как зеленая микроводоросль *D. salina* является перспективным видом, который можно использовать в биоремедиации вод, загрязненных тяжелыми металлами.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают глубокую признательность сотруднику отдела экологической физиологии водорослей Федерального исследовательского центра “Института биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН” О.С. Алатарцевой за предоставленные культуры микроводорослей и начальнику лаборатории микроскопии В.Н. Лишаеву за помощь в работе с электронным микроскопом.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках тем государственного задания Федерального исследовательского центра “Института биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН” № 121041400077-1 “Функциональные, метаболические и токсикологические аспекты существования гидробионтов и их популяций в биотопах с различным физико-химическим режимом” и № 121030300149-0 “Исследование механизмов управления продукционными процессами в биотехнологических комплексах с целью разработки научных основ получения биологически активных веществ и технических продуктов морского генезиса”.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Антоненко С.П., Догадина Т.В., Комаристая В.П. Изменчивость морфометрических признаков *Dunaliella salina* в условиях культуры // Экология моря. 2010. Т. 81. С. 5–12.

Брянцева Ю.В., Лях А.М., Сергеева А.В. Расчет объемов и площадей поверхности одноклеточных водорослей Черного моря. Севастополь: НАН Украины Институт биологии южных морей, 2005. 25 с.

Сеничева М.И. Новые и редкие для Черного моря виды диатомовых и динофитовых водорослей // Экология моря. 2002. Т. 62. С. 25–29.

Финенко З., Ланская Л. Рост и скорость деления водорослей в лимитированных объемах воды // Экологическая физиология морских планктонных водорослей. Киев, 1971. С. 22–26.

Adeleye A.S., Conway J.R., Garner K., Huang Y., Su Y., Keller A.A. Engineered nanomaterials for water treatment and remediation: Costs, benefits, and applicability // Chem. Eng. J. 2016. V. 286. P. 640–662. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.10.105>

Adeleye A.S., Keller A.A. Interactions between algal extracellular polymeric substances and commercial TiO_2 nanoparticles in aqueous media // Environ. Sci. Technol. 2016. V. 50. P. 12258–12265. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b03684>

Ahner B.A., Kong S., Morel F.M.M. Phytochelatin production in marine algae. 1. An interspecies comparison // Limnol. Oceanogr. 1995. V. 40. P. 649–657. <https://doi.org/10.4319/lo.1995.40.4.0649>

Ahner B.A., Morel F.M.M. Phytochelatin production in marine algae. 2. Induction by various metals // Limnol. Oceanogr. 1995. V. 40. P. 658–665. <https://doi.org/10.4319/lo.1995.40.4.0658>

Alho L.D.O.G., Souza J.P., Rocha G.S., da Silva Mansano A., Lombardi A.T., Sarmiento H., Melão M.G.G. Photosynthetic, morphological and biochemical biomarkers as tools to investigate copper oxide nanoparticle toxicity to a freshwater chlorophyceae // Environ. Pollut. 2020. V. 265. P. 114856. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114856>

Anufrieva E.V., Balycheva D.S., Vdodovich I.V., Shadrin N.V. Microalgae in the diet of *Eucypris mareotica* (Crustacea, Ostracoda) in the hypersaline lake Chersonesskoye (Crimea) // Ecologica Montenegrina. 2018. V. 17. P. 100–104.

Aruoja V., Dubourguier H.C., Kasemets K., Kahru A. Toxicity of nanoparticles of CuO , ZnO and TiO_2 to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata* // Sci. Total Environ. 2009. V. 407. P. 1461–1468. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.10.053>

Blanck H. A critical review of procedures and approaches used for assessing pollution-induced community tolerance (PICT) in biotic communities // Hum. Ecol. Risk Assess. 2002. V. 8. P. 1003–1034. <https://doi.org/10.1080/1080-700291905792>

Ebenezer V., Ki J.S. Quantification of toxic effects of the herbicide metolachlor on marine microalgae *Ditylum brightwellii* (Bacillariophyceae), *Prorocentrum minimum* (Dinophyceae), and *Tetraselmis suecica* (Chlorophyceae) // J. Microbiol. 2013. V. 51. P. 136–139. <https://doi.org/10.1007/s12275-013-2114-0>

Echeveste P., Croot P., von Dassow P. Differences in the sensitivity to Cu and ligand production of coastal vs offshore

- strains of *Emiliania huxleyi* // Sci. Total Environ. 2018. V. 625. P. 1673–1680.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.050>
- Echeveste P., Silva J.C., Lombardi A.T.* Cu and Cd affect distinctly the physiology of a cosmopolitan tropical freshwater phytoplankton // Ecotoxicol. Environ. Saf. 2017. V. 143. P. 228–235.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.05.030>
- Guillard R., Ryther J.* Studies of marine planktonic diatoms: I. *Cyclotella nana* (Hustedt), and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran // J. Can. Microbiol. 1962. V. 8. P. 229–239.
<https://doi.org/10.1139/m62-029>
- Guo R., Lim W.A., Ki J.S.* Genome-wide analysis of transcription and photosynthesis inhibition in the harmful dinoflagellate *Prorocentrum minimum* in response to the biocide copper sulfate // Harmful Algae. 2016. V. 57. P. 27–38.
<https://doi.org/10.1016/j.hal.2016.05.004>
- Heil C.A., Glibert P.M., Fan C.* *Prorocentrum minimum* (Pavillard) Schiller: a review of a harmful algal bloom species of growing worldwide importance // Harmful Algae. 2005. V. 4. P. 449–470.
<https://doi.org/10.1016/j.hal.2004.08.003>
- Klaine S.J., Alvarez P.J., Batley G.E., Fernandes T.F., Handy R.D., Lyon D.Y., Mahendra S., McLaughlin M.J., Lead J.R.* Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability, and effects // Environ. Toxicol. Chem. 2008. V. 27. P. 1825–1851.
<https://doi.org/10.1897/08-090.1>
- Li M., Jiang Y., Chuang C.Y., Zhou J., Zhu X., Chen D.* Recovery of *Alexandrium tamarense* under chronic exposure of TiO₂ nanoparticles and possible mechanisms // Aquat. Toxicol. 2019. V. 208. P. 98–108.
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.01.007>
- Matantseva O., Berdieva M., Kalinina V., Pozdnyakov I., Pechkovskaya S., Skarlato S.* Stressor-induced ecdysis and the cate cyst formation in the armoured dinoflagellates *Prorocentrum cordatum* // Sci. Rep. 2020. V. 10. P. 1–17.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-75194-3>
- Miller R.J., Lenihan H.S., Muller E.B., Tseng N., Hanna S.K., Keller A.A.* Impacts of metal oxide nanoparticles on marine phytoplankton // Environ. Sci. Technol. 2010. V. 44. P. 7329–7334.
<https://doi.org/10.1021/es100247x>
- Morrill L.C., Loeblich A.R.* Formation and release of body scales in the dinoflagellate genus *Heterocapsa* // J. Mar. Biol. Assoc. UK. 1983. V. 63. P. 905–913.
<https://doi.org/10.1017/S0025315400071319>
- Murtey M.D., Ramasamy P.* Sample preparations for scanning electron microscopy – life sciences // Modern Electron Microscopy in Physical and Life Sciences / Eds. Janacek M., Kral R. IntechOpen, 2016. P. 161–185.
- Oukarroum A., Bras S., Perreault F., Popovic R.* Inhibitory effects of silver nanoparticles in two green algae, *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta* // Ecotoxicol. Environ. Saf. 2012. V. 78. P. 80–85.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.11.012>
- Oukarroum A., Halimi I., Siyaj M.* Cellular responses of *Chlorococcum* sp. algae exposed to zinc oxide nanoparticles by using flow cytometry // Water Air Soil Pollut. 2019. V. 230. P. 1–7.
<https://doi.org/10.1007/s11270-018-4051-3>
- Rohder L.A., Brandt T., Sigg L., Behra R.* Influence of agglomeration of cerium oxide nanoparticles and speciation of cerium(III) on short term effects to the green algae *Chlamydomonas reinhardtii* // Aquat. Toxicol. 2014. V. 152. P. 121–130.
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.03.027>
- Saison C., Perreault F., Daigle J.C., Fortin C., Claverie J., Morin M., Popovic R.* Effect of core-shell copper oxide nanoparticles on cell culture morphology and photosynthesis (photosystem II energy distribution) in the green alga, *Chlamydomonas reinhardtii* // Aquat. Toxicol. 2010. V. 96. P. 109–114.
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.10.002>
- Sendra M., Blasco J., Araujo C.V.M.* Is the cell wall of marine phytoplankton a protective barrier or a nanoparticle interaction site? Toxicological responses of *Chlorella autotrophica* and *Dunaliella salina* to Ag and CeO₂ nanoparticles // Ecol. Indic. 2018. V. 95. P. 1053–1067.
<https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2017.08.050>
- Sendra M., Moreno-Garrido I., Blasco J., Araujo C.V.* Effect of erythromycin and modulating effect of CeO₂ NPs on the toxicity exerted by the antibiotic on the microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* and *Phaeodactylum tricornutum* // Environ. Pollut. 2018. V. 242. P. 357–366.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.07.009>
- Shafik M.A.* Phytoremediation of some heavy metals by *Dunaliella salina* // Global J. Environ. Res. 2008. V. 2. P. 01–11.
- Sunda W.G., Huntsman S.A.* Processes regulating cellular metal accumulation and physiological effects: phytoplankton as model systems // Sci. Total Environ. 1998. V. 219. P. 165–181.
[https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(98\)00226-5](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(98)00226-5)
- Tang Y., Xin H., Yang F., Long X.* A historical review and bibliometric analysis of nanoparticles toxicity on algae // J. Nanopart. Res. 2018. V. 20:92. P. 1–17.
<https://doi.org/10.1007/s11051-018-4196-4>
- Wan J.K., Chu W.L., Kok Y.Y., Cheong K.W.* Assessing the toxicity of copper oxide nanoparticles and copper sulfate in a tropical *Chlorella* // J. Appl. Phycol. 2018. V. 30. P. 3153–3165.
<https://doi.org/10.1007/s10811-018-1408-3>
- Wang H., Joseph J.A.* Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader // Free Rad. Biol. Med. 1999. V. 27. P. 612–616.
[https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(99\)00107-0](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(99)00107-0)
- Wang L., Huang X., Sun W., Too H.Z., Laserna A.K.C., Li S.F.Y.* A global metabolomic insight into the oxidative stress and membrane damage of copper oxide nanoparticles and microparticles on microalga *Chlorella vulgaris* // Environ. Pollut. 2020. V. 258. P. 113647.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113647>
- Xia B., Chen B., Sun X., Qu K., Ma F., Du M.* Interaction of TiO₂ nanoparticles with the marine microalga *Nitzschia closterium*: growth inhibition, oxidative stress and internalization // Sci. Total Environ. 2015. V. 508. P. 525–533.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.11.066>

Comparative Assessment of Stress Responses of the Microalgae *Prorocentrum cordatum* (Ostenfeld) Dodge and *Dunaliella salina* (Teod.) to the Presence of Copper Nanoparticles

E. S. Solomonova¹, *, N. Yu. Shoman¹, A. I. Akimov¹, and O. A. Rylkova¹

¹Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas, Russian Academy of Sciences, Sevastopol, 299011 Russia

*e-mail: solomonov83@mail.ru

Received May 25, 2022; revised August 23, 2022; accepted August 24, 2022

Abstract—Comparative assessment of stress responses of two microalgal species differing in their cell structure and habitats, *Prorocentrum cordatum* and *Dunaliella salina*, to the presence of copper oxide nanoparticles (NP) in the medium was carried out. The nanoparticles were found to have a similar effect on both species. Their toxic effect resulted in progressing production of reactive oxygen species in the algal cells, while their specific growth rates decreased, probably due to Cu²⁺ release from the oxide or to penetration of some nanoparticles into the cells. NP mechanical impact resulted in their aggregation at the cell surface and deformation of the cell envelopes. The presence in the toxicant in the medium caused a reliable increase in cell volume, plasmalemma perforation, and predominance of deformed cells of irregular shape in the cultures. Two species exhibited different resistance to CuO NP. The sublethal and lethal concentrations for *P. cordatum* were 400 and 520 µg/L, respectively, compared to 3000 and 3750 µg/L for *D. salina*. The possible causes for resistance of *D. salina* to CuO NP are discussed. *D. salina* is able to produce ligands (phytochelatins and metallothioneins) in high concentrations, which may be released into the medium and bind the Cu²⁺ ions. Moreover, the habitats of *D. salina* are extreme, which may promote its stress tolerance, probably a genetically determined feature and a part of their overall resistance to other contaminants. High resistance of *D. salina* to CuO NP may also be due to its ability to secrete extracellular polymers under stress conditions; they may form a protective layer preventing the interaction between the microalgae and NP. Application of *P. cordatum* for biomonitoring of NP-contaminated seawater environments is proposed. *D. salina* may be promising for water bioremediation.

Keywords: microalgal cultures, EC₅₀, reactive oxygen species, cell morphology, flow cytometry, scanning electron microscopy, contamination with metal nanoparticles

БИОЦИДНАЯ АКТИВНОСТЬ НАНОЧАСТИЦ АСПАРАГИНАТА ХИТОЗАНА

© 2023 г. А. Б. Шиповская^а, Т. Н. Луговицкая^б, *, И. В. Зудина^а

^аСаратовский национальный исследовательский государственный университет
им. Н.Г. Чернышевского, Саратов, 410012 Россия

^бУральский федеральный государственный университет им. первого Президента России Б.Н. Ельцина,
Екатеринбург, 620002 Россия

*e-mail: tlugovitskaja@mail.ru

Поступила в редакцию 09.07.2022 г.

После доработки 14.08.2022 г.

Принята к публикации 14.08.2022 г.

Исследована биологическая активность наночастиц аспарагината хитозана, образующихся в системе хитозан–L-аспарагиновая кислота–вода на начальном этапе фазового разделения, в отношении клеток эу- и прокариот. Культивирование *Staphylococcus aureus* 209 P и *Escherichia coli* 113-13 в питательной среде с добавлением наночастиц приводило к массивной гибели бактериальных культур. Наиболее высокое биоцидное действие проявлялось в отношении грамположительных бактерий. Биотестирование выявило высокую биосовместимость наночастиц хитозана и их способность ускорять пролиферативную активность эпидермальных и эпителиальных клеточных культур. Полученные результаты демонстрируют перспективность использования наночастиц аспарагината хитозана в медико-биологических и фармакологических приложениях.

Ключевые слова: аспарагинат хитозана, наночастицы, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, фибробласты, кератиноциты, эпителиоциты

DOI: 10.31857/S0026365622600547, **EDN:** NNDRBA

В последние годы особое внимание уделяется получению наночастиц хитозана и исследованию их биологической функциональности. Хитозан – линейный сополимер (1 → 4)-2-амино-2-дезоксид-β-D-глюкана и (1 → 4)-2-ацетиламино-2-дезоксид-β-D-глюкана со степенью дезацетилирования выше ~75 мол. %. Метаболизируется некоторыми ферментами человека, особенно лизоцимом, что позволяет рассматривать его как биорезорбируемый полимер (Muzzarelli, 2011; Babicheva et al., 2017). Он антиоксичен (Салтыкова и соавт., 2018; Gegel et al., 2018), обладает высокой мукоадгезией (Stie et al., 2020), проявляет антиоксидантные (Салтыкова и соавт., 2018) и биоцидные свойства (Rhoades, Roller, 2000; No et al., 2002; Raafat et al., 2008; Kong et al., 2010; Куликов и соавт., 2012; Гегель и соавт., 2018), ингибирует процесс формирования биопленок (Полюдова и соавт., 2019). Сочетает в себе высокую биосовместимость (Ripaudo, 2006; Muzzarelli, 2011) и ранозаживляющие свойства (Lau, Kiick, 2015; Шиповская и соавт., 2021). Установлено, что хитозан оказывает активизирующее действие на макрофаги, ингибирует металлопротеиназы, а также действует как хемотактант для нейтрофилов, стимулирует эпителизацию и образование грануляционной ткани (Muzzarelli, 2011). При этом хитоолигомеры

участвуют в синтезе гликозаминогликанов, способствующих подвижности, адгезии и пролиферации клеток и, соответственно, восстановлению тканей.

Как и хитозан, наночастицы на его основе нетоксичны (Mohammed et al., 2017), обладают широким спектром антибактериальной активности (Rozman et al., 2019; Chandrasekaran et al., 2020), мукоадгезивностью (Marciello et al., 2017; Mohammed et al., 2017), противовоспалительным и антиоксидантным потенциалом (Supraja et al., 2018; Mubarak et al., 2018), противораковым (Kravanja et al., 2019) и ранозаживляющим действием (Rossi et al., 2017; Rozman et al., 2019). Кроме того, благодаря малым размерам хитозановые наночастицы приобретают дополнительные ценные свойства, такие как увеличенная площадь поверхности и квантовые размерные эффекты (Chandrasekaran et al., 2020). Показано, что биоактивность наночастиц хитозана оказывается существенно более высокой по сравнению с исходным хитозаном (Rossi et al., 2017; Chandrasekaran et al., 2020). В случае иммобилизации в структуре наночастиц противомикробных препаратов наблюдается не только стабилизация, но и повышение эффективности действия антимикробного агента (Rozman et al., 2019).

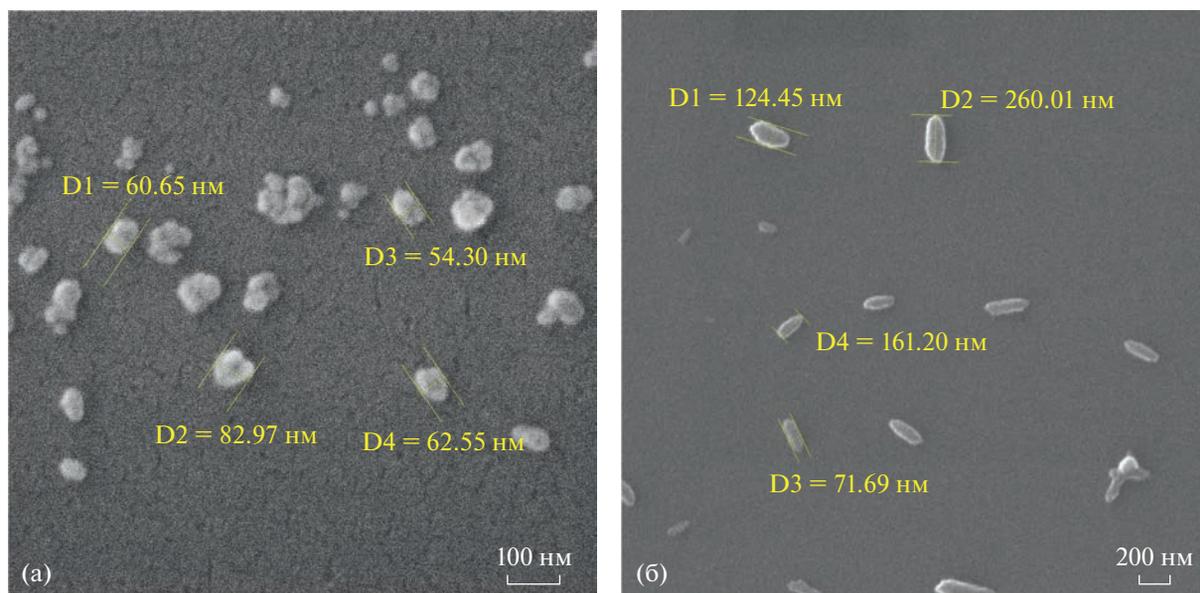


Рис. 1. СЭМ-фотографии наночастиц аспарагината хитозана, выделенных из системы хитозан–AspA–вода через 24 (а) и 36 ч (б) после ее приготовления.

Наночастицы хитозана могут быть получены с использованием эмульсионной или межфазной полимеризации, коацервации/осаждения, самосборки, ионотропного гелеобразования с использованием ионных сшивающих агентов и др. (Ильина и соавт., 2008; Luangtana-Anan et al., 2017; Rossi et al., 2017; Divya, Jisha, 2018). Хитозановые наночастицы перспективны в системах контролируемой непарентеральной доставки лекарств и их пролонгированного высвобождения в зоне запланированной локализации (Mohammed et al., 2017; Divya, Jisha, 2018), а также инкапсуляции биологически активных веществ (Marciello et al., 2017; Luangtana-Anan et al., 2017; Rozman et al., 2019), тераностике (Jhaveri et al., 2021), в качестве высокоэффективных ранозаживляющих материалов (Rozman et al., 2019), противомикробных агентов (Divya, Jisha, 2018; Chandrasekaran et al., 2020), средств стимуляции роста и защиты растений (Yu et al., 2021). Отмечается также расширение биологической функциональности наночастиц при использовании для их получения солей хитозана с фармакологически активными карбоновыми кислотами и аминокислотами – аскорбиновой, гликолевой, молочной, глутаминовой (Rossi et al., 2017; Luangtana-Anan et al., 2017).

В настоящей работе для получения наночастиц использовали соль хитозана с *L*-аспарагиновой кислотой (AspA). Ранее нами исследованы условия растворения хитозана в водном растворе AspA (Луговицкая и соавт., 2017, 2020). Обнаружено, что система хитозан–AspA–вода кинетически нестабильна вследствие эффектов ионной ассоциации, и через ~24–36 ч после ее приготовления обра-

зуются зародыши новой фазы в виде сферических и эллипсоидных наночастиц (Lugovitskaya et al., 2022; рис. 1). Во времени наблюдается агрегация наночастиц, и через ~72–96 ч концентрированная по полимеру фаза высаждается из системы в виде мелкодисперсного осадка. ИК-спектроскопия и рентгеновская дифрактометрия показали, что осадок представлен солевой формой аспарагината хитозана с развитой системой Н-связей и высокой степенью кристалличности. Наночастицы легко выделяются из хранившейся системы распылением на стеклянную обезжиренную поверхность с использованием механического инжектора.

Выбор *L*-аспарагиновой кислоты был обусловлен ее высокой биологической значимостью: она относится к классу протеиногенных аминокислот, выполняет важную роль в процессах переаминирования, биосинтеза мочевины и пиримидиновых оснований, в цикле лимонной кислоты (Кребса), широко используется в медико-биологических и фармакологических приложениях (Ayon, 2020). Ранее нами уже были показаны антибактериальная активность свежеприготовленных водных растворов аспарагината хитозана и их высокая биосовместимость с тканями человека (Луговицкая и соавт., 2017, 2020).

Целью настоящей работы явилось исследование биоцидной активности наночастиц аспарагината хитозана, образующихся в системе хитозан–AspA–вода на начальном этапе фазового разделения, в отношении клеток эу- и прокариот.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Использовали порошкообразный хитозан со средневязкостной молекулярной массой 200 кДа, степенью деацетилирования 82 мол. %, влажностью $W = 8 \pm 1$ мас. % (ООО “Биопрогресс”, Россия); порошок AspA фармакопейной степени чистоты, полученной биокаталитическим синтезом с использованием штамма *E. coli* ВКПМ 7188 (АО “Биоамид”, Россия); бидистиллированную воду; этиловый спирт (95.6%), ацетон. CTS и AspA использовали без дополнительной очистки, остальные реагенты были квалификации ч. д. а.

Исходную систему хитозан–AspA–вода получали растворением расчетных навесок хитозана (с учетом W образца) и AspA в бидистиллированной воде при 25°C и перемешивании на магнитной мешалке с частотой оборотов вращения 400–500 об./мин до визуального растворения порошков в течение 1–2 ч. Навески хитозана предварительно стерилизовали в ламинарном боксе (“NUAIRE Biological Safeti Cabinets”, Франция) в течение 15 мин. Полученный гомогенный водный раствор аспарагината хитозана фильтровали через фильтр Millipore с диаметром пор ≤ 0.45 мкм и оставляли в комнатной атмосфере (760 мм рт. ст., $22 \pm 2^\circ\text{C}$) на 24 ч для формирования наночастиц.

Для подтверждения образования наночастиц 0.5 мкл суточной системы хитозан–AspA–вода распыляли на стеклянную обезжиренную (этиловым спиртом и ацетоном) поверхность с использованием механического инжектора в форме шприца и высушивали в течение 1–2 ч при $22 \pm 2^\circ\text{C}$ и атмосферном давлении до воздушно-сухого состояния. На полученные образцы напыляли слой золота толщиной 5 нм на установке K450X Carbon Coater (“Quorum Technologies, Ltd.”, Германия) и анализировали на растровом электронном микроскопе SEM MIRA//LMU (“Tescan”, Чехия) при напряжении 30 кВ и проводящем токе 400 пкА.

Антибактериальную активность исследовали на модели суточных культур референтных штаммов *Staphylococcus aureus* 209 P и *Escherichia coli* 113-13, культивируемых в мясо-пептонном бульоне (МПБ) без добавки (контроль) и с добавкой AspA или наночастиц аспарагината хитозана. Использовали водный раствор AspA концентрации 0.4×10^{-3} моль/дл и систему хитозан–AspA–вода с концентрацией хитозана $C = 0.5 \times 10^{-3}$ осново-моль/дл и той же концентрации AspA, т.е. с мольным соотношением кислота/хитозан ($[\text{AspA}]/[\sim\text{NH}_2]$) 0.8 моль/осново-моль, взятые в разведении 1 : 10. Здесь и далее данное соотношение $[\text{AspA}]/[\sim\text{NH}_2]$ выбрано с учетом степени протонирования полимера при формировании солевой формы аспарагината хитозана (Луговицкая и соавт., 2020) с целью минимизирования присутствия в системе несвязанной AspA.

Суточные агаровые тест-культуры *S. aureus* 209 P и *E. coli* 113-13 вносили в литровые колбы с МПБ для получения суспензии с оптической плотностью $D = 0.2$, инкубировали при 37°C в условиях интенсивной аэрации до достижения $D = 0.5$. Оптическую плотность измеряли при $\lambda = 600$ нм на спектрофотометре UV-Vis Specord-M40 (“Carl Zeiss”, Германия). Далее в пробирку вносили 4.5 мл бактериальной суспензии, добавляли 0.5 мл физиологического раствора (контроль), либо такой же объем водного раствора AspA или взвеси наночастиц аспарагината хитозана и культивировали в течение 18 ч при 37°C. Затем клетки осаждали центрифугированием, двукратно промывали фосфатно-солевым буфером и окрашивали смесью флуоресцентных красителей SYTO 9 и йодида пропидия (набор реактивов Live/Dead BacLight Bacterial Viability Kit, США). Зеленый краситель SYTO 9 визуализировал живые бактерии, красный краситель йодид пропидия – бактерии с поврежденной мембраной. Приготовленные препараты микроскопировали на флуоресцентном микроскопе Nikon Eclipse LV100D (“Nikon”, Япония). Антибактериальную активность $A_{G/R}$ (отн. ед.) выражали по соотношению:

$$A_{G/R} = F_G/F_R,$$

где F_G и F_R – количество (%) жизнеспособных и погибших бактерий соответственно. Для получения статистически значимого результата эксперимент повторяли трижды.

Цитотоксическое действие исследовали *in vitro* на модели клеточных линий человеческих дермальных фибробластов и нормальных кератиноцитов, полученных из биоптатов кожи здоровых взрослых доноров после косметической операции, а также эпителиоцитов эмбриональной почки макаки резус MA-104 (ИНЦ РАН, г. Санкт-Петербург, Россия). Методика получения человеческих фибробластов и нормальных кератиноцитов взята из работы (Howling et al., 2001). Использовали систему хитозан–AspA–вода с $C = 0.3 \times 10^{-3}$ осново-моль/дл, $[\text{AspA}]/[\sim\text{NH}_2] = 0.8$ моль/осново-моль, разведение 1 : 6.

Для культивирования фибробластов и MA-104 применяли ростовую среду DMEM (“Sigma”), кератиноцитов – смесь ростовых сред DMEM : F12 = 3 : 1 (“Sigma”), дополненные 10% FBS (“Hyclone”) и 1% антибиотиков (“Sigma”). В стерильные чашки Петри с питательной средой вносили суспензию суточной культуры фибробластов из расчета 200 тыс. кл./мл, либо кератиноцитов – 250 тыс. кл./мл или MA-104 – 110 тыс. кл./мл и взвесью наночастиц аспарагината хитозана. Контролем служила питательная среда с клеточной культурой без наночастиц. Клетки культивировали в течение 3–4 сут в CO₂-инкубаторе “MCO-18AIC Sanyo” (Япония) при постоянных температуре

Таблица 1. Соотношение жизнеспособных и нежизнеспособных клеток *S. aureus* 209 P и *E. coli* 113-13 через 18 ч культивирования в МПБ без добавления (контроль) и с добавлением AspA или наночастиц аспарагината хитозана

Образец	<i>Staphylococcus aureus</i> 209 P			<i>Escherichia coli</i> 113-13		
	количество клеток, %		$A_{G/R} \times 10^2$, отн. ед.	количество клеток, %		$A_{G/R} \times 10^2$, отн. ед.,
	живые	погибшие		живые	погибшие	
Контроль	100	0	—	100	0	—
AspA	6.0	94.0	6.4	12.6	87.4	14.4
Наночастицы	1.4	98.6	1.4	7.6	92.4	8.3

(37°C), влажности (90%) и содержании CO₂ (5%). Питательную среду в чашках не меняли до окончания срока наблюдения. Для объективизации исследования проводили по три опытных посева для каждой клеточной культуры.

О цитотоксическом действии наночастиц аспарагината хитозана судили по времени адгезии и распластывания клеток, а также скорости их пролиферации. Наблюдение за адгезией, распластыванием и пролиферацией клеток осуществляли на инвертированном микроскопе “Биолам П-3” (“ЛОМО”, Россия) с цифровой камерой. После инкубации неприкрепившиеся клетки удаляли, а адгезированную культуру фиксировали 70% раствором этилового спирта в течение 10 мин (20°C), окрашивали 0.04% раствором трипанового синего и подсчитывали количество клеток на автоматическом счетчике клеток “Countess Thermo Fisher Scientific” (США). Для количественной оценки пролиферативных свойств использовали индекс пролиферации (PI):

$$PI = N_T / N_K,$$

где N_T и N_K – количество клеток в питательной среде с добавкой наночастиц аспарагината хитозана и в контроле.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Наше предыдущее исследование показало, что в системе хитозан–AspA–вода на начальном этапе ее фазового разделения образуются наночастицы аспарагината хитозана (Lugovitskaya et al., 2022). Формирование наночастиц происходит в результате ионной ассоциации хитозанового поликатиона и аниона кислоты с формированием ионных пар и мультиплетных структур. В настоящем исследовании использовали систему хитозан–AspA–вода, выдержанную в условиях комнатной атмосферы в течение 24 ч, то есть в которой формируются наночастицы сферической формы (рис. 1а). Перед проведением экспериментов систему тестировали на наличие наночастиц методом электронной микроскопии; размер частиц составил 40–90 нм.

Биоцидное действие наночастиц аспарагината хитозана оценивали в условиях *in vitro* как в отношении клеток прокариот (референтные штаммы бактерий *S. aureus* 209 P и *E. coli* 113-13), так и в отношении культур эукариотических клеток животного происхождения (эпителиоциты МА-104, человеческие кератиноциты и фибробласты).

Результаты исследования антибактериальной активности наночастиц аспарагината хитозана представлены на рис. 2 и в табл. 1. После обработки культур бактерий флуоресцентными красителями жизнеспособные клетки окрашивались в зеленый цвет, а клетки с поврежденными мембранами – в красный. Экспериментально установлено, что добавление в МПБ наночастиц аспарагината хитозана приводит к существенному угнетению роста обеих бактериальных тестовых культур. Причем культура грамположительной *S. aureus* 209 P была в ~6 раз более чувствительна к воздействию наночастиц аспарагината хитозана, чем культура грамотрицательной *E. coli* 113-13. Водный раствор AspA оказывал меньшее биоцидное действие на обе культуры, по сравнению с наночастицами.

Как оказалось, внесение наночастиц аспарагината хитозана в питательную среду для культивирования эукариотических клеток в условиях *in vitro* не только не оказывает цитотоксическое действие на эпителиоциты МА-104 и человеческие кератиноциты и фибробласты, но и положительно влияет на скорость адгезии и распластывания клеток, а также ускоряет их пролиферацию (рис. 3, табл. 2). Так, через 1 ч культивирования в среде с добавкой наблюдается значимо большее количество адгезированных и распластных клеток, чем в стандартной питательной среде (табл. 2). В течение последующих двух суток формирование монослоя клеток в присутствии наночастиц аспарагиновокислого хитозана шло также более быстрыми темпами, а индекс пролиферации значимо выше, чем в контроле. Форма и размеры клеток зрелого монослоя соответствуют норме (рис. 3), что свидетельствует об отсутствии цитотоксического действия тестируемых наночастиц и их высокой биосовместимости.

Принято считать, что биоцидная активность хитозана в отношении клеток прокариот опреде-

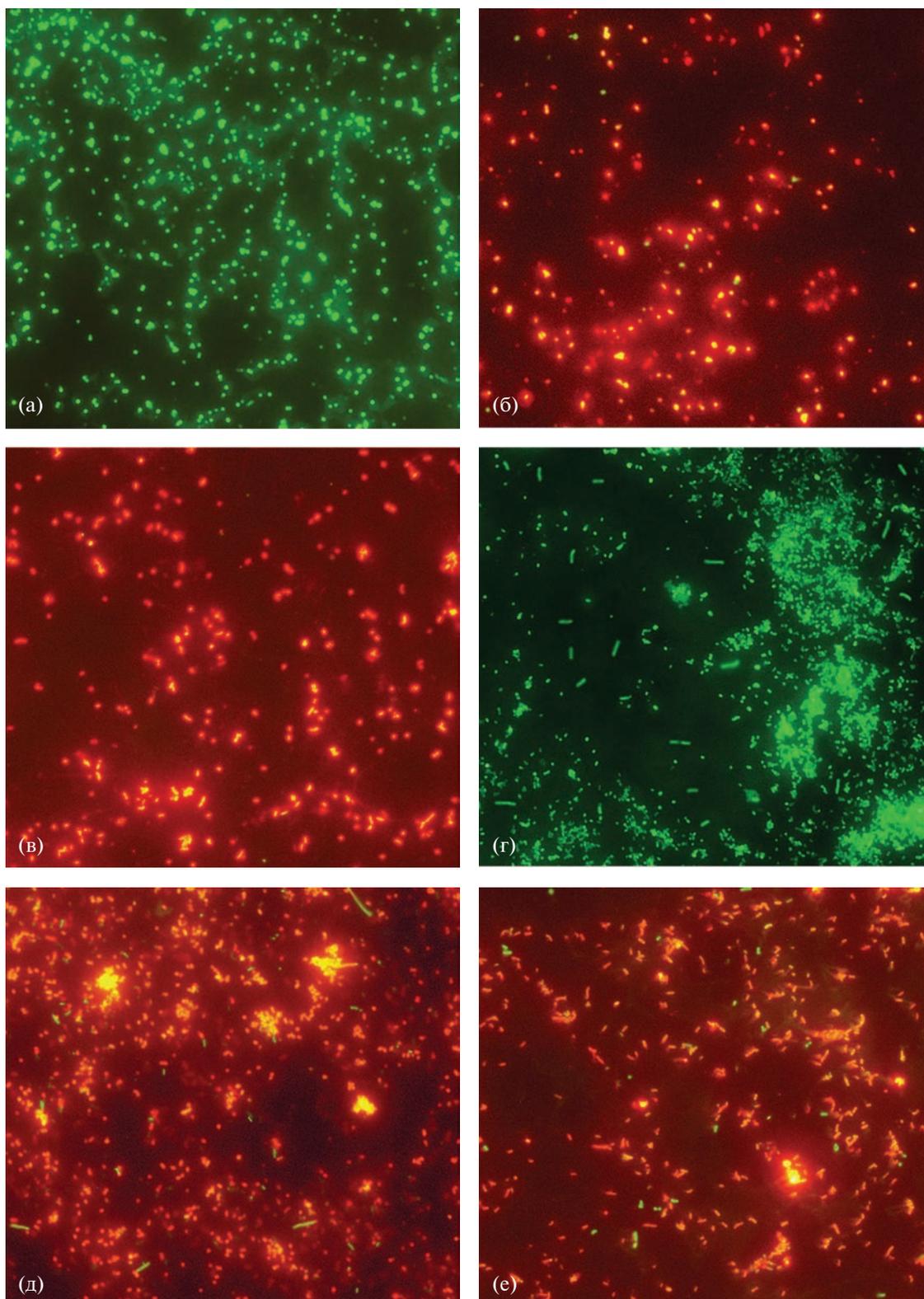


Рис. 2. Флуоресцентная микроскопия культур *S. aureus* 209 P (а–в) и *E. coli* 113-13 (г–е), выросших в МПБ без добавления (а, г) и с добавлением AspA (б, д) наночастиц аспарагината хитозана (в, е). Зеленая флуоресценция – жизнеспособные клетки; красная флуоресценция – погибшие клетки. Увеличение $\times 400$.

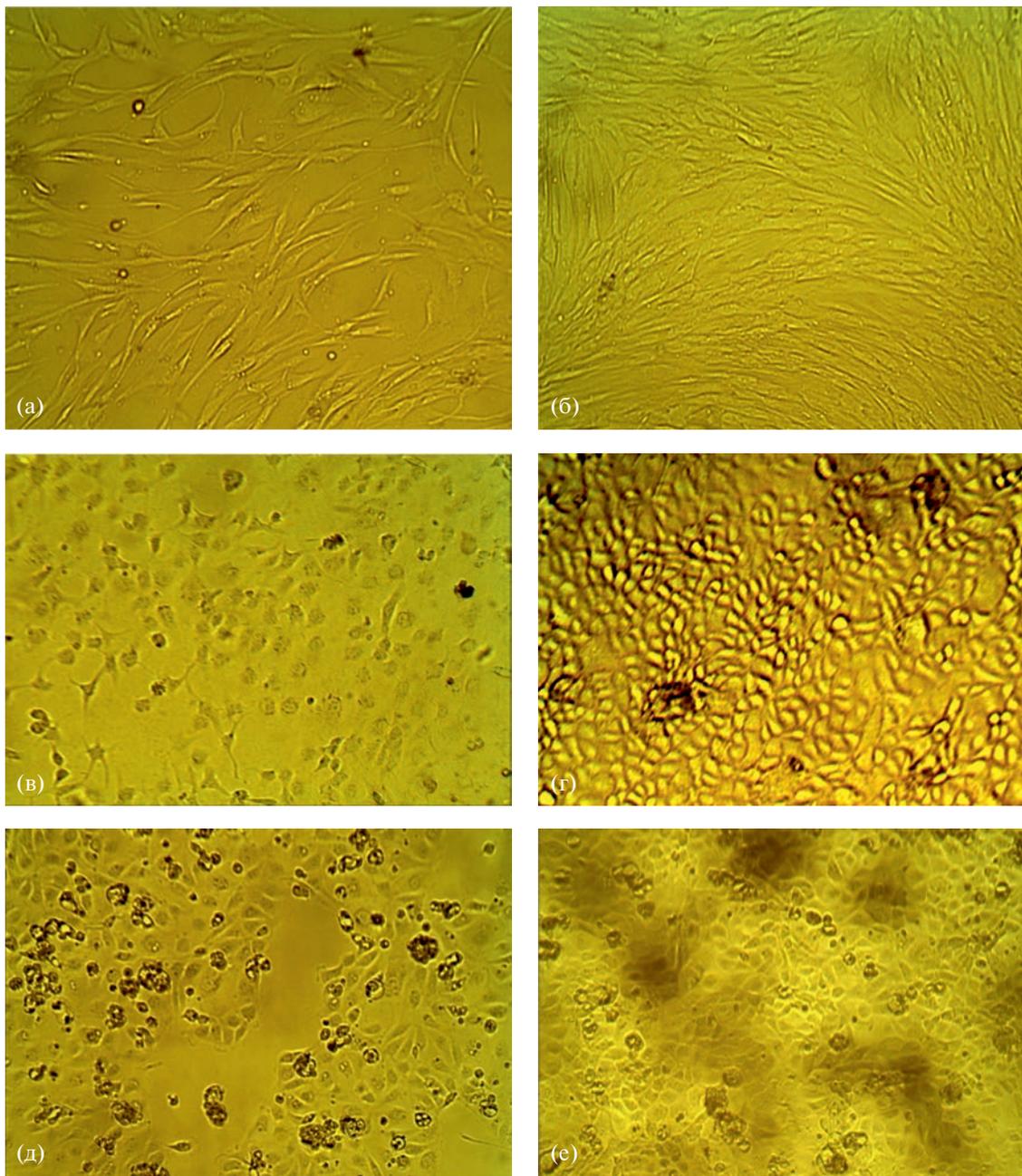


Рис. 3. Формирование монослоя дермальных фибробластов (а, б), кератиноцитов (в, г) и эпителиоцитов линии МА-104 (д, е) через 48 ч культивирования в питательной среде без добавления (а, в, д) и с добавлением наночастиц аспарагината хитозана.

ляется наличием в составе макроцепи протонированных аминогрупп, обуславливающих связывание биополимера с анионными компонентами поверхностных структур клеток микроорганизмов за счет электростатического взаимодействия (Raafat et al., 2008; Kong et al., 2010). При этом, как полагают, образуются трансмембранные каналы в виде цилиндрических бочек или тороидальных пор. Характер и масштабы повреждения бактериальной стенки зависят от количества адсорбиро-

ванного на ее поверхности хитозана, что, в свою очередь, определяется плотностью отрицательного заряда клеточной мембраны (Másson et al., 2008). В случае грамотрицательных бактерий главной мишенью для положительно заряженных молекул солевой формы хитозана является отрицательно заряженный липополисахарид, входящий в состав наружной части клеточной мембраны и обеспечивающий структурную целостность бактериальной клетки. У грамположительных бактерий ос-

Таблица 2. Пролиферативные характеристики эпидермальных и эпителиальных клеток при культивировании в питательной среде без добавления (контроль) и с добавлением наночастиц аспарагината хитозана

Образец	Культура клеток	Доля адгезированных клеток, %	Доля распластанных клеток, %	Время формирования монослоя, ч	PI
		время культивирования 1 ч			48 ч
Контроль	Фибробласты	55.5	77.2	>60	1.0
Наночастицы		92.4	96.5	<48	2.7
Контроль	Кератиноциты	20.8	61.6	>72	1.0
Наночастицы		51.4	91.5	<56	3.1
Контроль	МА-104	84.0	56.4	>48	1.0
Наночастицы		99.3	97.7	<48	4.5

новой мишенью являются тейхоевые кислоты (Набережных и соавт., 2008). И липополисахариды, и тейхоевые кислоты способны связывать ионы металлов, играя важнейшую роль в сохранении нормального баланса бивалентных катионов в районе цитоплазматической мембраны.

Ряд авторов утверждают, что хитозан оказывает более сильное биоцидное действие на грамположительные бактерии (No et al., 2002). В нашем исследовании наблюдалась аналогичная тенденция: грамположительный штамм *S. aureus* 209 P проявил более высокую чувствительность к действию наночастиц аспарагината хитозана, чем грамотрицательный штамм *E. coli* 113-13. При этом процент нежизнеспособных клеток в суспензиях обоих штаммов в присутствии наночастиц был существенно выше, чем у этих же культур в присутствии AspA. По всей видимости, немаловажную роль в этом явлении играет увеличение числа доступных протонированных аминокрупп хитозана за счет возрастания удельной площади поверхности наночастиц.

Проявляя биоцидное действие в отношении клеток прокариотов, наночастицы аспарагината хитозана не оказывали какого-либо деструктивного влияния на клетки эукариотов. Отдельные авторы ранее указывали на тот факт, что двуслойные цитоплазматические мембраны клеток млекопитающих обогащены цвиттерионными фосфолипидами (фосфатидилэтаноламином, фосфатидилхолином, сфингомиелином) и стеринами (холестерином), которые обеспечивают клетке нейтральный суммарный поверхностный заряд, что и препятствует электростатическому взаимодействию с хитозаном (Rhoades, Roller, 2000). В наших экспериментах было показано, что в присутствии наночастиц аспарагината хитозана культуры эпидермальных и эпителиальных клеток демонстрировали высокую пролиферативную активность и способность в более короткие сроки, чем в контроле, формировать зрелый монослой. Видимо, благодаря близости хитозана как по структуре,

так и по составу к мукополисахаридам внеклеточного вещества и клеточных оболочек млекопитающих (гиалуроновой кислоте, хондроитину и др.), а также соизмеримым с хитоолигомерами размером наночастиц, последние могут участвовать в синтезе гликозаминогликанов и улучшать ростовые характеристики культур клеток.

Проведенное биотестирование клеточных культур эу- и прокариот позволяет рассматривать наноструктурированную систему хитозан–AspA–вода как прототип высокоэффективного антибактериального препарата нового поколения, а также в качестве перспективной модифицирующей добавки для улучшения ростовых качеств питательной среды и ускорения роста популяции клеток в культуре. На наш взгляд, использование наночастиц аспарагината хитозана открывает широкие возможности при создании принципиально новых видов лекарственных форм, вакцин и может быть востребовано в самых разнообразных medico-биологических и фармакологических приложениях, в том числе, в области тераностики.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-23-00320, <https://rscf.ru/project/22-23-00320/>.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Гегель Н.О., Зудина И.В., Малинкина О.Н., Шиповская А.Б.* Влияние изомерной формы аскорбиновой кислоты на антибактериальную активность ее солей с хитозаном // *Микробиология*. 2018. Т. 87. С. 618–623.
- Gegel N.O., Zudina I.V., Malinkina O.N., Shipovskaya A.B.* Effect of ascorbic acid isomeric forms on antibacterial activity of its chitosan salts // *Microbiology (Moscow)*. 2018. V. 87. P. 732–737.
- Ильина А.В., Варламов В.П., Ермаков Ю.А.* Хитозан – полимер для формирования наночастиц // *ДАН*. 2008. Т. 421. № 2. С. 199–201.
- Ирина А.В., Varlamov V.P., Skryabin K.G., Ermakov Yu.A., Orlov V.N.* Chitosan is a natural polymer for constructing nanoparticles // *Doklady Chem*. 2008. V. 421. P. 165–167.
- Куликов С.Н., Шакирова Д.Р., Тихонов В.Е., Безродных Е.А., Ильина А.В., Левов А.Н., Варламов В.П.* Антимикотическая активность хитозана и его производных в отношении *Candida albicans* // *Проблемы медицинской микробиологии*. 2012. Т. 14. № 4. С. 50–54.
- Луговицкая Т.Н., Шиповская А.Б.* Физико-химические свойства водных растворов L-аспарагиновой кислоты с добавкой хитозана // *Журн. общей химии*. 2017. Т. 87. С. 650–656.
- Lugovitskaya T.N., Shipovskaya A.B.* Physicochemical properties of aqueous solutions of L-aspartic acid containing chitosan // *Russ. J. Gen. Chem*. 2017. V. 87. P. 782–787.
- Луговицкая Т.Н., Зудина И.В., Шиповская А.Б.* Получение и свойства аспарагиновокислых растворов хитозана // *Журн. прикл. химии*. 2020. Т. 93. С. 90–99.
- Lugovitskaya T.N., Zudina I.V., Shipovskaya A.B.* Obtaining and properties of L-aspartic acid solutions of chitosan // *Russ. J. Appl. Chem*. 2020. V. 93. P. 80–88.
- Набережных Г.А., Горбач В.И., Лихацкая Г.Н., Давыдова В.Н., Соловьева Т.Ф.* Взаимодействие хитозанов и N-ацилированных производных хитозанов с липополисахаридами грамотрицательных бактерий // *Биохимия*. 2008. Т. 73. С. 530–541.
- Naberezhnykh G.A., Gorbach V.I., Likhatskaya G.N., Davydova V.N., Solov'eva T.F.* Interaction of chitosans and their N-acylated derivatives with lipopolysaccharide of gram-negative bacteria // *Biochemistry (Moscow)*. 2008. V. 73. P. 432–441.
- Полюдова Т.В., Шагдарова Б.Ц., Коробова В.П., Варламов В.П.* Бактериальная адгезия и образование биопленок в присутствии хитозана и его производных // *Микробиология*. 2019. Т. 88. С. 129–136.
- Polyudova T.V., Korobov V.P., Shagdarova B.T., Varlamov V.P.* Bacterial adhesion and biofilm formation in the presence of chitosan and its derivatives // *Microbiology (Moscow)*. 2019. V. 88. P. 125–131.
- Салтыкова Е.С., Гайфуллина Л.Р., Каскинова М.Д., Гатауллин А.Р., Матниязов Р.Т., Поскряков А.В., Николенко А.Г.* Действие хитозана на развитие микроспоридий *Nosema apis* в медоносных пчелах // *Микробиология*. 2018. Т. 87. С. 624–630.
- Saltykova E.S., Gaifullina L.R., Kaskinova M.D., Gataullin A.R., Matniyazov R.T., Poskryakov A.V., Nikolenko A.G.* Effect of chitosan on development of *Nosema apis* microsporidia in honey bees // *Microbiology (Moscow)*. 2018. V. 87. P. 738–743.
- Шиповская А.Б., Малинкина О.Н., Гегель Н.О., Зудина И.В., Луговицкая Т.Н.* Структура и свойства солевых комплексов хитозана с диастереомерами аскорбиновой кислоты // *Изв. АН. Сер. химич.* 2021. № 9. С. 1765–1774.
- Shipovskaya A.B., Malinkina O.N., Gegel N.O., Zudina I.V., Lugovitskaya T.N.* Structure and properties of chitosan salt complexes with ascorbic acid diastereomers // *Russ. Chem. Bull.* 2021. V. 70. P. 1765–1774.
- Ayon N.J.* Features, roles and chiral analyses of proteino-genic amino acids // *AIMS Mol. Sci.* 2020. V. 7. P. 229–268.
- Babicheva T.S., Gegel N.O., Shipovskaya A.B.* Visualization of morphological features of chitosan microtubes during biodegradation // *J. Phys.: Conf. Ser. – IOP Publishing*, 2017. Iss. 4. P. 042026.
- Chandrasekaran M., Kim K.D., Chun S.C.* Antibacterial activity of chitosan nanoparticles: a review // *Processes*. 2020. V. 8. P. 1173.
- Divya K., Jisha M.S.* Chitosan nanoparticles preparation and applications // *Environ. Chem. Lett.* 2018. V. 16. P. 101–112.
- Gegel N.O., Zhuravleva Yu. Yu., Shipovskaya A.B., Malinkina O.N., Zudina I.V.* Influence of chitosan ascorbate chirality on the gelation kinetics and properties of silicon-chitosan-containing glycerohydrogels // *Polymers*. 2018. V. 10. P. 259.
- Howling G.I., Dettmar P.W., Goddard P.A., Hampson F.C., Dornish M., Wood E.J.* The effect of chitin and chitosan on the proliferation of human skin fibroblasts and keratinocytes *in vitro* // *Biomaterials*. 2001. V. 22. P. 2959–2966.
- Jhaveri J., Raichura Z., Khan T., Momin M., Omri A.* Chitosan nanoparticles-insight into properties, functionalization and applications in drug delivery and theranostics // *Molecules*. 2021. V. 26. P. 272.
- Kong M., Chen X.G., Xing K., Park H.J.* Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review // *Int. J. Food Microbiol.* 2010. V. 144. P. 51–63.
- Kravanja G., Primožič M., Knez Ž., Leitgeb M.* Chitosan-based (nano) materials for novel biomedical applications // *Molecules*. 2019. V. 24. P. 1960.
- Lau H.K., Kiick K.L.* Opportunities for multicomponent hybrid hydrogels in biomedical applications // *Biomacromolecules*. 2015. V. 16. P. 28–42.
- Luangtana-Anan M., Nunthanid J., Limmatvapirat S.* Potential of different salt forming agents on the formation of chitosan nanoparticles as carriers for protein drug delivery systems // *J. Pharm. Investigation*. 2017. V. 49. P. 37–44.
- Lugovitskaya T.N., Shipovskaya A.B., Shmakov S.L., Shipenok X.M.* Formation, structure, properties of chitosan aspartate and metastable state of its solutions for obtaining nanoparticles // *Carbohydr. Polym.* 2022. V. 277. P. 118773.
- Marciello M., Rossi S., Caramella C., Remunan-Lopez C.* Freeze-dried cylinders carrying chitosan nanoparticles for vaginal peptide delivery // *Carbohydr. Polym.* 2017. V. 170. P. 43–51.
- Másson M., Holappa J., Hjálmarsdóttir M., Rúnarsson Ö.V., Nevalainen T., Järvinen T.* Antimicrobial activity of piperazine derivatives of chitosan // *Carbohydr. Polym.* 2008. V. 74. P. 566–571.
- Mohammed M.A., Syeda J., Wasan K.M., Wasan E.K.* An overview of chitosan nanoparticles and its application in

- non-parenteral drug delivery // *Pharmaceutics*. 2017. V. 9. Is. 4. P. 53.
- Mubarak Ali D., Lewis Oscar F., Gopinath V., Alharbi N.S., Alharbi S.A., Thajuddin N. An inhibitory action of chitosan nanoparticles against pathogenic bacteria and fungi and their potential applications as biocompatible antioxidants // *Microb. Pathog.* 2018. V. 114. P. 323–327.
- Muzzarelli R.A.A. Chitosan composites with inorganics, morphogenetic proteins and stem cells, for bone regeneration. Review article // *Carbohydr. Polym.* 2011. V. 83. P. 1433–1445.
- No H.K., Park N.Y., Lee S.H., Meyers S.P. Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights // *Int. J. Food Microbiol.* 2002. V. 74. P. 65–72.
- Raafat D., Von Bargen K., Haas A., Sahl H.G. Insight into the mode of action of chitosan as an antibacterial compound // *Appl. Environ. Microbiol.* 2008. V. 74. P. 3764–3773.
- Rhoades J., Roller S. Antimicrobial actions of degraded and native chitosan against spoilage organisms in laboratory media and foods // *Appl. Environ. Microbiol.* 2000. V. 66. P. 80–86.
- Rinaudo M. Chitin and chitosan: properties and applications // *Prog. Polym. Sci.* 2006. V. 31. P. 603–632.
- Rossi S., Vigani B., Puccio A., Bonferoni M.C., Sandri G., Ferrari F. Chitosan ascorbate nanoparticles for the vaginal delivery of antibiotic drugs in atrophic vaginitis // *Marine Drugs*. 2017. V. 15. P. 319.
- Rozman N.A.S., Tong W.Y., Leong C.R., Tan W.N., Hasanolbasori M.A., Abdullah S.Z. Potential antimicrobial applications of chitosan nanoparticles (ChNP) // *J. Microbiol. Biotechnol.* 2019. V. 29. P. 1009–1013.
- Stie M.B., Gätke J.R., Wan F., Chronakis I.S., Jacobsen J., Nielsen H.M. Swelling of mucoadhesive electrospun chitosan/polyethylene oxide nanofibers facilitates adhesion to the sublingual mucosa // *Carbohydr. Polym.* 2020. V. 242. P. 116428.
- Supraja N., Thiruchenduran S., Prasad T. Synthesis and characterization of chitosan nanoparticles and evaluation of antimicrobial activity antioxidant activity // *Advancement Bioequiv. Bioavail.* 2018. V. 2. P. 88–93.
- Yu J., Wang D., Geetha N., Khawar K.M., Jogaiah S., Mujtaba M. Current trends and challenges in the synthesis and applications of chitosan-based nanocomposites for plants: a review // *Carbohydr. Polym.* 2021. V. 261. P. 117904.

Biocidal Activity of Chitosan Asparaginate Nanoparticles

A. B. Shipovskaya¹, T. N. Lugovitskaya^{2, *}, and I. V. Zudina¹

¹Saratov State University, Saratov, 410012 Russia

²Ural Federal University, Ekaterinburg, 620002 Russia

*e-mail: tlugovitskaja@mail.ru

Received July 9, 2022; revised August 14, 2022; accepted August 14, 2022

Abstract—The biological activity of chitosan asparaginate particles formed in the chitosan–L-aspartic acid–water system at the initial stage of phase separation was investigated. Cultivation of *Staphylococcus aureus* 209 P and *Escherichia coli* 113–13 in the medium supplemented with nanoparticles resulted in massive death of bacterial cultures. The biocidal activity against gram-positive bacteria was most pronounced. Biological tests revealed high biocompatibility of chitosan nanoparticles and their ability to accelerate the proliferative activity of the cultures of epidermal and epithelial cells. Our results indicate that chitosan asparaginate nanoparticles are promising for medico-biological and pharmaceutical applications.

Keywords: chitosan asparaginate, nanoparticles, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, fibroblasts, keratinocytes, epithelial cells

ВЛИЯНИЕ АТРАНОВ НА РОСТ *RHODOCOCCLUS QINGSHENGII* VKM Ас-2784D В ПРИСУТСТВИИ РАЗЛИЧНЫХ ИСТОЧНИКОВ УГЛЕРОДА И НА ЕГО СПОСОБНОСТЬ К РАЗЛОЖЕНИЮ НАФТАЛИНА

© 2023 г. Л. А. Беловежец^а, *, Ю. А. Маркова^б, А. А. Левчук^а, Е. Н. Оборина^а, С. Н. Адамович^а

^аИркутский институт химии им. А.Е. Фаворского СО РАН, Иркутск, 664033 Россия

^бСибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск, 664033 Россия

*e-mail: lyu-sya@yandex.ru

Поступила в редакцию 12.05.2022 г.

После доработки 27.05.2022 г.

Принята к публикации 06.06.2022 г.

Rhodococcus qingshengii VKM Ас-2784D, выделенный из ризосферы пырея, является перспективным нефтеструктуром. Для увеличения его биотехнологического потенциала было изучено влияние атранов (потенциальных стимуляторов роста) на рост и деструкцию нафталина данным микроорганизмом. Показано, что сила и характер влияния исследуемых атранов на все изучаемые параметры функционирования *R. qingshengii* VKM Ас-2784D зависят от природы источника углерода: внесение атранов в богатую питательную среду БТН практически не влияло на скорость роста бактерий; в минеральной среде 8E и в среде 8E с глюкозой происходила кратковременная активация роста, характеризующаяся сокращением лаг-фазы; в присутствии нафталина данные соединения действовали на прирост популяции *R. qingshengii* VKM Ас-2784D преимущественно негативно. Исследованные атраны оказывали неблагоприятное воздействие на скорость разложения нафталина *R. qingshengii* VKM Ас-2784D, а также снижали гидрофобность клеточной стенки и синтез внеклеточных биосурфактантов. Предполагается, что исследованные соединения будут негативно влиять на скорость разложения нефти данным микроорганизмом.

Ключевые слова: *Rhodococcus qingshengii* VKM Ас-2784D, атраны, разложение нафталина, гидрофобность клеточной стенки

DOI: 10.31857/S0026365622600390, EDN: NNLXFM

Род *Rhodococcus* объединяет преимущественно непатогенные микроорганизмы (Ившина и соавт., 2021), широко распространенные во внешней среде. В большинстве своем это почвенные микроорганизмы, но отдельные представители высеваются из шламовых вод и очистных сооружений промышленных предприятий (Krivoruchko et al., 2019; Ившина и соавт., 2021). Это связано со способностью родококков метаболизировать большой спектр соединений, включая поллютанты. Известно разложение родококком таких соединений, как диклофенак, бетулин, дротаверин (Шаханов и соавт., 2019; Ившина и соавт., 2021). Все это обуславливает использование родококков в биотехнологических процессах, одним из которых является нефтеструкция. Родококки входят в состав некоторых микробиологических препаратов для очистки почв от нефти и ее компонентов (Рогозина и соавт., 2010, Ерофеевская, Чернявский, 2016). Недостатком таких препаратов является относительно медленный рост и набор биомассы родококками. Поэтому для введения

этих микроорганизмов в производство перспективно применять вещества, стимулирующие их рост.

Ранее в ИРИХ СО РАН были синтезированы вещества атрановой природы, у которых обнаружен стимулирующий эффект для ряда микроорганизмов (Adamovich, 2019). Атраны, как класс соединений, был открыт в Институте химии им. А.Е. Фаворского СО РАН. Несмотря на очевидный биологический потенциал данного класса соединений, наиболее широко изучены кремний-содержащие атраны (силатраны) (Воронков, Барышок, 2005, Леменовский и соавт., 2008).

Поэтому представляло интерес исследовать влияние атранов на рост культуры *R. qingshengii* VKM Ас-2784D и способность этих бактерий к деструкции компонентов нефти на примере нафталина.

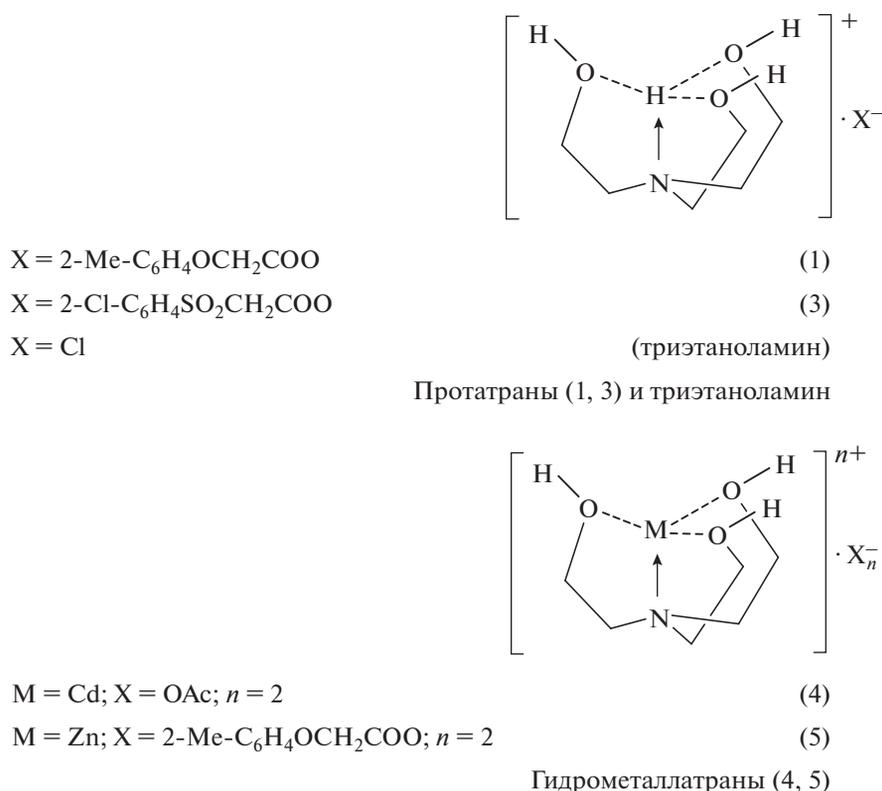


Рис. 1. Используемые в работе протатраны (1–3), гидрометаллатраны (4, 5) и триэтанолламин.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Rhodococcus qingshengii VKM Ac-2784D (Petrushin et al., 2021) (ранее *R. erythropolis* VKM Ac-2784D) выделен из ризосферы пырея ползучего (*Elytrigia repens* (L.) Nevski), произрастающего на нефтезагрязненной территории Заларинского района Иркутской области (Третьякова и соавт., 2015). Штамм входит в состав запатентованных препаратов для биоремедиации почв от нефти и защиты растений, произрастающих в неблагоприятных условиях (Беловежец и соавт., 2019).

Для исследования были выбраны протатраны (соединения 1 и 3) и гидрометаллатраны (соединения 4 и 5) (рис. 1). В качестве контроля был выбран триэтанолламин (ТЭА), являющийся исходным соединением для их синтеза. Исследуемые вещества представляют собой бесцветные нетоксичные ($\text{LD}_{50} = 1300\text{--}6000$ мг/кг) низкоплавкие порошки, устойчивые при хранении, хорошо растворимые в воде, спирте и в других органических растворителях. Их состав и строение полностью подтверждены методами элементного анализа, ИК-, ^1H , ^{13}C , ^{15}N ЯМР-спектроскопии, масс-спектрометрии и рентгеновской дифрактометрии (Adamovich, 2019). Чистота исследуемых соединений составляла до 99.87%.

Определение минимальной ингибирующей концентрации (МИК) атранов для штамма

R. qingshengii VKM Ac-2784D проводили стандартным диск-диффузионным методом (Решедько, Стецюк, 2001) на ГРМ-агаре (Оболенск, Россия).

Для изучения влияния атранов на рост штамма *R. qingshengii* VKM Ac-2784D и биodeградацию нафталина проводили культивирование в колбах и планшетах на качалке в течение 7 сут. Для инокуляции использовали смывы средой 8Е двухсуточной агаровой культуры. Для культивирования использовали максимально сбалансированную по углероду и азоту богатую питательную среду БТН-бульон (ООО “Биотехновация”, Россия) и минеральную питательную среду 8Е следующего состава (г/л): $\text{NH}_4\text{NO}_3 - 1.0$; $\text{MgCl}_2 - 0.1$; $\text{KH}_2\text{PO}_4 - 3.0$; $\text{K}_2\text{HPO}_4 - 7.0$; $\text{CaCO}_3 - 1.0$; pH 7.0. В качестве источника углерода в среду 8Е вносили 0.5% глюкозы или нафталина (“СКМ”, Россия).

Показатель гидрофобности бактериальных клеток определяли по методу, описанному в работе (Серебрякова и соавт., 2002). Суспензию клеток микроорганизма, выращенную в питательной среде 8Е с добавлением глюкозы или гексадекана (в концентрации 0.5%) в виде единственного источника углерода, встряхивали с гексаном (в соотношении 1 : 1), затем определяли ОП ($\lambda = 530$ нм) водной фазы. Контролем служила стерильная питательная среда. Количество

внеклеточных биосурфактантов определяли гра-
виметрически.

Процент разложения нафталина определяли, рассчитывая площадь пика с помощью ВЭЖХ (система Agilent 1260 Infinity II с диодно-матричным детектором) при двух длинах волн – 280 и 272 нм. Чистота нафталина (“СКМ”, Россия) подтверждена хроматографически.

Градиент элюента отражен в табл. 1. Скорость потока 1 мл/мин, колонка Kromasil 100-5-C18 4.6 × 150 мм, температура термостата колонки 30°C, объем ввода 10 мкл. В результате проведенных параллельных анализов были построены кривые и определены уравнения прямой линии тренда. Угловой коэффициент этого уравнения является характеристикой эффективности атрана.

Эффективность биodeградации нафталина выражали в процентах, рассчитывая по формуле:

$$\text{ЭБ}(\%) = (\text{Sk} - \text{Ss}) / \text{Sk} \times 100,$$

где Sk – площадь пика нафталина контрольного образца, Ss – площадь пика нафталина образца с добавкой атрана.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Несмотря на то, что некоторые атраны являются запатентованными стимуляторами роста микроорганизмов (Mirskova et al., 2016), мы сочли необходимым определить их минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) для *R. qingshengii* VKM Ас-2784D. Показано, что МИК варьировала от 6×10^{-4} до 2.5×10^{-3} г/л в зависимости от конкретного соединения. Поэтому для дальнейших исследований были взяты концентрации выше и ниже МИК (10^{-3} – 10^{-6} г/л).

На БТН-среде без внесения атранов фаза экспоненциального роста начиналась на 2 сут культивирования, а переход в стационарную фазу – после 4 сут (рис. 2). Рост на питательной среде с глюкозой характеризуется длительной (до 3 сут) лаг-фазой и небольшим приростом биомассы. Безуглеродная среда закономерно не дает возможности роста микроорганизма, давая отрицательную динамику численности до 4 сут культивирования, а прирост биомассы в данной среде минимальный. Интересно, что в присутствии нафталина в качестве единственного источника углерода практически отсутствует лаг-фаза, а фаза экспоненциального роста наступает уже на первые сутки культивирования. В то же время фаза стационарного роста быстро сменяется фазой снижения биомассы. Вероятно, это связано с быстрым исчерпанием источника углерода и переходом культуры в зону автолизиса.

Внесение атранов в полную питательную среду (БТН-бульон) практически не оказало воздействия на прирост *R. qingshengii* VKM Ас-2784D. В

Таблица 1. Градиент элюента

Время, мин	2% уксусная кислота, %	Ацетонитрил, %
0–2	45	55
2–3	45	55
3–5.5	40	60
5.5–7	40	60
7–8	45	55

1-е сут культивирования наблюдалась активация роста под действием атрана 3 в концентрации 10^{-5} и 10^{-6} г/л, атрана 4 в концентрации 10^{-5} г/л и атрана 5 в концентрации 10^{-6} г/л. На рис. 3 представлены данные по влиянию атрана 3 как наиболее активного среди исследуемых соединений (рис. 3а). Таким образом, низкие концентрации атранов 3, 4 и 5 способны привести к сокращению лаг-фазы, однако в последующие сутки культивирования значимых отличий от контроля нами не зафиксировано. Следовательно, при избытке питательных веществ, атраны практически не влияют на скорость роста *R. qingshengii* VKM Ас-2784D.

В среде 8E все атраны показали сходное действие (рис. 3б). В 1-е сут атраны, вероятно, оказывали протективное действие, снижая степень отмирания клеток, о чем говорит менее резкое изменение оптической плотности. В течение эксперимента этот эффект нивелировался, и к концу культиви-

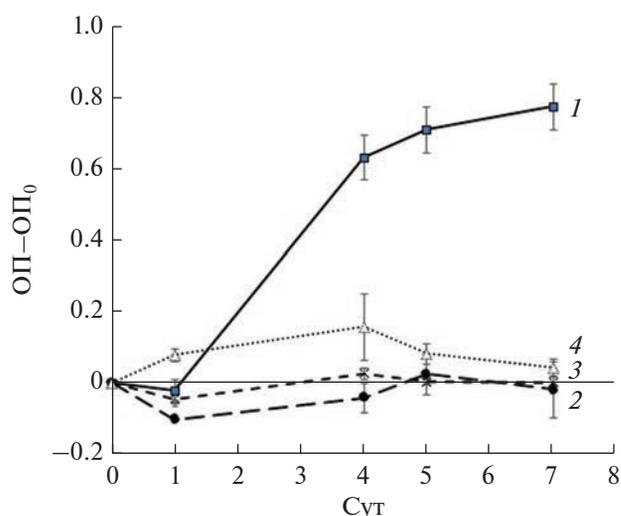


Рис. 2. Динамика роста *R. qingshengii* VKM Ас-2784D в зависимости от среды культивирования: (1) БТН; (2) 8E; (3) 8E с глюкозой; (4) 8E с нафталином.

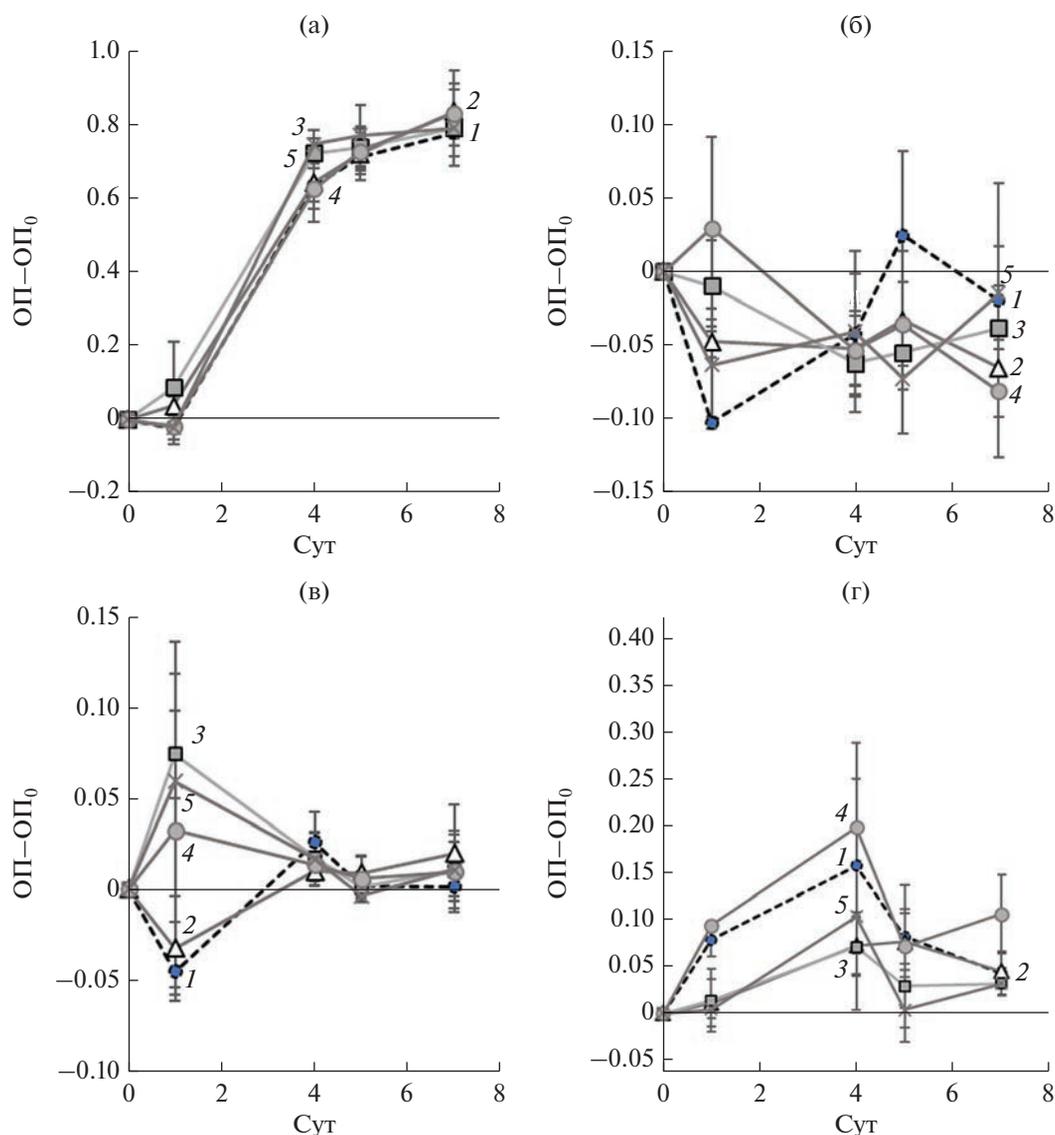


Рис. 3. Влияние атранов (на примере протатрана 3) на рост *R. qingshengii* VKM Ac-2784D в зависимости от среды культивирования: а – БТН; б – 8Е; в – 8Е с глюкозой; г – 8Е с нафталином. Обозначения: (1) контроль; (2) концентрация 10⁻⁶ г/л; (3) концентрация 10⁻⁵ г/л; (4) концентрация 10⁻⁴ г/л; (5) концентрация 10⁻³ г/л.

рования рост клеток был значительно ниже контрольных значений. Исключением был атран 1 в концентрации 10⁻⁵ г/л, оказавший резко негативное влияние на популяцию бактерий. Действие атрана 3 в отсутствии углерода заключается в сокращении лаг-фазы, однако к 4 сут влияние исчезает, а в дальнейшем идет угнетение роста культуры. Причем нет четко выраженной фазы экспоненциального роста. Действие атрана 5 в безуглеродной среде заключается в сокращении лаг-фазы (максимально эффективна концентрация 10⁻⁵ г/л) и торможении дальнейшего роста культуры. Триэтаноламин, как и атраны, в 1-е сут не активировал рост бактерий. Таким образом, в данной среде происходило сокращение лаг-фазы, однако из-за

отсутствия питательных веществ в среде данный эффект не сохранялся, и отмирание клеток в конце эксперимента превосходило данный показатель в контроле.

Влияние атранов в среде 8Е с глюкозой похоже на их влияние в голодной среде. В начале культивирования наблюдается скачок роста, связанный, вероятно, с сокращением лаг-фазы, а в конце культивирования для большинства атранов отличия от контроля были незначительны (рис. 3в). Некоторые исключения не влияют на общую тенденцию.

Совершенно другая картина наблюдалась при культивировании бактерий в среде 8Е, где в качестве единственного источника углерода исполь-

Таблица 2. Количество сурфактантов, продуцируемых *R. qingshengii* VKM Ac-2784D, и гидрофобность его клеточной стенки

Параметр	Варианты опыта						
	контроль	протатраны		гидрометаллатраны		триэтаноламин	
		1	3	4	5		
Внеклеточные сурфактанты, г/л	0.418	0.286	0.185	0.29	0.267	0.281	
Гидрофобность клеточной стенки, %	Гексадекан	55.1	33.1	57.6	9.3	9.0	28.1
	Глюкоза	45.6	4.5	0.95	20.5	20.2	13.2

Таблица 3. Эффективность биодеградации нафталина штаммом *R. qingshengii* VKM Ac-2784D через 7 сут культивирования в присутствии атранов (%)

Концентрация атранов	Протатран		Гидрометаллатраны		Триэтаноламин
	1	3	4	5	
10 ⁻³	-166	-182	-132	-113	-98
10 ⁻⁴	-172	-171	-141	-68	-188
10 ⁻⁵	-177	-98	-112	-30	-183
10 ⁻⁶	-185	6	10	9	-110

зовался нафталин (рис. 3г). В данных условиях атраны не активировали рост бактерий в лаг-фазу; напротив, мы либо не наблюдали значимых отличий от контроля, либо прирост популяции *R. qingshengii* VKM Ac-2784D существенно снижался. На 4 и 7 сут культивирования было отмечено незначительное превышение прироста в варианте, обработанном атраном 3 в концентрации 10⁻⁴ г/л. Таким образом, в присутствии нафталина характер действия атранов значительно отличается от наблюдаемого в средах 8E и 8E с глюкозой; данные соединения действуют на прирост популяции *R. qingshengii* VKM Ac-2784D преимущественно негативно.

Для того чтобы микроорганизм мог успешно осуществлять разложение неполярных компонентов нефти, необходима выработка биологических поверхностно-активных веществ (биосурфактантов). Родоккокки способны синтезировать клеточно-связанные и внеклеточные сурфактанты, что позволяет им реализовать две стратегии разложения предельных углеводородов (Куюкина, 2006). Увеличение гидрофобности клеточной стенки, обусловленное присутствием клеточно-связанных сурфактантов, способствует адгезии клеток на поверхности нефтяных капель, а синтез внеклеточных биосурфактантов – их эмульгированию.

Установлено, что атраны в концентрации 10⁻⁴ г/л существенно снижают гидрофобность клеточной стенки у бактерий, культивируемых в вышеуказанных средах (табл. 2). Это касается и синтеза внеклеточных биосурфактантов. Их количество в присутствии атранов в среднем вдвое меньше, чем в контроле. Исключение составляет атран 3 в среде с гексадеканом, в присутствии которого гидрофобность клеточной стенки была немного выше, чем в контроле.

Так как исследуемый штамм родоккокка является эффективным нефтедеструктором, было необходимо оценить влияние атранов на скорость разложения углеводородов. Наиболее простой, удобный и информативный способ оценки – это использование модельных соединений ароматической составляющей нефти, в частности, нафталина (Василенко и соавт., 2008; Тимергазина, Переходова, 2012).

Установлено, что все исследуемые атраны, включая триэтаноламин, оказывали неблагоприятное воздействие на скорость разложения нафталина. Исключение составляют атраны 3, 4 и 5 в концентрации 10⁻⁶ г/л, эффективность биодеградации (ЭБ) нафталина в присутствии которых равнялась 6, 10 и 9% соответственно. В остальных случаях разложение нафталина полностью ингибировалось (табл. 3).

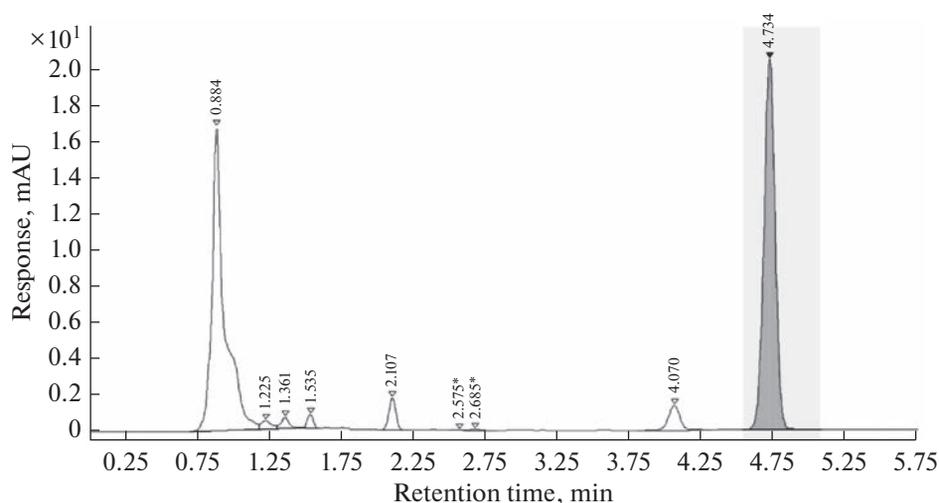


Рис. 4. Хроматограмма культурального фильтрата *R. qingshengii* VKM Ac-2784D в контрольном образце в присутствии бактерий на 3 сут.

В результате ВЭЖХ исследования обнаружено 7 пиков, предположительно относящихся к интермедиатам деструкции нафталина (рис. 4). Эти пики не соответствовали известным продуктам распада нафталина, таким как пирокатехин, салициловая, гентизиновая и протокатеховая кислоты. Для оценки действия атранов мы провели сравнение в динамике площади хроматографических пиков.

Пик с временем выхода 1.598 мин отсутствует в контрольной пробе и проявляется только в образцах с атранами 1 и 5. Дополнительные исследования показали, что данный пик относится к продукту диссоциации исходных атранов, а именно к аниону *o*-крезола.

Следующий пик с временем выхода 1.543 мин обнаружен практически на всех хроматограммах (рис. 5а). В контроле данный интермедиат накапливается на 3–5 и 7 сут культивирования, тогда как в присутствии атранов, особенно в низких их концентрациях, он образуется в существенно

меньших количествах. Исключение составляет атран 4, в присутствии которого на 7-е сут культивирования наблюдается увеличение концентрации данного интермедиата, превышающее контроль.

Еще один пик, который присутствует на всех хроматограммах, – соединение со временем выхода 2.102 мин. Динамика накопления данного вещества совпадает для стерильного образца и в присутствии бактерий (рис. 5б). Добавка атранов оказывает незначительное влияние на процесс. Следует отметить, что на 7-е сут, по данным УФ спектрального анализа, происходит изменение вещества на другое во всех концентрациях и практически у всех атранов (табл. 4, рис. 6).

Пик со временем выхода 4.068 мин также наблюдается на всех хроматограммах (рис. 5в). Во всех концентрациях содержание вещества в пробах с атранами ниже по сравнению с контролем. Только у атрана 4 в концентрации 10^{-6} г/л профиль кривой совпадает с контролем. В присутствии атранов динамика площади пиков ближе к наблюдаемой для абиотического разложения нафталина, что свидетельствует о блокировании процесса деструкции данного модельного соединения. Площадь остальных пиков незначительна, поэтому сложно отличима от шума.

Таким образом, показано, что характер влияния исследуемых атранов на все изучаемые параметры функционирования *R. qingshengii* VKM Ac-2784D зависят от природы источника углерода. Внесение атранов в богатую питательную среду БТН практически не влияло на скорость роста бактерий. В минеральной среде 8Е с добавлением глюкозы и без нее происходила кратковременная активация роста микроорганизма, характеризующаяся сокращением лаг-фазы. В присутствии

Таблица 4. Образцы атранов, в которых происходит смена вещества на 7 сут

Соединение	Концентрация, г/л			
	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
Протатран 1	+	–	+	–
Протатран 3	–	+	+	+
Гидрометаллатран 4	–	+	+	+
Гидрометаллатран 5	+	+	+	+
Триэтаноламин	+	–	–	+

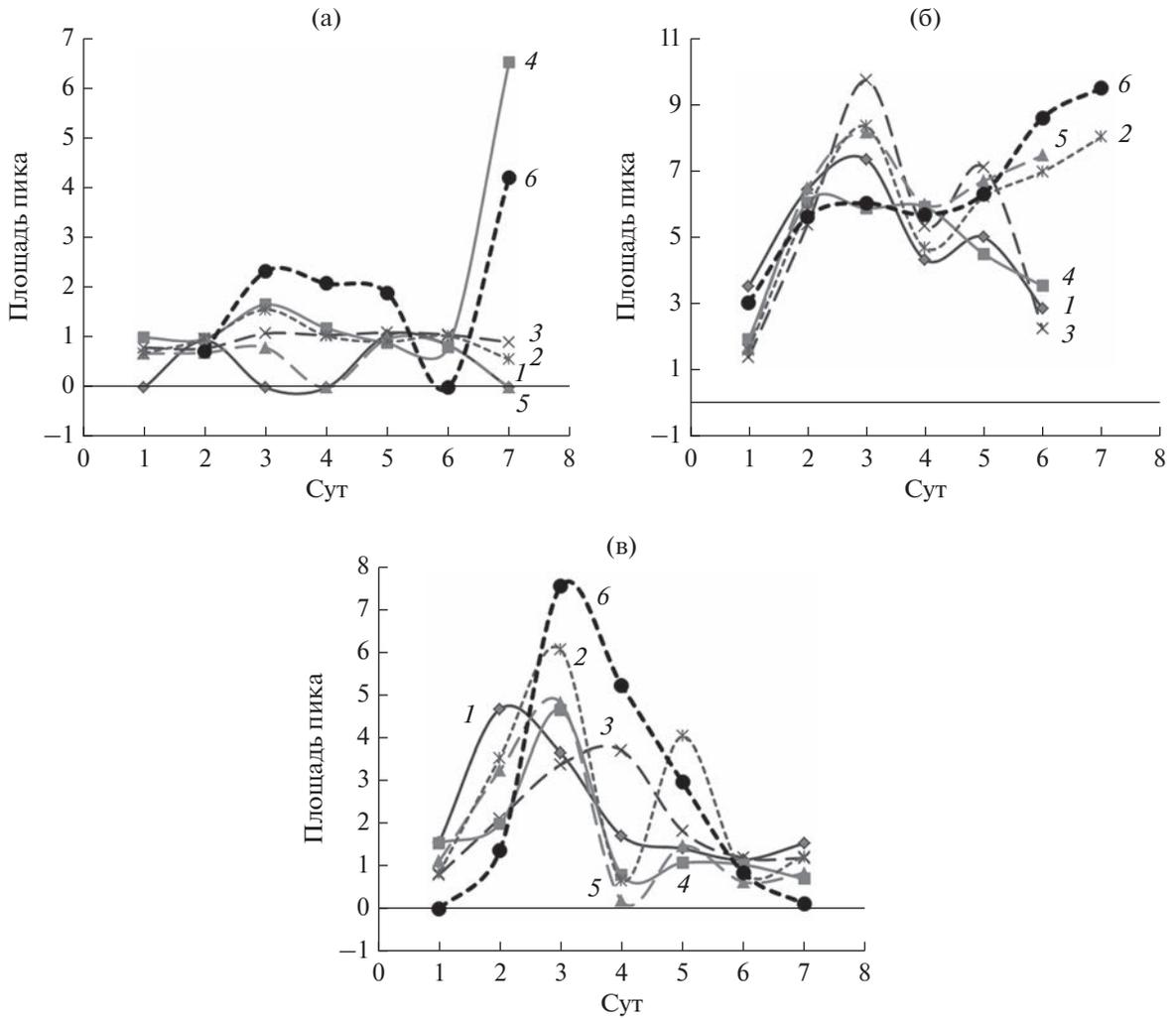


Рис. 5. Площади пиков веществ со временем выхода: а – 1.543 мин; б – 2.102 мин; в – 4.068 мин. По данным ВЭЖХ (концентрация атранов 10^{-4} г/л). Обозначения: (1) протатран 1; (2) триэтаноламин; (3) протатран 3; (4) гидрометаллатран 4; (5) гидрометаллатран 5; (6) контроль.

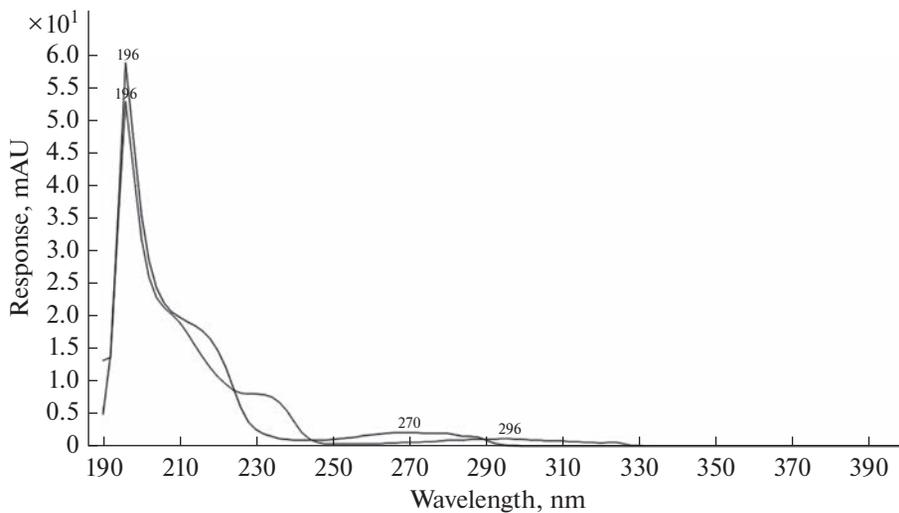


Рис. 6. УФ-спектр веществ со временем выхода 2.102 и 2.17 мин.

нафталина данные соединения действовали на прирост популяции *R. qingshengii* VKM Ac-2784D преимущественно негативно. Интересно, что большинство показателей роста и развития микроорганизма было схожим, как для исследованных атранов, так и для триэаноламина. Это позволяет сделать предположение, что основной эффект атранов связан именно с наличием триэаноламина в молекуле данных соединений.

Показано, что все исследуемые атраны оказывали неблагоприятное воздействие на скорость разложения нафталина *R. qingshengii* VKM Ac-2784D, а также снижали гидрофобность клеточной стенки и синтез внеклеточных биосурфактантов. Следовательно, исследуемые соединения будут негативно влиять на скорость разложения нефти данным микроорганизмом.

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследования выполнены с использованием материально-технической базы Байкальского аналитического центра коллективного пользования СО РАН.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа поддержана грантами РФФИ № 20-016-00114 А и 20-43-380001.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Беловежец Л.А., Третьякова М.С., Маркова Ю.А. Микробный препарат для биоремедиации почвы, загрязненной нефтью и нефтепродуктами. Патент РФ № 2705290. 2019.

Беловежец Л.А., Третьякова М.С., Маркова Ю.А. Микробный препарат для защиты растений, произрастающих на нефтезагрязненных почвах. Патент РФ № 2744094. 2021.

Василенко С.Л., Кохановская Е.Ю., Перова В.А., Туток М.А. Характеристика природных деструкторов нафталина // Материалы III Межд. науч. конф. "Ксенобиотики и живые системы". Минск, 22–24 октября 2008 г. С. 21–23.

Воронков М.Г., Барышок В.П. Силатраны в медицине и сельском хозяйстве. Новосибирск: СО РАН, 2005. 255 с.

Ерофеевская Л.А., Чернявский В.Ф. Потенциал использования *Rhodococcus* для активации процессов очищения почв от нефтезагрязнений // Современная наука: актуальные проблемы теории и практики. Серия: Естественные и технические науки. 2016. № 9–10. С. 3–6.

Ившина И.Б., Куюкина М.С., Каменских Т.Н., Криворучко А.В., Тюмина Е.А., Елькин А.А. Углекислородокисляющие родококки: особенности биологической организации под воздействием экополютантов: атлас-монография / Под ред. Ившиной И.Б. Екатеринбург: УрО РАН, 2021. 140 с.

Куюкина М.С. Биосурфактанты актинобактерий рода *Rhodococcus*: индуцированный биосинтез, свойства, применение. Автореферат дис. ... докт. биол. наук. Пермь, 2006. 45 с.

Леменовский Д.А., Зайцева Г.С., Карлов С.С. Атраны – молекулярные бутаны // Природа. 2008. № 3. С. 28–34.

Решедько Г.К., Стецюк О.У. Особенности определения чувствительности микроорганизмов диско-диффузионным методом // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2001. Т. 3. С. 348–354.

Рогозина Е.А., Андреева О.А., Жаркова С.И., Мартынова Д.А., Орлова Н.А. Сравнительная характеристика отечественных биопрепаратов, предлагаемых для очистки почв и грунтов от загрязнения нефтью и нефтепродуктами // Нефтегазовая геология. Теория и практика. 2010. Т. 5. № 3. С. 1–18.

Серебрякова Е.В., Дармов И.В., Медведев Н.П., Алексеев С.А., Рыбак С.И. Оценка гидрофобных свойств бактериальных клеток по адсорбции на поверхности капель хлороформа // Микробиология. 2002. Т. 70. С. 237–239.

Тимергазина И.Ф., Переходова Л.С. К проблеме биологического окисления нефти и нефтепродуктов углеводородо-кисляющими микроорганизмами // Нефтегазовая геология. Теория и практика. 2012. Т. 7. № 1. С. 1–28.

Третьякова М.С., Беловежец Л.А., Маркова Ю.А. Скрининг бактерий, ассоциированных с растениями, по способности деструктурировать компоненты нефти // Системы. Методы. Технологии. 2015. № 4(28). С. 138–142.

Шаханов А.В., Досаев А.А., Скичко А.С. Математическое моделирование процесса биоразложения дротаверина гидрохлорида клетками родококков // Успехи в химии и химической технологии. 2019. Т. 33. № 11(221). С. 101–104.

Adamovich S.N. New atranes and similar ionic complexes. Synthesis, structure, properties // Appl. Organomet. Chem. 2019. V. 33. Art. e4940.

Krivoruchko A., Kuyukina M., Ivshina I. Advanced rhodococcus biocatalysts for environmental biotechnologies // Catalysts. 2019. V. 9. Art. 236.

Mirskova A.N., Adamovich S.N., Mirskov R.G. Protatranes as effective biostimulators for agriculture, biotechnology, and microbiology // Chem. Sustain. Develop. 2016. V. 24. P. 713–729.

Petrushin I.S., Markova Y.A., Karepova M.S., Zaytsev Y.V., Belovezhets L.A. Complete genome sequence of *Rhodococcus qingshengii* strain VKM Ac-2784D, isolated from *Elytrigia repens* rhizosphere // Microbiol. Resour. Announc. 2021. V. 10. Art. e00107-21.

The Effect of Atranes on the Growth of *Rhodococcus qingshengii* VKM Ac-2784D in the Presence of Various Carbon Sources and on Its Ability to Degrade Naphthalene

L. A. Belovezhets¹, *, Ю. А. Markova², А. А. Levchuk¹, Е. N. Oborina¹, and S. N. Adamovich¹

¹Favorsky Irkutsk Institute of Chemistry, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Irkutsk, 664033 Russia

²Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Irkutsk, 664033 Russia

*e-mail: lyu-sya@yandex.ru

Received May 12, 2022; revised May 27, 2022; accepted June 6, 2022

Abstract—*Rhodococcus qingshengii* VKM Ac-2784D isolated from the rhizosphere of *Elytrigia repens*, is a promising oil degrader. To increase its biotechnological potential, the effect of atranes (potential growth stimulants) on its growth and naphthalene degradation was studied. The effect of the studied atranes on *R. qingshengii* VKM Ac-2784D was shown to depend on the nature of the carbon source: addition of atranes had practically no effect on the growth rate of bacteria in the rich BTN medium; in the media 8E and 8E with glucose, it caused short-term activation of growth, characterized by a shorter lag phase. In the presence of naphthalene, atranes had a predominantly negative effect on the growth of *R. qingshengii* VKM Ac-2784D. The studied atranes had a negative effect on the rate of naphthalene decomposition by *R. qingshengii* VKM Ac-2784D, and also decreased the cell wall hydrophobicity and the synthesis of extracellular biosurfactants. It may therefore be assumed that the studied compounds will have a negative effect on the rate of naphthalene decomposition by this microorganism.

Keywords: *Rhodococcus qingshengii* VKM Ac-2784D, atranes, naphthalene decomposition, cell wall hydrophobicity

МИКРОБНАЯ ДЕСТРУКЦИЯ ИЗДЕЛИЙ ИЗ ПОЛИПРОПИЛЕНА И ПОЛИВИНИЛХЛОРИДА В АНАЭРОБНЫХ УСЛОВИЯХ¹

© 2023 г. Д. В. Малахова^а, М. А. Егорова^а, М. Р. Леонтьева^а, А. Г. Ельченинов^б, Т. В. Панова^с,
Ю. Д. Александров^д, Е. А. Цавкелова^{а, *}

^аКафедра микробиологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, 119234 Россия

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

^сКафедра высокомолекулярных соединений химического факультета МГУ
им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

^дКафедра коллоидной химии химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

*e-mail: tsavkelova@mail.ru

Поступила в редакцию 24.07.2022 г.

После доработки 03.09.2022 г.

Принята к публикации 15.09.2022 г.

Важнейшее преимущество материалов из синтетических полимеров – устойчивость к биоразложению – является одновременно и причиной их накопления, и загрязнения окружающей среды. Тем не менее, некоторые пластики в аэробных условиях подвергаются медленной микробной деструкции, однако об анаэробном разложении пластиков практически ничего не известно. В рамках настоящей работы был исследован рост анаэробных умеренно термофильных (55°C) консорциумов в присутствии образцов изделий из полипропилена (ПП) и поливинилхлорида (ПВХ). Установлено, что в присутствии пластиков увеличивалось количество микробной биомассы по сравнению с контролем, образовывались продукты анаэробного разложения (CO₂, H₂ и H₂S), а масса образцов уменьшалась по сравнению с контролем на 4.4% (ПП) и 6.5% (ПВХ). Бактериальные клетки адгезировались и формировали колонии и биопленки на поверхности пластика. Анализ состава микробных сообществ показал, что в них значительно увеличилась численность анаэробных гидролитиков рода *Tepidimicrobium*, потенциальных синтрофных бактерий рода *Tepidanaerobacter* и, в особенности, сульфатовосстанавливающих бактерий (*Desulfohalotomaculum*). Исследования, проведенные с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии и инфракрасной Фурье-спектроскопии, показали, что уменьшение массы пластика происходит, в основном, за счет гидролиза присутствующих в изделиях добавок (пластификаторов), однако в случае ПВХ наблюдали также изменение структуры пластика. Обсуждается роль таких микробных сообществ в водной среде и глубинных слоях полигонов твердых бытовых отходов, где в анаэробных условиях и при повышенной температуре возможна трансформация отходов ПП и ПВХ.

Ключевые слова: анаэробное термофильное микробное сообщество, пластиковые отходы, поливинилхлорид (ПВХ), полипропилен (ПП), сульфатредукция, *Desulfohalotomaculum*

DOI: 10.31857/S0026365622600602, **EDN:** NNTETA

Полимерные синтетические материалы (пластики) широко используются в самых различных областях деятельности человека; их производство растет, достигнув 368 млн т к 2019 г., а предполагаемая продукция в 2050 г. может составить более 800 млн т (Baran, 2022). Привлекательность пластиков объясняется дешевизной, легким весом, пластичностью материала и, не в последнюю очередь, устойчивостью к биологическому разложению. Это же качество, однако, является и причиной

крупнейшей экологической проблемы: пластиковые отходы в огромных количествах загрязняют водоемы и почву, принося вред населяющим Землю живым существам, включая человека. Полная утилизация пластиковых отходов возможна при их сжигании, но даже этот способ применяется лишь к 12% от всего объема произведенного пластика (Geyer et al., 2017). Кроме того, сжигание, например, материалов из поливинилхлорида приводит к образованию хлора, фенолов, диоксинов и других крайне токсичных и канцерогенных для человека соединений. Вторичной переработке подвергается около 3–10% пластика, тогда как ос-

¹ Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0026365622600602 для авторизованных пользователей.

новая часть скапливается на полигонах твердых бытовых отходов (ТБО) или поступает в биосферу (Geyer et al., 2017; Ru et al., 2020).

В последнее время появляется все больше информации о биодegradации пластиков с использованием культур микроорганизмов и их ферментов, описанных, в том числе, в ряде недавних обзоров (Mohan et al., 2020; Ru et al., 2020; Плакунов и соавт., 2020; Котова и соавт., 2021). В многочисленных экспериментальных работах приводятся сильно различающиеся данные о возможностях и скоростях разложения пластиков грибами и бактериями (в основном аэробными органотрофами), а также о влиянии на этот процесс различных физико-химических факторов (Котова и соавт., 2021). Несмотря на явное отсутствие бактерий, эффективно разлагающих пластики, накопление информации о микроорганизмах, способных осуществлять деструкцию таких изделий, может в дальнейшем привести к созданию технологий биологической утилизации пластиковых отходов.

Подавляющее большинство работ по микробной дegradации пластиков посвящено изучению разложения полиэтилена и полиэтилентерефталата, в то время как сведения о биодegradации полипропилена (ПП) и поливинилхлорида (ПВХ) весьма ограничены (Skariyachan et al., 2018; Rana et al., 2022). Вместе с тем, эти пластики входят в число наиболее массово производимых: на долю ПП и ПВХ приходится 21 и 12% соответственно, от общего числа продукции пластиковых материалов (Geyer et al., 2017). Пластиковые изделия и отходы, в том числе содержащие ПП и ПВХ, зачастую захораниваются в виде ТБО на полигонах, и доступ кислорода в такие системы ограничен частично или полностью.

Целью нашей работы было изучение потенциальной возможности анаэробного биоразложения изделий из ПП и ПВХ, обнаружение и идентификация бактерий, способствующих утилизации этих полимеров, а также исследование процессов, происходящих в анаэробных условиях с этими материалами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования и условия культивирования. Источником микроорганизмов, потенциально способных к разложению ПП и ПВХ в анаэробных условиях, служили наиболее активные целлюлозолитические микробные консорциумы, выделенные ранее из различных природных и антропогенных источников (Цавкелова и соавт., 2012; Tsavkelova et al., 2018). Исходно было использовано 6 различных целлюлозолитических сообществ, а также образцы почвы (4 образца),

компостных куч (2 образца) и навоз крупного рогатого скота (КРС, 2 образца).

Инокулят (10%, объем/объем для жидких или масса/объем для твердых образцов) вносили в 100-мл флаконы с 40 мл питательной среды следующего состава (г/л): K_2HPO_4 – 1.0; KH_2PO_4 – 1.0; NH_4Cl – 2.5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0.5; $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ – 0.1; $NaCl$ – 0.1; $CaCO_3$ – 1.0; $NaHCO_3$ – 5.0; раствор микроэлементов – 1 мл. Раствор микроэлементов содержал (мг/л): $ZnCl_2$ – 70.0; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ – 100.0; $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ – 190.0; H_3BO_3 – 6.0; $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ – 36.0; $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ – 2.0; $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ – 24.0; $Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$ – 15.0; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ – 1000.0; pH среды 7.0–7.5.

В качестве пластиковых субстратов использовали фрагменты упаковочных пакетов для круп из полипропилена и обложки для тетради из поливинилхлорида, в виде пленок площадью 1 см²; конечное количество субстрата во флаконе составляло 0.1 г. Поскольку исходные инокулянты содержали целлюлозолитические сообщества и компостируемую растительную биомассу, в качестве дополнительного субстрата при первом засеивании в среду вносили целлюлозу в виде фильтровальной бумаги (8 г/л), а также дрожжевой экстракт (2 г/л) и пептон (1 г/л). В последующих пересевах в качестве органических ко-субстратов использовали только дрожжевой экстракт и пептон, а их концентрация была уменьшена до 0.2 и 0.5 г/л соответственно. Флаконы герметично закупоривали и создавали анаэробные условия культивирования, заменяя газовую фазу аргоном.

Инокулированные флаконы инкубировали при 55°C в термостате (“Binder”, Германия). В качестве контролей использовали неинокулированные питательные среды того же состава, а также засеянные среды без пластика. Пересевы производили после тщательного перемешивания, перенося шприцем аликвоту культуральной жидкости (10% по объему) в новый флакон с соответствующим образцом пластика и фоновой средой. В первом пассаже культуры инкубировали в течение 1.5–2 мес., а в последующих – 2–3 мес. Все эксперименты проводили в 3–5 повторностях.

Анализ роста культур и образования ими продуктов анаэробного метаболизма. Динамику роста микробных сообществ оценивали по изменению содержания общего белка. Для этого проводили щелочной гидролиз клеток с помощью 2 н NaOH, который добавляли в соотношении 1 : 1 к суспензии клеток и оставляли при 37°C на 2 ч, после чего образцы разводили в 5 раз. В полученном гидролизате колориметрически (КФК-3-01-“ЗОМЗ”, Россия) определяли общий белок по стандартному методу Лоури.

Образование газообразных продуктов (метан, водород, углекислый газ) измеряли с помощью

газовой хроматографии на хроматографе Кристалл 2000 М (“Хроматэк”, Россия) с микрокапиллярной колонкой FFIP (15000 × 0.5 мм), аргоном в качестве газа-носителя и температурным детектором (градиент от 70 до 160°C). Результаты анализировали с помощью программного обеспечения Chromatec Analytic 2.5 (“Хроматэк”, Россия) согласно описанной ранее методике (Цавкелова и соавт., 2012).

Концентрацию сульфид-иона определяли колориметрически при 660 нм на фотоэлектроколориметре КФК-3-01-“ЗОМЗ” (Россия) в кювете с длиной оптического пути 1 см, используя N,N-диметил-парафенилендиамин (Trüper, Schlegel, 1964).

Анализ структуры микробных сообществ. Состав анаэробных микробных сообществ, утилизирующих ПП и ПВХ, проводили в динамике, исследуя их после второго и четвертого пересевов. Для выделения ДНК из сообществ 5 мл культуры центрифугировали при 12000 g в течение 5 мин, супернатант сливали, а осадок клеток замораживали при –20°C. Из образцов выделяли ДНК с использованием набора DNeasy PowerLyzer Microbial Kit (“Qiagen”) и гомогенизатора FastPrep-24 5G (“MP Bio”, США) в соответствии с инструкцией производителя. Концентрацию ДНК измеряли на флуориметре Qubit 2.0 (“Invitrogen/Life Technologies”, США). Подготовку ДНК библиотек фрагмента V4 гена 16S рРНК, последующее секвенирование на платформе Illumina MiSeq (“Illumina”, США) и первичную обработку прочтений проводили, как описано ранее (Vortsepneva et al., 2021). Прочтения были обработаны и отфильтрованы с использованием пакета dada2 v.1.14.1 (Callahan et al., 2016) со следующими параметрами: truncLen = 220, maxN = 0, maxEE = 2, truncQ = 2. В полученных образцах с помощью dada2 были определены уникальные последовательности (ASV – amplicon sequence variant) для каждого образца, было проверено наличие химерных последовательностей. Для финального набора ASV была определена таксономическая принадлежность в пакете dada2 с использованием нативного байесовского классификатора (Wang et al., 2007) на основе базы данных Silva Ref NR v. 138.1 (Quast et al., 2013). Показатели биоразнообразия, такие как индекс Шэннона, обратный индекс Симпсона и индекс Chao1 были определены с использованием пакета phyloseq v.1.3 (McMurdie, Holmes, 2017). Визуализацию данных проводили в пакете ggplot2 и ggpattern (<https://coolbutuseless.github.io/package/gg-pattern/>).

Анализ изменения массы и структуры пластика. Проводили измерение массы исходного пластика, а также ПП и ПВХ в опытных и контрольных вариантах перед началом культивирования и после его окончания. Кусочки пластика в опытных образцах отмывали от адгезированных клеток путем

инкубации на шейкере при 150 об./мин в 2%-ном растворе SDS и в течение 4 ч, последующей трехкратной отмывкой в дистиллированной воде и высушивании при 55°C в течение 18 ч. Массу образцов определяли на аналитических весах (ER 60A, “A&D Company Ltd.”, Япония). С контрольными образцами производили те же самые процедуры.

Микробные обрастания образцов и происходящие с пластиком механические изменения исследовали с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) в центре коллективного пользования “Электронная микроскопия в науках о жизни” МГУ им. М.В. Ломоносова. Для этого образцы фиксировали 30 мин в 2.5% глутаровом альдегиде на фосфатном буфере, затем обезвоживали в этиловом спирте возрастающих концентраций (30, 50, 70, 80 и 99.5%) и далее в смесях абсолютного спирта и ацетона в пропорциях 3 : 1, 1 : 1, 1 : 3. Образцы помещали в абсолютный ацетон на ночь и затем высушивали в критической точке на оборудовании HCP-2 Critical Point Dryer (“Hitachi”, Япония) и напыляли смесью Au–Pd в ионно-распылительной установке Eiko IB-3 Ion Coater (“Hitachi”, Япония). Изучение образцов проводили в сканирующем электронном микроскопе JSM-6380LA (“Jeol”, Япония) в режиме высокого вакуума при давлении в камере 3×10^{-5} торр с ускоряющим напряжением 20 кВ.

Для анализа структуры и свойств исследуемых пластиков образцы заливали раствором 2 н NaOH и инкубировали при 37°C в течение 2 ч, после чего трижды отмывали дистиллированной водой и высушивали при 55°C в течение 18 ч для удаления бактериальных клеток. Структуру образцов пластика исследовали методом инфракрасной (ИК) спектроскопии; ИК спектры регистрировали на ИК-Фурье спектрометре Nicolet IR200 (“Thermo Electron”, США) с приставкой нарушенного полного внутреннего отражения (ZnSe кристалл) в диапазоне от 600 до 4000 cm^{-1} .

Теплофизические свойства образцов пластика изучали методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) на термоанализаторе DSC 402 F1 Phoenix (“Netzsch”, Германия). Для этого образцы пластика массой 2–5 мг помещали в алюминиевые тигли, запечатывали и нагревали со скоростью 10°C/мин в токе аргона 50 мл/мин. Образцом сравнения служил пустой алюминиевый тигель. Для анализа использовали только первый цикл нагревания, который дает информацию об исходном состоянии кристаллической фазы в образце. Степень кристалличности вычисляли по формуле: $\chi = \Delta H / \Delta H_0$, где ΔH – экспериментально полученная теплота плавления полимера, а ΔH_0 – теплота плавления идеального кристалла полимера (170 Дж/г для полипропилена).

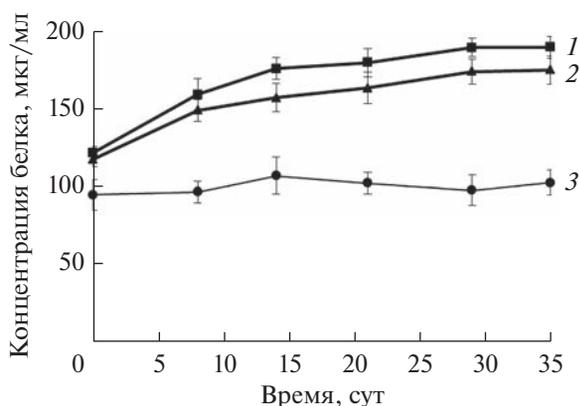


Рис. 1. Динамика развития микробных термофильных анаэробных сообществ, культивируемых на поливинилхлориде (ПВХ) и полипропилене (ПП). Значения представлены средним арифметическим из трех повторностей; (1) — ПВХ, (2) — ПП; (3) — контроль.

Измерение краевых углов смачивания проводили на приборе OCA 15EC (“DataPhysics”, Германия). Для этого образцы размером 10×5 мм наклеивали на предметное стекло при помощи двустороннего скотча, наносили 1–2 мкл дистиллированной воды и выдерживали 10 с для достижения равновесия. Метод основан на измерении краевых углов (Θ) капель жидкости, нанесенных на поверхность. Краевой угол представляет собой угол между касательной к поверхности капли, проведенной из точки касания, и исследуемой поверхностью.

Все эксперименты проводили в нескольких (3–5) повторностях. Статистическую обработку проводили в программе Microsoft Excel XP.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Рост анаэробного термофильного микробного сообщества и наблюдаемые изменения среды в присутствии образцов изделий из ПП и ПВХ. Культивирование микробных сообществ, засеянных из различных источников, включая целлюлозолитические сообщества, почву, навоз КРС и компостные кучи, через 6–8 нед. инкубирования при 55°C выявило активность микроорганизмов только в пробах с наиболее активными целлюлозолитическими консорциумами. По сравнению с контрольными вариантами в них было отмечено не только помутнение среды и газообразование, но и изменение цвета пластика. Среди целлюлозолитических сообществ были отобраны по два для каждого вида пластика, которые были объединены для следующего пересева. В образцах с инокулятами из других источников таких изменений отмечено не было. В пробах, инокулированных навозом КРС, помутнение среды и повышение

давления за счет образования газообразных продуктов, наблюдаемое в первом пассаже, исчезло после пересева. Полученные итоговые микробные сообщества в дальнейшем пересевали еще три раза уже на обедненную среду, лишенную целлюлозы в качестве косубстрата, и со сниженным содержанием дрожжевого экстракта и пептона, и они продолжали показывать отмеченные изменения по образованию продуктов метаболизма, микробному росту, изменению состояния пластика и убыли массы образцов, в отличие от контрольных вариантов (табл. 1).

В процессе роста в опытных культурах во всех пересевах наблюдали избыточное давление, которое было достаточно высоким (1.0 бар для ПВХ и 0.8 бар для ПП) в первичном посеве, когда в среде присутствовала целлюлоза, однако затем не превышало 0.3–0.4 и 0.4–0.6 бар для ПП и ПВХ соответственно. Газохроматографический анализ показал, что образующиеся газообразные продукты состоят из углекислого газа (0.7% от общего объема газовой фазы для сообществ, культивируемых на ПП, и 1.2% для сообществ, выращиваемых на ПВХ) и незначительного количества водорода (0.07 и 0.03% на ПВХ и ПП соответственно). В контрольных культурах показатели практически не отличались от нуля.

Помимо газообразных продуктов, в культурах, содержащих пластики и анаэробные термофильные консорциумы, было отмечено появление растворенного сульфида (табл. 1). Его максимальное образование наблюдали в третьем пассаже, при этом наибольшей концентрации в динамике развития сообществ значения достигали к 60–70 сут культивирования в каждом из пересевов (табл. 1). Небольшое количество сульфида в контрольных флаконах, лишенных пластика, могло образовываться за счет использования сообществом присутствовавших в среде дрожжевого экстракта и пептона; однако оно составило лишь 7–20% от сульфида, образующегося в опытных флаконах с пластиком.

Динамика развития микробных сообществ, которые к этапу заключительного четвертого пересева культивировали в целом более 10 мес., показала, что в течение 35 сут культивирования во всех опытных образцах происходило увеличение содержания микробного белка по сравнению с контролями без пластика (табл. 1, рис. 1). Более высокие показатели были характерны для культур, использующих ПВХ.

Изменения в составе микробных сообществ в процессе их инкубации с образцами ПП и ПВХ. Результаты высокопроизводительного секвенирования V4-вариабельных фрагментов генов 16S рРНК бактерий анаэробных термофильных сообществ в опыте (с пластиком) и контроле (без пластика) представлены в табл. 2. Изначальное коли-

Таблица 1. Параметры развития анаэробных микробных сообществ в присутствии пластиковых изделий из полипропилена (ПП) и поливинилхлорида (ПВХ) при 55°C

Пластик	Пересев	Органические добавки, г/л	Время инкубации, сут	Прирост белка, мкг/мл ^б	Убыль массы пластика, %	Давление, бар	Продукты метаболизма ^б
ПП	1	Целлюлоза – 10.0; ДЭ ^а – 2.0; пептон – 1.0	45–60	– ^с	4.4 ± 0.38	0.8	–
	2	ДЭ – 0.2; пептон – 0.5	60–90	–	2.8 ± 0.09	0.4	CO ₂ 0.7%; H ₂ 0.05%; H ₂ S 0.4 ± 0.09 мМ
	3		60–90	–	1.7 ± 0.16	0.3	CO ₂ 0.6%; H ₂ 0.03% H ₂ S 0.8 ± 0.10 мМ
	4		35–90	57 ± 5.0	0.9 ± 0.03	0.3	CO ₂ 0.5%; H ₂ 0.01% H ₂ S 0.7 ± 0.04 мМ
ПВХ	1	Целлюлоза – 10.0; ДЭ – 2.0; пептон – 1.0	45–60	–	6.5 ± 0.32	1.0	–
	2	ДЭ – 0.2; пептон – 0.5	60–90	–	4.7 ± 0.13	0.6	CO ₂ 1.2%; H ₂ 0.07% H ₂ S 0.7 ± 0.16 мМ
	3		60–90	–	3.1 ± 0.15	0.4	CO ₂ 1.0%; H ₂ 0.04% H ₂ S 1.2 ± 0.09 мМ
	4		35–90	70 ± 3.2	2.4 ± 0.08	0.4	CO ₂ 1.1%; H ₂ 0.03% H ₂ S 1.1 ± 0.11 мМ

Примечание. ^а – дрожжевой экстракт; ^б – данные указаны за вычетом контроля; ^с – нет данных.

чество прочтений V4-региона гена 16S рНК для образцов составляло от 4671 до 23868; после проведения этапов фильтрации и удаления химерных последовательностей количество прочтений сократилось до 3986–17723. Среди всех прочтений были определены 506 уникальных последовательностей. Пропорция нехимерных уникальных последовательностей составляла 89% от общего количества прочтений.

Для всех изученных образцов были получены индексы альфа-разнообразия (рис. ES1); наибольшим биоразнообразием согласно индексу Шэннона обладал контрольный образец второго пассажа для ПВХ (PVC.2.cont) (3.49), другие образцы контролей имели показатели 2.27–2.91. В опытных образцах, которые культивировали с добавлением пластика, более низкие показатели 1.8–2.59 подтверждали узкое разнообразие микроорганизмов в составе микробных сообществ, селективированных за время культивирования на пластиках. Другие индексы (обратный индекс Симпсон и индекс Chao1) демонстрировали аналогичные тенденции. В дальнейшую работу были

взяты 200 наиболее массовых ASV, которые представляли 97–100% исследуемых микробиомов.

Во всех образцах бактерии филума *Firmicutes* (*Bacillota*) составляли от 80.9 до 99.9% всех прокариот. В контрольном для ПВХ образце PVC.2.cont присутствует значительная доля представителей *Bacteroidota* (13.29%). Кроме того, в различных образцах можно было обнаружить последовательности, отнесенные к филумам *Proteobacteria*, *Actinobacteriota*, *Halanaerobiaeota* в качестве минорных компонентов сообщества (0.05–2.28%). Разнообразие в контрольных образцах значительно сократилось от второго к четвертому пересеву.

В опытных образцах за время культивирования произошла сукцессия микробных популяций (табл. 2), в результате которой стали доминировать представители родов *Tepidimicrobium*, *Tepidanaerobacter* и, особенно, сульфатвосстанавливающие бактерии (СВБ) из рода *Desulfohalotomaculum*. Несмотря на то, что эти микроорганизмы также встречались и в контрольных образцах, лишь *Tepidimicrobium* имел сходные пропорции в опытных и контрольных сообществах к 4-му пассажу

Таблица 2. Структура микробных сообществ, культивируемых при 55°C, без (контроль) и с добавлением полипропилена (PP) и поливинилхлорида (PVC)

	II			IV				
	Контроль (PP.2.c)	%	Опыт (PP.2.p)	%	Контроль (PP.4.c)	%	Опыт (PP.4.p)	%
Полипропилен	<i>Tepidimicrobium</i>	47.24	<i>Tepidimicrobium</i>	32.38	<i>Tepidimicrobium</i>	45.27	<i>Tepidimicrobium</i>	39.83
	M55-D21 (<i>Firmicutes</i> , <i>Limnochordia</i>)	20.97	M55-D21	24.99	Uncultured <i>Peptococcaceae</i>	35.39	<i>Tepidanaerobacter</i>	40.70
	<i>Tepidanaerobacter</i>	17.30	<i>Tepidanaerobacter</i>	18.50	M55-D21 (<i>Limnochordia</i>)	8.08	<i>Desulfohalotomaculum</i>	18.29
	SBR2 (<i>Firmicutes</i> , <i>Thermoanaerobacteriales</i>)	5.32	<i>Desulfohalotomaculum</i>	5.09	<i>Desulfohalotomaculum</i>	3.68		
	<i>Desulfohalotomaculum</i>	4.36	Uncultured <i>Peptococcaceae</i>	3.05	<i>Tepidanaerobacter</i>	3.50		
	2-й пересев			4-й пересев				
Поливинилхлорид	Контроль (PVC.2.c)	%	Опыт (PVC.2.p)	%	Контроль (PVC.4.c)	%	Опыт (PVC.4.p)	%
	<i>Herbinix</i>	33.94	<i>Tepidimicrobium</i>	62.23	<i>Tepidimicrobium</i>	33.50	<i>Tepidimicrobium</i>	32.69
	<i>Tepidimicrobium</i>	13.41	<i>Desulfohalotomaculum</i>	17.96	Uncultured <i>Planococcaceae (Bacillales)</i>	24.61	<i>Desulfohalotomaculum</i>	12.15
	<i>Bacteroides</i>	9.26	<i>Tepidanaerobacter</i>	15.11	<i>Tepidanaerobacter</i>	11.70	<i>Tepidanaerobacter</i>	27.45
	Uncultured <i>Lachnospiraceae</i>	5.52			M55-D21 (<i>Limnochordia</i>)	6.82	<i>Brockia</i>	27.63
	<i>Faecalibacterium</i>	4.57			<i>Herbinix</i>	6.37		
	<i>Desulfohalotomaculum</i>	1.27			<i>Desulfohalotomaculum</i>	1.98		

Примечание. В таблице показано относительное присутствие бактерий, представляющих доминирующие популяции (>3% от всех), за исключением *Desulfohalotomaculum*, чья популяция в контроле для поливинилхлорида составила лишь 1.27 – 1.98%. В скобках указаны более высокие таксономические ранги для бактерий с неопределенным родом. Анализ состава микробных сообществ проводили для второго (II) и четвертого (IV) пересевов.

(около 33% на ПВХ и 40–45% на ПП). Причем этот гидролитик в вариантах с ПВХ, очевидно, вытеснил известную термофильную целлюлозолитическую бактерию *Herbinix* sp. (табл. 2). Два других микроорганизма представлены в контрольных образцах в значительно меньших количествах: доля *Tepidanaerobacter* составила 3.5% на ПП и 11.7% на ПВХ (против 40 и 27.4% в опытных вариантах), а *Desulfohalotomaculum* — лишь 3.7% на ПП и менее 2% на ПВХ, что меньше в 5 и 6 раз, соответственно, чем в опыте. Кроме того, сообщества контрольных образцов содержали и другие бактерии, принадлежащие к порядкам *Clostridiales* и *Bacillales*, которые не были обнаружены или элиминировались из опытных микробных сообществ. Интересным отличием опытных образцов с ПВХ является накопление в нем бактерий рода *Brockia* (27.6%).

Изменение массы, состояния поверхности и структуры пластиков. В результате инкубирования микробных сообществ с пластиком масса ПВХ в опытных образцах первого пассажа уменьшилась на 6.5%, а ПП — на 4.4% за два месяца культивирования. В последующих пересевах уменьшение массы пластиков продолжилось, однако, с меньшей эффективностью (табл. 1). В контрольных вариантах изменений массы ПВХ и ПП не происходило.

После второго пересева и инкубации в течение двух месяцев была проведена сканирующая электронная микроскопия (СЭМ) образцов пластика, инкубированных в присутствии активных микробных сообществ. Было выявлено, что бактерии адгезируются на поверхности пластика и присутствуют в виде одиночных клеток или агрегатов и популяций, объединенных межклеточным матриксом (рис. 2). В отличие от контрольных (неинокулированных) образцов (рис. 2а), структура пластика, инкубированного в анаэробных условиях в присутствии термофильных микробных сообществ (рис. 2б), стала гетерогенной, сам пластик стал более рыхлым, было отмечено отслоение мелких частиц и появление полостей и разрывов на его поверхности (рис. 2в).

Изменения структуры пластиков были исследованы с помощью метода дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК), позволяющего получить информацию о температуре и теплотах плавления кристаллической фазы, а также о других фазовых переходах в полимерах. В образцах ПП, как контрольных, инкубированных в среде, так и в опытных, значимых изменений (дефектов, нарушения целостности материала) по сравнению с исходным полимером обнаружено не было (рис. 3). Наряду с характерным для ПП пиком плавления при 165°C, присутствует пик плавления при 103°C, характерный для полиэтилена, что указывает на присутствие этого полимера в исследуемой пластиковой упаковке. При

этом температуры плавления полимерных компонентов, которым соответствуют пики на кривых ДСК, для контрольного и опытного образцов оставались практически неизменными. Вычисленные исходя из площадей пиков плавления величины степени кристалличности ПП для всех трех образцов (исходный полимер, абиогенный контроль и опытные образцы) оказались примерно одинаковыми и составляли 8–9%. По данным ИК-Фурье спектроскопии не было обнаружено пиков (данные не представлены), характерных для продуктов разложения ПП, в частности, отсутствовал пик, соответствующий карбонильной группе, образующейся при окислении полимеров в аэробных условиях, и характеризующий степень разложения полиолефинов. Поверхностные изменения ПП, исследованные с помощью измерения угла смачивания, также показали, что для исследованных образцов ПП угол смачивания практически не изменялся по сравнению с исходным материалом и составлял порядка 90°. Таким образом, по данным анализа структуры и поверхности материала (упаковка для круп) на основе полипропилена в результате воздействия бактерий заметных изменений в самом полимере не наблюдалось, а потеря массы в ходе культивирования могла происходить за счет разложения присутствовавших в изделии дополнительных соединений.

В случае образцов ПВХ (обложка для книг), как в контроле, так и в опыте, наблюдали существенное изменение цвета пластика: исходно прозрачный материал приобретал цвет от светло-желтого (в среде) до желто-коричневого и даже пурпурного (в присутствии бактерий), что может свидетельствовать о протекании химических реакций, усиливающихся при контакте с микробным консорциумом. Измерения краевого угла смачивания образцов свидетельствуют о существенной гидрофиллизации поверхности: для исходного и контрольного материалов величина Θ составляют ~90°, в то время, как для инкубированного в присутствии бактерий образца Θ уменьшается до 65°–70°, что также свидетельствует о биогеомном воздействии на образец. Данные ИК-Фурье спектроскопии позволяют сделать вывод о некоторых модификациях в исследованных образцах, однако, основные изменения наблюдаются в пиках, характерных для химических групп, содержащихся в возможных пластификаторах. Так, в исходном образце ПВХ интенсивная полоса поглощения при 1720 см⁻¹, характерная для карбонильной группы, свидетельствует о присутствии фталатов, а слабая полоса при 1190 см⁻¹ — о наличии фосфатов (данные не представлены). В спектре инкубированного в присутствии бактерий образца интенсивность полосы 1720 см⁻¹ снижается, что говорит об уменьшении содержания пластификатора в ПВХ. Кроме того, в образце, подвергнутому воздействию бактерий, также наблюдается появление не-

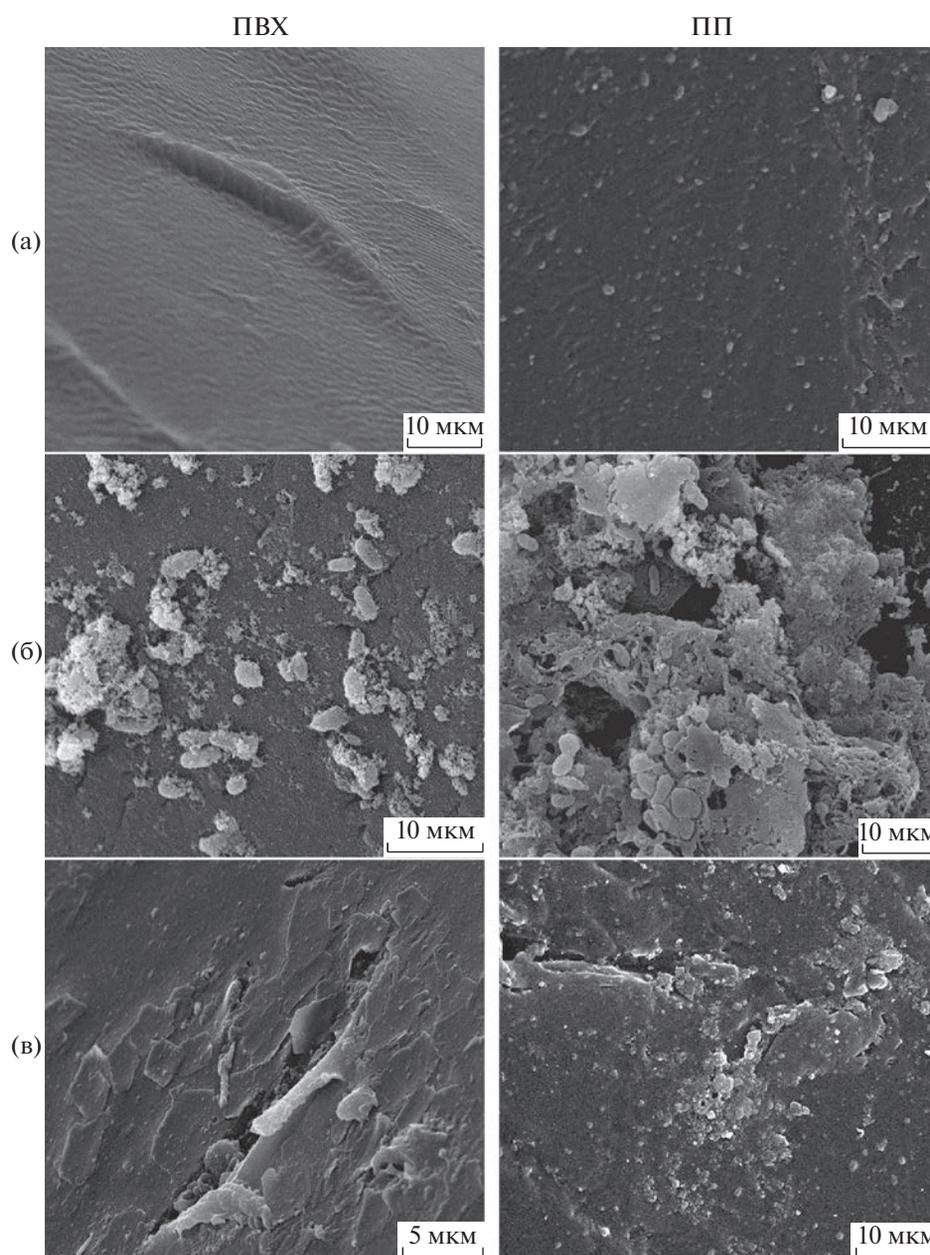


Рис. 2. Поверхность пластика после обрастания микробным анаэробным термофильным сообществом. Обозначения: ПВХ – поливинилхлорид; ПП – полипропилен; (а) – контрольные (неинокулированные) образцы; (б) – опытные образцы с отдельными клетками бактерий и популяциями микробных клеток, формирующих агрегаты и обрастания на пластике; (в) – опытные образцы, отмытые от бактериальных клеток с помощью раствора SDS.

скольких слабых полос в области $1600\text{--}1670\text{ см}^{-1}$, отвечающих наличию двойных углерод–углеродных связей в полимерных цепях. Появление двойных связей также может являться причиной появления окраски у материала.

ОБСУЖДЕНИЕ

Поливинилхлорид (ПВХ) и полипропилен (ПП), наряду с полиэтилентерефталатом, полистиролом и полиэтиленом, относят к базовым,

наиболее широко распространенным пластиком. Упаковочный пластик составляет 39.6% от всего глобально произведенного пластика (Baran, 2022). Полипропилен – это линейный углеводород, представляющий собой продукт полимеризации пропилена, с формулой $(C_3H_6)_n$. В зависимости от расположения метильной группы выделяют три стереоизомера этого высокомолекулярного соединения. Наличие добавок, в том числе натуральных волокон, крахмала и полилактида в составе готовой продукции ПП, а также методы

предобработки, связанные с УФ- и γ -облучением или термической обработкой, значительно влияют на разложение изделий из ПП (Rana et al., 2022). Для дрожжей *Yarrowia lipolytica* была установлена способность потреблять не сам ПП, а продукты его термического пиролиза, в результате которого образовывались алифатические углеводороды, жирные спирты и алканы (Mihreteab et al., 2019). Уменьшение массы ПП отмечали при культивировании аэробных бактерий родов *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter* и *Rhodococcus* (Auta et al., 2018; Rana et al., 2022), но уровень снижения массы ПП варьировал от 0.43% за 12 мес. до 6.4% за 40 сут (Auta et al., 2018; Котова и соавт., 2021), что в значительной степени связано с различными методологическими подходами к расчету степени биоразложения пластиков. Так, сенсационным сообщением является термофильный (50°C) аэробный консорциум, состоящий из бактерий родов *Brevibacillus* и *Aneurinibacillus*, который за 140 сут снижал массу полипропиленовых гранул на 44%, а пленок из этого материала – на 56% (Skariyachan et al., 2018).

Поливинилхлорид состоит из линейных или малоразветвленных макромолекул, а изделия на его основе обычно содержат термостабилизаторы, пигменты, красители, минеральные наполнители и пластификаторы, которые также могут быть субстратом для микроорганизмов. Среди деструкторов ПВХ, способных к частичному разложению полимера, описаны представители грибов из родов *Phanerocheate*, *Lentinus*, *Aspergillus* (Ali et al., 2014), а среди бактерий – бациллы и псевдомонады, в том числе в составе консорциумов, например, состоящих из *Pseudomonas otitidis*, *Bacillus cereus* и *Acanthopleurobacter pedis* (Anwar et al., 2016; Giacomucci et al., 2019). За период инкубации от 3 до 9 мес. такие микробные сообщества показали уменьшение молекулярной массы ПВХ в 2.4 и 4.3 раза соответственно по сравнению с контролем (Anwar et al., 2016).

Таким образом, имеющиеся в настоящее время экспериментальные данные показывают, что микробная деструкция ПП и ПВХ происходит с той или иной степенью эффективности, хотя ее регистрация затруднена медленной скоростью процесса и, главное, присутствием примесей в производственных изделиях из пластика. Все упомянутые исследования проводили исключительно в аэробных условиях, а среди изученных деструкторов ПП и ПВХ представлены аэробные микроорганизмы.

В настоящей работе мы исследовали анаэробный процесс разложения пластиковых изделий, которые преимущественно составляют отходы, накапливающиеся в окружающей среде. Нами впервые было продемонстрировано уменьшение массы ПП- и ПВХ-субстратов и их деструкция, происходящая за период инкубации 2–3 мес. (60–90 сут) в анаэробных умеренно термофиль-

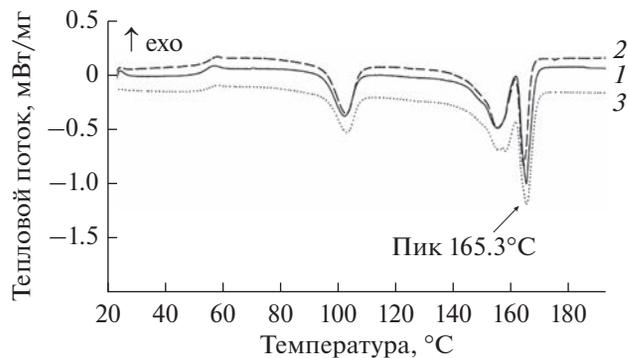


Рис. 3. Кривые дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) для образцов на основе полипропилена: исходный пластик – упаковка для пищевых продуктов (1), абиогенный контроль в среде (2) и опытный образец, инкубированный в присутствии бактерий (3).

ных условиях, что сходно по скоростям, зарегистрированным и описанным другими авторами для аэробного разложения этих же субстратов (Auta et al., 2018; Котова и соавт., 2021). Убыль массы пластиков сопровождалась развитием микробного сообщества и увеличением биомассы бактерий, среди которых доминирующими популяциями стали гидролитики (*Tepidimicrobium*), а также синтрофные (*Tepidanaerobacter*) и сульфатредуцирующие (*Desulfohalotomaculum*) бактерии. Присутствие *Tepidimicrobium* во всех исследованных сообществах (в опыте и контроле) может объясняться преимущественным потреблением ими пептона и/или дрожжевого экстракта, входящих в состав среды. Для представителей *Tepidimicrobium* характерен органотрофный рост на ряде белоксодержащих субстратов, включая пептон, триптон, дрожжевой экстракт и казеиновые кислоты, тогда как углеводы потребляются лишь некоторыми видами (например, *T. xylanilyticum*; Niu et al., 2009) или совсем не используются (*T. ferriphilum*; Slobodkin et al., 2006). Пептон используется представителями *Bacillales*, а также пептококками и лимнохлоридиями, принадлежащими сейчас или ранее к порядку *Clostridiales*, которые были выявлены в контрольных, но не в опытных образцах. Однако небольшие количества пептона и дрожжевого экстракта (0.05 и 0.02% соответственно) недостаточны для полноценного активного развития микроорганизмов пептолитиков в течение длительного (2–3 мес.) периода культивирования. За это время более доступные субстраты полностью истощились, а разнообразие пептолитиков в опытных образцах значительно сократилось к четвертому пересеву до единственного представителя *Tepidimicrobium*. Тем не менее, аккумуляция микробных популяций *Tepidanaerobacter* и сульфатредуцирующих бактерий *Desulfohalotomaculum* показывает фор-

мирование микробного сообщества, участвующего в медленном и комплексном процессе анаэробного разложения пластиков. *Tepidanaerobacter* использует органические спирты и кислоты: так, бутират и лактат потребляются *Tr. syntrophicus* JLT (Sekiguchi et al., 2006; Matsuura et al., 2016), а ацетат — *Tr. acetatoxydans* Re1 (Manzoor et al., 2013), в том числе в синтрофных ассоциациях с гидрогенотрофными метаногенами (Sekiguchi et al., 2006; Matsuura et al., 2016).

Наличие пластика может способствовать структурированию микробных консорциумов за счет адгезии и конкурентных преимуществ одних микробных популяций над другими и установления новых трофических связей в таком микробном сообществе. Это подтверждается накоплением в опытных вариантах продуктов анаэробной деструкции: CO_2 , H_2 и H_2S . Низкое содержание водорода можно объяснить потреблением его сульфатредукторами, в результате чего происходило образование сероводорода. Такую же роль могут играть обнаруженные нами в ПВХ-разлагающем сообществе бактерии рода *Brockia*. Следует отметить, однако, что для единственного известного вида этих термофильных строго анаэробных бактерий, *Brockia lithotrophica*, выделенного из горячего источника кальдеры вулкана Узон, акцептором водорода является элементная сера (Perevalova et al., 2013). Примечательно, что дрожжевой экстракт не только не стимулирует рост этой бактерии, но и не требуется для роста; штамм также не использует простые сахара, пируват, ацетат, пропионат и пептон. Таким образом, в результате инкубации в присутствии обоих видов пластиков разнообразие микроорганизмов в микробных сообществах падает по сравнению с контролем, что косвенно подтверждает участие селективированных за время опыта микроорганизмов в разложении исследованных изделий из ПВХ и ПП. Мы также не выявили ни активных целлюлозолитиков, ни метаногенных архей, которые присутствовали в некоторых исходных инокулятах (Tsavkelta et al., 2018). Однако значительная доля сульфатвосстанавливающих бактерий вызывает интерес, поскольку присутствие в среде $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ в количестве 0.5 г/л хоть и благоприятствует росту, но не является определяющим фактором для накопления СВБ в микробном сообществе. При этом СВБ широко представлены в анаэробных зонах различных природных и антропогенных экосистем (Muzyer, Stams, 2008). СВБ из рода *Desulfohalotomaculum* (ранее род *Desulfotomaculum*; Watanabe, 2018) имеют оптимумы роста от 35 до 60°C и отличаются устойчивостью к NaCl в диапазоне от 0.1 до 14%. Известно, что Мировой океан является главным стоком для сульфатов (Muzyer, Stams, 2008), поэтому можно предположить, что именно СВБ будут превалировать в анаэробной зоне в случае попадания туда пластиковых отходов; это-

му также будет способствовать устойчивости к высокой солености представителей *Desulfohalotomaculum*. СВБ способны также разлагать различные органические полутанты: толуол, ксилол и другие циклические ароматические соединения и углеводороды (Meckenstock et al., 2016), используя их как источник углерода и энергии, что увеличивает их потенциальные возможности к ко-разложению пластиков, особенно в составе отходов. В тоже время, нельзя исключать и ингибирующего действия пластиков на микроорганизмы, что еще раз подтверждает, что конкурентное преимущество будут получать более устойчивые микробные популяции.

Сравнение результатов, полученных различными методами анализа, указывает на то, что в случае ПП основным субстратом являлись присутствующие в нем добавки, так как, несмотря на уменьшение массы пластика и видимое на электронных микрофотографиях разрушение его поверхности, результаты ДСК, измерения краевых углов смачивания и ИК не показали изменений в структуре ПП. При использовании ПВХ потеря полимерным материалом добавок, безусловно, также имеет место, однако увеличение гидрофильности поверхности и появление двойных C—C связей в самом полимере говорит о том, что структура основной цепи ПВХ под действием бактерий, вероятнее всего, также претерпевает изменения. При использовании аэробных бактерий *Bacillus flexus* и *Pseudomonas citronellolis* гравиметрически было показано, что они уменьшают вес пластика примерно на 19%, однако в основном используют именно добавки к ПВХ, а не сам полимер (Giacomucci et al., 2019).

В глубинных слоях полигонов ТБО, наряду с образованием анаэробных условий, происходит повышение температуры, поэтому очень важно понимание, существуют ли потенциальные термофильные и умеренно термофильные анаэробные сообщества, способные осуществлять процесс разложения пластиковых отходов в этих условиях. Полученные нами результаты подтверждают процесс анаэробной деструкции изделий из полипропилена и поливинилхлорида, а исследованные нами консорциумы могут рассматриваться как лабораторная модель глубинных горизонтов полигонов ТБО или анаэробных зон гидросферы, где создаются сходные условия. Можно предположить, что для более глубокого анаэробного разложения отходов из ПП и ПВХ требуются более длительный период, а также дальнейшие исследования для увеличения эффективности процессов не только биодеструкции, но и биоразложения этих материалов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность д. б. н., чл.-корр. РАН Е.А. Бонч-Осмоловской за ценные замечания и комментарии при доработке статьи.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа поддержана грантом РФФИ № 19-54-18001.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Котова И.Б., Тактарова Ю.В., Цавкелова Е.А., Егорова М.А., Бубнов И.А., Малахова Д.В., Ширинкина Л.И., Соколова Т.Г., Бонч-Осмоловская, Е.А.* Микробная деградация пластика и пути ее интенсификации // *Микробиология*. 2021. Т. 90. С. 627–659.
- Kotova I.B., Taktarova Yu.V., Tsavkelova E.A., Egorova M.A., Bubnov I.A., Malakhova D.V., Shirinkina L.I., Sokolova T.G., Bonch-Osmolovskaya E.A.* Microbial degradation of plastics and approaches to make it more efficient // *Microbiology (Moscow)*. 2021. V. 90. P. 671–701.
- Плакунов В.К., Ганнесен А.В., Мартыанов С.В., Журина М.В.* Биокоррозия синтетических пластмасс: механизмы деградации и способы защиты // *Микробиология*. 2020. Т. 89. С. 631–645.
- Plakunov V.K., Gannesen A.V., Mart'yanov S.V., Zhurina M.V.* Biocorrosion of synthetic plastics: degradation mechanisms and methods of protection // *Microbiology (Moscow)*. 2020. V. 89. P. 647–659.
- Цавкелова Е.А., Егорова М.А., Петрова Е.В., Нетрусов А.И.* Образование биогаза микробными сообществами при разложении целлюлозы и пищевых отходов // *Прикл. биохимия и микробиология*. 2012. Т. 48. № 4. С. 417–424.
- Tsavkelova E.A., Egorova M.A., Petrova E.V., Netrusov A.I.* Biogas production by microbial communities via decomposition of cellulose and food waste // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2012. V. 48. P. 377–384.
- Ali M.I., Ahmed S., Robson G., Javed I., Ali N., Atiq N., Hameed A.* Isolation and molecular characterization of polyvinyl chloride (PVC) plastic degrading fungal isolates // *J. Basic Microbiol.* 2014. V. 54. P. 18–27.
- Anwar M.S., Kapri A., Chaudhry V., Mishra A., Ansari M.W., Souche Y., Nautiyal C.S., Zaidi M.G.H., Goel R.* Response of indigenously developed bacterial consortia in progressive degradation of polyvinyl chloride // *Protoplasma*. 2016. V. 253. P. 1023–1032.
- Auta H.S., Emenike C.U., Jayanthi B., Fauziah S.H.* Growth kinetics and biodeterioration of polypropylene microplastics by *Bacillus* sp. and *Rhodococcus* sp. isolated from mangrove sediment // *Mar. Poll. Bull.* 2018. V. 127. P. 15–21.
- Baran B.* Resource (in)efficiency in the EU: a case of plastic waste // *Ekonomia i Prawo. Economics and Law*. 2022. V. 21. № 1. P. 45–62.
- Callahan B.J., McMurdie P.J., Rosen M.J., Han A.W., Johnson A.J., Holmes S.P.* DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data // *Nat. Methods*. 2016. V. 13. P. 581–583.
- Geyer R., Jambeck J.R., Law K.L.* Production, use, and fate of all plastics ever made // *Sci. Adv.* 2017. V. 3. P. e1700782.
- Giacomucci L., Raddadi N., Soccio M., Lotti N., Fava F.* Polyvinyl chloride biodegradation by *Pseudomonas citronellolis* and *Bacillus flexus* // *New Biotechnol.* 2019. V. 52. P. 35–41.
- Manzoor S., Bongcam-Rudloff E., Schnürer A., Müller B.* First genome sequence of a syntrophic acetate-oxidizing bacterium, *Tepidanaerobacter acetatoxydans* strain Re1 // *Genome Announc.* 2013. V. 1. P. e00213-12.
- Matsuura N., Ohashi A., Tourlousse D.M., Sekiguchi Y.* Draft genome sequence of the syntrophic lactate-degrading bacterium *Tepidanaerobacter syntrophicus* JLT // *Genome Announc.* 2016. V. 4. P. e01712-15.
- McMurdie P.J., Holmes S.* PhyloSeq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data // *PLoS One*. 2013. V. 8. P. e61217.
- Meckenstock R.U., Boll M., Mouttaki H., Koelschbach J.S., Tarouco P.C., Weyrauch P., Dong X., Himmelberg A.M.* Anaerobic degradation of benzene and polycyclic aromatic hydrocarbons // *Microb. Physiol.* 2016. V. 26. P. 92–118.
- Mihreteab M., Stubblefield B.A., Gilbert E.S.* Microbial bioconversion of thermally depolymerized polypropylene by *Yarrowia lipolytica* for fatty acid production // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2019. V. 103. P. 7729–7740.
- Muzyer G., Stams A.* The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria // *Nat. Rev. Microbiol.* 2008. V. 6. P. 441–454.
- Mohan N., Montazer Z., Sharma P.V., Levin D.B.* Microbial and enzymatic degradation of synthetic plastics // *Front. Microbiol.* 2020. V. 11. P. 580709.
- Niu L., Song L., Liu X., Dong X.* *Tepidimicrobium xylanilyticum* sp. nov., an anaerobic xylanolytic bacterium, and emended description of the genus *Tepidimicrobium* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2009. V. 59. P. 2698–2701.
- Peravalova A.A., Kublanov I.V., Baslerov R., Zhang G., Bonch-Osmolovskaya E.A.* *Brockia lithotrophica* gen. nov., sp. nov., an anaerobic thermophilic bacterium from a terrestrial hot spring // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2013. V. 63. P. 479–483.
- Quast C., Pruesse E., Yilmaz P., Gerken J., Schweer T., Yarza P., Peplies J., Glöckner F.O.* The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools // *Nucl. Acids Res.* 2013. V. 41. P. 590–596.
- Rana A.K., Thakur M.K., Saini A.K., Mokhta S.K., Moradi O., Rydzkowski T., Alsanie W.F., Wang Q., Grammatikos S., Thakur V.K.* Recent developments in microbial degradation of polypropylene: integrated approaches towards a sustainable environment // *Sci. Total Environ.* 2022. V. 826. P. 154056.
- Ru J., Huo Y., Yang Y.* Microbial degradation and valorization of plastic wastes // *Front. Microbiol.* 2020. V. 11. P. 442.
- Sekiguchi Y., Imachi H., Susilorukmi A., Muramatsu M., Ohashi A., Harada H., Hanada S., Kamagata Y.* *Tepidanaerobacter syntrophicus* gen. nov. sp. nov., an anaerobic, mod-

erately thermophilic, syntrophic alcohol- and lactate-degrading bacterium isolated from thermophilic digested sludges // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2006. V. 56. P. 1621–1629.

Skariyachan S., Patil A.A., Shankar A., Manjunath M., Bachappanavar N., Kiran S. Enhanced polymer degradation of polyethylene and polypropylene by novel thermophilic consortia of *Brevibacillus* sps. and *Aneurinibacillus* sp. screened from waste management landfills and sewage treatment plants // *Polym. Degrad. Stab.* 2018. V. 149. P. 52–68.

Slobodkin A.I., Tourova T.P., Kostrikina N.A., Lysenko A.M., German K.E., Bonch-Osmolovskaya E.A., Birkeland N.K. *Tepidimicrobium ferriphilum* gen. nov., sp. nov., a novel moderately thermophilic, Fe(III)-reducing bacterium of the order *Clostridiales* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2006. V. 56. P. 369–372.

Trüper H.G., Schlegel H.G. Sulphur metabolism in *Thiorhodaceae* I. Quantitative measurements on growing cells of

Chromatium okenii // Antonie van Leeuwenhoek. 1964. V. 30. P. 225–238.

Tsavkelova E., Prokudina L., Egorova M., Leontieva M., Malakhova D., Netrusov A. The structure of the anaerobic thermophilic microbial community for the bioconversion of the cellulose-containing substrates into biogas // *Process Biochem.* 2018. V. 66. P. 183–196.

Vortsepneva E., Chevaldonné P., Klyukina A., Naduvaeva E., Todt C., Zhadan A., Tzetlin A., Kublanov I. Microbial associations of shallow-water Mediterranean marine cave *Sole-nogastres* (Mollusca) // *Peer J.* 2021. V. 9. e12655.

Wang Q., Garrity G.M., Tiedje J.M., Cole J.R. Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy // *Appl. Environ. Microbiol.* 2007. V. 73. P. 5261–5267.

Watanabe M., Kojima H., Fukui M. Review of *Desulfotomaculum* species and proposal of the genera *Desulfallas* gen. nov., *Desulfofundulus* gen. nov., *Desulfofarcimen* gen. nov. and *Desulfohalotomaculum* gen. nov. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2018. V. 68. P. 2891–2899.

Microbial Destruction of Polypropylene and Polyvinylchloride Samples under the Anaerobic Conditions

D. V. Malakhova¹, M. A. Egorova¹, M. R. Leontieva¹, A. G. Elcheninov², T. V. Panova³, Yu. D. Aleksandrov⁴, and E. A. Tsavkelova^{1, *}

¹Department of Microbiology, Biological Faculty, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119234 Russia

²Federal Research Centre “Fundamentals of Biotechnology,” Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

³Department of Polymer Science, Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

⁴Department of Colloid Chemistry, Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: tsavkelova@mail.ru

Received July 24, 2022; revised September 3, 2022; September 15, 2022

Abstract—The most advantageous characteristic of the materials made of synthetic polymers, such as their resistance to biodegradation, is simultaneously the reason for their accumulation and environmental pollution. Nevertheless, some type of plastics under aerobic conditions undergo slow microbial degradation, however, there is lack of information on the anaerobic degradation of plastics. In this work, we studied the growth of anaerobic moderately thermophilic (55°C) consortiums in the presence of samples made of polypropylene (PP) and polyvinyl chloride (PVC). It was shown that the microbial biomass increased compared to the control, as well as anaerobic decomposition products (CO₂, H₂, and H₂S) were detected, and the total weight of the plastics decreased by 4.4% (PP) and 6.5% (PVC) compared to the control. Bacterial cells adhere and form colonies and biofilms on the surface of the plastic materials. An analysis of the composition of microbial communities showed an increased number of anaerobic hydrolytics of the genus *Tepidimicrobium*, potential syntrophic bacteria of the genus *Tepidanaerobacter*, and especially sulfate-reducing bacteria (*Desulfohalotomaculum*). With help of differential scanning calorimetry and Fourier spectroscopy it was revealed that the decrease in the mass of plastic mainly occurred due to the hydrolysis of additives (plasticizers). The role of such microbial communities in the aquatic environment and anaerobic layers of the municipal solid waste landfills, where PP and PVC plastics can be destructed under the elevated temperatures of anaerobic conditions, is discussed.

Keywords: anaerobic thermophilic microbial community, plastic waste, polyvinyl chloride (PVC), polypropylene (PP), sulfate reduction, *Desulfohalotomaculum*

**КРАТКИЕ
СООБЩЕНИЯ**

ГЕНЫ, КОДИРУЮЩИЕ НАД⁺-ЗАВИСИМЫЕ ФОРМИАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ, В ТАКСОНОМИИ АЭРОБНЫХ МЕТИЛОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ РОДА *ANCYLOBACTER*

© 2023 г. А. А. Чемодурова^а, А. С. Решетников^а, Н. В. Агафонова^а, Н. В. Доронина^{а, *}

^аФИЦ “Пушкинский научный центр биологических исследований РАН” Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН, Московская обл., Пушкино, 142290 Россия

*e-mail: doronina@ibpm.pushchino.ru

Поступила в редакцию 29.04.2022 г.

После доработки 29.05.2022 г.

Принята к публикации 30.05.2022 г.

Проведен сравнительный филогенетический анализ генов НАД⁺-зависимых формиатдегидрогеназ (НАД⁺-ФДГ), которые обнаружены во всех доступных геномах метилотрофов родов *Ancylobacter*, *Starkeya* и *Angulomicrobium*, а также у других бактерий семейства *Xanthobacteraceae* (*Xanthobacter*, *Aquabacter*, *Azorhizobium*). Отмечено, что расположение представителей *Xanthobacteraceae* на дереве, построенном на основании сравнения аминокислотных последовательностей НАД⁺-ФДГ, коррелирует с филогенией по гену 16S рРНК. Выявлено, что последовательности белка НАД⁺-ФДГ родов *Ancylobacter*, *Starkeya* и *Angulomicrobium* имеют уровень идентичности 87.8–98.3%, что свидетельствует о высокой консервативности этого белка в пределах данной группы метилотрофов. Впервые анализ функциональных генов НАД⁺-ФДГ рекомендован в качестве дополнительного критерия для межвидовой дифференциации метилотрофных бактерий рода *Ancylobacter*.

Ключевые слова: метилотрофы, *Ancylobacter*, семейство *Xanthobacteraceae*, НАД⁺-зависимые формиатдегидрогеназы

DOI: 10.31857/S002636562260047X, **EDN:** NOFTGB

НАД⁺-зависимые формиатдегидрогеназы (НАД⁺-ФДГ) обнаружены у бактерий, дрожжей, грибов, растений и позвоночных (Alekseeva et al., 2011). У растений, патогенных бактерий и грибов этот фермент является стрессовым белком, у аэробных метилотрофных бактерий (метилотрофов) и дрожжей играет ключевую роль в снабжении клеток энергией (Natrongjit, Packdibamrung, 2010; Alekseeva et al., 2011). Окисление формиата до СО₂, сопряженное восстановлением НАД⁺ до НАДН, катализируется НАД⁺-ФДГ и является завершающей стадией цепи реакций прямого С₁-окисления у метилотрофов. НАД⁺-ФДГ относится к надсемейству D-специфических дегидрогеназ 2-оксикислот, имеет гомодимерную структуру, не содержит в активном центре простетических групп и ионов металлов (Shabalin et al., 2010). Данный фермент распространен у метилотрофов с рибулозобисфосфатным путем С₁-ассимиляции (Троценко с соавт., 2010). Типичным примером являются представители рода *Ancylobacter* (семейство *Xanthobacteraceae*, порядок *Huyphomicrobiales*), выделяемые из водной среды, донных осадков, активных илов, почвы и растений. В настоящее время род включает 11 валидно описанных видов

(<https://lpsn.dsmz.de/genus/ancylobacter>), очень близких по физиолого-биохимическим, хемотаксономическим свойствам и последовательностям генов 16S рРНК, поэтому актуален поиск новых генетических маркеров, позволяющих осуществить быструю дифференциацию представителей данного рода без привлечения геномного анализа. Известно, что аминокислотные последовательности НАД⁺-ФДГ довольно консервативны и уровень их сходства у разных организмов составляет ~50%, а у растений эти ферменты имеют до 80% идентичности (Natrongjit, Packdibamrung, 2010; Alekseeva et al., 2011). Ранее фермент НАД⁺-ФДГ исследовали только у одного представителя рода *Ancylobacter* – *A. aquaticus* KNK607M (Nanba et al., 2010), но значение соответствующего функционального гена в таксономии бактерий не рассматривалось.

Цель данной работы – оценка эффективности использования сравнительного анализа последовательностей генов НАД⁺-ФДГ в таксономии метилотрофных бактерий рода *Ancylobacter*.

В работе использовали новые метилотрофные изоляты штаммы *Ancylobacter* sp. VT, *Starkeya* sp. 3C и 1A, выделенные ранее авторами данной работы, а также ближайший родственник штаммов

3С и 1А – штамм *Starkeya* sp. HF14-78462, геном которого найден в базе данных NCBI GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (CACAS000000000). Поиск последовательностей генов 16S рРНК, белков НАД⁺–ФДГ и геномов проводили в базах данных NCBI GenBank и JGI (<https://img.jgi.doe.gov/>), филогенетический анализ осуществляли с помощью пакетов программ BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), ClustalW (Thompson et al., 1997) и MEGA5 (метод neighbor-joining) (Tamura et al., 2011), надежность построенных деревьев проверена значением “bootstrap” для 1000 деревьев. Средние значения идентичности нуклеотидов (ANI) и ДНК–ДНК гибридизации *in silico* (dDDH) рассчитывали с использованием программ Species 1.2.1 (Richter, Rosselló-Móra, 2009) и GGDC 2.1 (<https://ggdc.dsmz.de/ggdc.php>) (Meier-Kolthoff et al., 2013) соответственно. Амплификацию и секвенирование гена НАД⁺–ФДГ для штамма 1А проводили с использованием “вырожденных” праймеров, разработанных на консервативные аминокислотные участки НАД⁺–ФДГ. Анализ доступных аминокислотных последовательностей фермента НАД⁺–ФДГ из *A. aquaticus*, *Starkeya* sp. 3С и ряда других гомологичных ФДГ ферментов из NCBI GenBank позволил выделить две консервативные аминокислотные области, на основе которых составлена пара “вырожденных” праймеров *fmd* (F2-*vir*); TGCGTTCTYTACGAY-GAYCC и *fmd* (R-*vir*); TCTTCCGARCCGC-CAGTSGCRTT. Амплифицирован участок гена 1170 п.н., кодирующий фермент НАД⁺–ФДГ из метилотрофного изолята штамма 1А. Секвенирование и анализ полученного фрагмента выявил 99.9% идентичности аминокислотной последовательности с ферментом НАД⁺–ФДГ из *Starkeya* sp. 3С.

Гены НАД⁺–ФДГ выявлены нами у некоторых представителей семейства *Xanthobacteraceae* – родов *Xanthobacter*, *Aquabacter*, *Azorhizobium*, а также во всех доступных геномах метилотрофных бактерий родов *Ancylobacter*, *Starkeya* и *Angulomicrobium*. Установлено, что распределение представителей *Xanthobacteraceae* на дереве, построенном на основании сравнения аминокислотных последовательностей НАД⁺–ФДГ, коррелирует с филогенией по гену 16S рРНК (рис. 1). При этом выявлено несколько кластеров на дереве, построенном по результатам сравнительного анализа последовательностей белков НАД⁺–ФДГ, объединяющих представителей семейства *Xanthobacteraceae*: (1) группа *Ancylobacter*, *Starkeya* и *Angulomicrobium*; (2) группа *Xanthobacter*; (3) группа *Aquabacter* и *Azorhizobium*.

В группе (1) сходство между видами на основании сравнения нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК составляет 96.2–98.5%, а аминокислотные последовательности белка НАД⁺–ФДГ проявляют уровень межвидовой идентичности

87.8–98.3% (табл. 1), что свидетельствует о высокой консервативности белка НАД⁺–ФДГ у представителей родов *Ancylobacter*, *Starkeya* и *Angulomicrobium*. Поиск ближайших родственников *Ancylobacter* по сходству НАД⁺–ФДГ выявил также метилотрофа *Pseudomonas* sp. 101 (91.3–92.8%) (Filipova et al., 2006), НАД⁺–ФДГ которого является одной из самых изученных ФДГ среди бактерий (Alekseeva et al., 2011). По всей видимости, данный штамм также является представителем *Starkeya* или *Ancylobacter*, однако идентификация, проведенная в 1970-х гг. (коллекция кафедры микробиологии Московского государственного университета) (Egorov et al., 1979), устарела и требует пересмотра.

Интересно, что претенденты на новые виды новые изоляты штаммы 3С, 1А, HF14-78462 (~99.9–100% сходства по гену 16S рРНК) и штамм VT также хорошо дифференцируются на видовом уровне по генам НАД⁺–ФДГ, что коррелирует с их филогенетическим положением по гену 16S рРНК (рис. 1). Анализ геномов штаммов 3С (VMBP000000000) и VT (JAHNCQH000000000) подтверждает принадлежность этих микроорганизмов к новым видам, поскольку значение сходства по генам 16S рРНК, уровень ANI и dDDH составило, соответственно: 99.3–99.4, 86.4 и 28.3% между штаммом 3С и *S. novella* DSM 506^T, и 98.3–98.5, 78.0–80.6 и 22.1–24.0% между штаммом VT и ближайшими представителями рода *Ancylobacter*, что ниже пороговых значений, принятых для разделения видов (ANI = 95%, dDDH = 70%) (Richter et al., 2009; Chun et al., 2018).

Таким образом, показано, что топология филогенетического дерева по белку НАД⁺–ФДГ коррелирует с таксономическим положением представителей рода *Ancylobacter* и семейства *Xanthobacteraceae*, проведенным на основании сравнения последовательностей генов 16S рРНК. Анализ этих достаточно консервативных функциональных генов может быть рекомендован в качестве дополнительного критерия для межвидовой дифференциации прежде всего бактерий рода *Ancylobacter*.

Предложение использовать функциональные гены ферментов, вовлеченных в метаболизм метилотрофов, не является уникальным. Известно, что у метилотрофов ген *mxaF* (кодирует большую субъединицу метанолдегидрогеназы) высоко консервативен и используется в качестве функционального гена для их идентификации в различных средах обитания (McDonald, Murrell, 1997). Также в качестве молекулярных проб применяют гены *hoxF* (Ramachandran, Walsh, 2015; Taubert et al., 2015), но известные последовательности филогенетически разнообразны, делятся на пять групп (HoxF1–5) (Chistoserdova, 2011), а их идентичность в пределах одной группы ~65–70%



Рис. 1. а – филогенетическое положение представителей семейства Xanthobacteraceae на основании сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК; б – филогенетическое положение представителей рода Ancylobacter среди ближайших родственников, основанное на сравнении аминокислотных последовательностей белка НАД⁺-ФДЛ.

Таблица 1. Уровни сходства представителей рода *Ancylobacter* с ближайшими родственниками на основании сравнения нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК и аминокислотных последовательностей белка НАД⁺–ФДГ, н.д. — нет данных

		<i>Ancylobacter</i>	
		16S рРНК, %	НАД ⁺ –ФДГ, %
<i>Xanthobacteraceae</i>	<i>Ancylobacter</i>	96.8–98.5	89.0–98.3
	<i>Starkeya</i>	97.0–98.0	90.3–96.8
	<i>Angulomicrobium</i>	96.2–97.7	87.8–96.0
	<i>Xanthobacter</i>	92.1–94.7	87.3–94.8
	<i>Azorhizobium</i>	92.9–94.5	84.3–87.5
	<i>Aquabacter</i>	92.9–94.6	84.0–85.8
	<i>Pseudomonas</i> sp. 101	н.д.	91.3–92.8
	<i>Methylocella silvestris</i> BL2 ^T	90.2–91.3	89.0–90.0
	<i>Rhizobium leguminosarum</i> Vaf10	90.6–91.6	84.7–86.7

(Keltjens et al., 2014). Анализ аминокислотных последовательностей белка НАД⁺–ФДГ представителей *Xanthobacteraceae* выявил уровень идентичности в пределах семейства 84.0–98.3%, а среди ближайших родственников обнаружены только *Methylocella silvestris* BL2^T (89–90%) и *Rhizobium leguminosarum* Vaf10 (84.7–86.7%), однако на дереве они держатся обособленно (табл. 1, рис. 1). Кроме того, представители родов *Angulomicrobium* и *Starkeya* по исследуемым генам НАД⁺–ФДГ образуют единый кластер с представителями *Ancylobacter*, что согласуется с результатами секвенирования генов 16S рРНК и демонстрирует высокое родство представителей этих трех родов. Таким образом, впервые предложено использовать НАД⁺–ФДГ в качестве функционального маркерного гена для дальнейшего поиска и идентификации метилотрофов рода *Ancylobacter*, обнаруживаемых в различных местах обитания.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (грант № 075-15-2021-1051).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них отсутствует конфликт интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Все авторы анализировали и обсуждали данные, и участвовали в подготовке статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Троценко Ю.А., Доронина Н.В., Торгонская М.Л. Аэробные метилобактерии. Пушкино: ОНТИ ПНЦ РАН, 2010. 325 с.
- Trotsenko Y.A., Doronina N.V., Torgonskaya M.L. Aerobic Methylobacteria. Pushchino: ONTI PSC RAS, 2010. 325 p.
- Alekseeva A.A., Savin S.S., Tishkov V.I. NAD⁺-dependent formate dehydrogenase from plants // Acta Naturae. 2011. V. 3. № 4(11). P. 38–54.
- Chistoserdova L. Modularity of methylotrophy, revisited // Environ. Microbiol. 2011. V. 13. P. 2603–2622.
- Chun J., Oren A., Ventosa A., Christensen H., Arahal D.R., da Costa M.S., Rooney A.P., Yi H., Xu X.-W., De Meyer S., Trujillo M.E. Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2018. V. 68. P. 461–466.
- Egorov A.M., Avilova T.V., Dikov M.M., Popov V.O., Rodionov Y.V., Berezin I.V. NAD-dependent formate dehydrogenase from methylotrophic bacterium, strain 1: purification and characterization // Eur. J. Biochem. 1979. V. 99. P. 569–576.
- Filippova E.V., Filippova E.V., Polyakov K.M., Tikhonova T.V., Boiko K.M., Tishkov V.I., Popov V.O. Crystal structures of complexes of NAD⁺-dependent formate dehydrogenase from methylotrophic bacterium *Pseudomonas* sp. 101 with formate // Crystallography Reports. 2006. V. 51. № 4. P. 627–631.
- Hatrongjit R., Packdibamrung K. A novel NADP⁺-dependent formate dehydrogenase from *Burkholderia stabilis* 15516: screening, purification and characterization // Enzyme and Microbial Technology. 2010. V. 46. № 7. P. 557–561.
- Keltjens J.T., Pol A., Reimann J., Op den Camp H.J. PQQ-dependent methanol dehydrogenases: rare earth elements make a difference // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2014. V. 98. P. 6163–6183.

McDonald I.R., Murrell J.C. The methanol dehydrogenase structural gene *mxhF* and its use as a functional gene probe for methanotrophs and methylotrophs // *Appl. Environ. Microbiol.* 1997. V. 63. P. 3218–3224.

Meier-Kolthoff J.P., Auch A.F., Klenk H.-P., Göker M. Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions // *BMC Bioinformatics.* 2013. V. 14. P. 1–14.

Nanba H., Takaoka Y., Hasegawa J. Purification and characterization of formate dehydrogenase from *Ancylobacter aquaticus* strain KNK607M, and cloning of the gene // *Bio-science, Biotechnology, and Biochemistry.* 2003. V. 67. № 4. P. 720–728.

Ramachandran A., Walsch D.A. Investigation of XoxF methanol dehydrogenases reveals new methylotrophic bacteria in pelagic marine and freshwater ecosystems // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2015. V. 91. P. fiv105.

Richter M., Rosselló-Móra R. Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009. V. 106. P. 19126–19131.

Shabalin I.G., Serov A.E., Skirgello O.E., Timofeev V.I., Samygina V.R., Popov V.O., Tishkov V.I., Kuranova I.P. Recombinant formate dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana*: preparation, crystal growth in microgravity, and preliminary X-ray diffraction study // *Crystallography Reports.* 2010. V. 55. № 5. P. 806–810.

Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods // *Mol. Biol. Evol.* 2011. V. 28. P. 2731–2739.

Taubert M., Grob C., Howat A.M., Burns O.J., Dixon J.L., Chen Y., Murrell J.C. XoxF encoding an alternative methanol dehydrogenase is widespread in coastal marine environments // *Environ. Microbiol.* 2015. V. 17. P. 3937–3948.

Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D.G. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools // *Nucleic Acids Res.* 1997. V. 25. P. 4876–4882.

Genes of NAD⁺-Dependent Formate Dehydrogenases in Taxonomy of Aerobic Methylotrophic Bacteria of the Genus *Ancylobacter*

A. A. Chemodurova¹, A. S. Reshetnikov¹, N. V. Agafonova¹, and N. V. Doronina¹, *

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

*e-mail: doronina@ibpm.pushchino.ru

Received April 29, 2022; revised May 29, 2022; accepted May 30, 2022

Abstract—Comparative phylogenetic analysis of NAD⁺-dependent formate dehydrogenases (NAD⁺-FDH) genes, which have been detected in all available genomes of methylotrophs of the genera *Ancylobacter*, *Starkeya* and *Angulomicrobium*, as well as in other members of the family *Xanthobacteraceae* (*Xanthobacter*, *Aquabacter*, *Azorhizobium*), was carried out. The position of *Xanthobacteraceae* on the tree constructed based on comparison of NAD⁺-FDH amino acid sequences was found to correlate with the 16S rRNA gene-based phylogeny. The sequences of the NAD⁺-FDH proteins of the genera *Ancylobacter*, *Starkeya*, and *Angulomicrobium* exhibited 87.8–98.3% identity, indicating that this protein is very conservative within this group of methylotrophs. For the first time, analysis of the NAD⁺-FDH functional genes is recommended as a supplementary criterion for interspecies differentiation between methylotrophic bacteria of the genus *Ancylobacter*.

Keywords: methylotrophs, *Ancylobacter*, family *Xanthobacteraceae*, NAD⁺-dependent formate dehydrogenases

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ ТОМА 91, 2022 г.

DOI: 10.31857/S0026365622600675, EDN: NONYXH

- Аверина С.Г. см. Пиневи́ч А.В.
Акимова Е.С. см. Баймиев Ан.Х.
Акимова Е.С. см. Чубукова О.В.
Акмуханова Н.Р., Заядан Б.К., Садвакасова А.К., Тореханова М.М., Тимофеев Н.П., Бауенова М.О., Тодоренко Д.А., Маторин Д.Н. Подбор перспективного штамма микроводорослей для биоремедиации сточных вод аквакультуры, № 5, 576–585.
Актуганов Г.Э. см. Кузьмина Л.Ю.
Амузегар М.А. см. Раисния Н.
Амузегар М.А. см. Ширсалимиан М.С.
Арефян Е. см. Раисния Н.
Аринбасарова А.Ю. см. Бирюкова Е.Н.
Арискина Е.В. см. Потехина Н.В., № 3, 312–320.
Арискина Е.В. см. Потехина Н.В., № 5, 547–553.
Архипова Т.Н. см. Кузьмина Л.Ю.
Баймиев Ал.Х. см. Баймиев Ан.Х.
Баймиев Ан.Х., Акимова Е.С., Коряков И.С., Владимиров А.А., Баймиев Ал.Х. Зависимость состава клубеньковых бактерий лядвенца рогатого (*Lotus corniculatus*) от стадии вегетации растения-хозяина, № 5, 586–596.
Баруах М. см. Хазарика Д.Дж.
Батаева Д.С. см. Николаев Ю.А.
Бауенова М.О. см. Акмуханова Н.Р.
Бегматов Ш.А. см. Дедыш С.Н.
Бегматов Ш.А. см. Пименов Н.В., № 2, 160–170.
Бегматов Ш.А. см. Пименов Н.В., № 4, 410–418.
Белевич Т.А., Милютин И.А. Видовое разнообразие фототрофного пикопланктона морей Карского и Лаптевых, № 1, 75–85.
Беленкова В.В. см. Саввичев А.С.
Белецкий А.В. см. Дедыш С.Н.
Белецкий А.В. см. Саввичев А.С.
Белькова Н.Л. см. Федоров Р.А.
Берестовская Ю.Ю. см. Пелевина А.В.
Берестовская Ю.Ю. см. Пименов Н.В.
Бикташева Л.Р. см. Муратова А.Ю.
Бирюкова Е.Н., Аринбасарова А.Ю., Меленцев А.Г. L-Лактатоксидазные системы микроорганизмов, № 2, 150–159.
Богданов К.И. см. Журина М.В.
Бойкова Ю.В. см. Ефименко Т.А.
Болтянская Ю.В. см. Деткова Е.Н.
Боро Р.С. см. Хазарика Д.Дж.
Бочкова Е.А. см. Дювенжи Е.В.
Брюханов А.Л., Климко А.И., Нетрусов А.И. Антиоксидантные свойства молочнокислых бактерий, № 5, 519–536.
Будённая А.С. см. Тактарова Ю.В.
Бут С.Ю. см. Хмеленина В.Н.
Быкова Я.Е. см. Максимова Ю.Г.
Вантеева А.В. см. Пименов Н.В.
Васильева Б.Ф. см. Ефименко Т.А.
Вершинина З.Р. см. Чубукова О.В.
Веслополова Е.Ф. см. Саввичев А.С.
Владимирова А.А. см. Баймиев Ан.Х.
Волохина И.В. см. Мокеев Д.И.
Воронов Д.А. см. Саввичев А.С.
Гаврилов С.Н., Потапов Е.Г., Прокофьева М.И., Клюкина А.А., Меркель А.Ю., Маслов А.А., Заварзина Д.Г. Разнообразие новых некультивируемых прокариот в микробных сообществах минеральных подземных вод Ессентукского месторождения, № 1, 32–49.
Гаврилов С.Н. см. Заварзина Д.Г.
Галев Э.Е. см. Летаров А.В.
Галимзянова Н.Ф. см. Кузьмина Л.Ю.
Галицкая П.Ю. см. Муратова А.Ю.
Ганина В.И. см. Шаненко Е.Ф.
Ганнесен А.В. см. Дювенжи Е.В.
Ганнесен А.В. см. Журина М.В.
Ганнесен А.В. см. Панкратов Т.А.
Гаутом Т. см. Хазарика Д.Дж.
Гильванова Е.А. см. Кузьмина Л.Ю.
Гладченко М.А. см. Тактарова Ю.В.
Глухова А.А. см. Ефименко Т.А.
Голубев В.И. Микоцинотипирование некоторых “самостоятельных” видов рода *Candida*, № 6, 769–771.
Голубев С.Н. см. Муратова А.Ю.
Горбунов М.Ю., Хлопко Ю.А., Катаев В.Я., Уманская М.В. Разнообразие бактерий прикрепленных сообществ холодного высокосульфидного водоема Европейской части России, № 1, 86–101.
Горленко В.М. см. Саввичев А.С.
Госвами Г. см. Хазарика Д.Дж.

- Грачев В.А. см. Пелевина А.В.
 Грачёв В.А. см. Пименов Н.В., № 2, 160–170.
 Грачёв В.А. см. Пименов Н.В., № 4, 410–418.
 Григорьева Н.В. см. Пименов Н.В.
 Григорьева Н.В. см. Шаненко Е.Ф.
 Гринев В.С. см. Мокеев Д.И.
 Гришко В.В. см. Иванова К.М.
 Груздев Д.С. см. Турова Т.П.
 Груздев Е.В. см. Пелевина А.В.
 Груздев Е.В. см. Пименов Н.В., № 2, 160–170.
 Груздев Е.В. см. Пименов Н.В., № 4, 410–418.
 Гуринович А.С., Титок М.А. Молекулярно-генетический и функциональный анализ системы конъюгации плазмиды рBS72 природных бактерий *Bacillus subtilis*, № 4, 451–465.
 Дедыш С.Н., Иванова А.А., Бегматов Ш.А., Белецкий А.В., Ракитин А.Л., Марданов А.В., Филиппов Д.А., Равин Н.В. Ацидобактерии в низинных болотах: филогенетическое разнообразие и анализ геномов ключевых представителей, № 6, 685–694.
 Дедыш С.Н. см. Наумов Д.Г.
 Дедыш С.Н. см. Хмеленина В.Н.
 Демиденко Н.А. см. Саввичев А.С.
 Демкина Е.В., Зайко Е.В., Батаева Д.С., Насыров Н.А., Юшина Ю.К. Сравнительное исследование состава и структуры микробных биопленок эконитов мясоперерабатывающих комбинатов, различающихся источниками сырья, № 5, 613–630.
 Демкина Е.В. см. Николаев Ю.А.
 Демьянкова М.В. см. Ефименко Т.А.
 Деткова Е.Н., Болтянская Ю.В., Кевбрин В.В. Деградация глицинбетаина в реакции стекленда галоалкалофильной бактерией *Halonatronomonas betaini*, выделенной из содового озера Танатар III, № 6, 720–725.
 Дин Фань, Стоянова Л.Г., Нетрусов А.И. Микробиом и метабиотические свойства кефирных зерен и кефира на их основе, № 4, 391–409.
 Донова М.В. см. Текучева Д.Н.
 Дорофеев А.Г. см. Пелевина А.В.
 Дорофеев А.Г. см. Пименов Н.В., № 2, 160–170.
 Дорофеев А.Г. см. Пименов Н.В., № 4, 410–418.
 Дубровская Е.В. см. Муратова А.Ю.
 Дювенжи Е.В., Невалина Е.Д., Мартыанов С.В., Журина М.В., Калмантаева О.В., Макарова М.А., Бочкова Е.А., Фирстова В.В., Плакунов В.К., Ганнесен А.В. Бинарные биопленки *Staphylococcus aureus* 209Р и *Kytococcus schroeteri* H01: дуалистическая роль китококков и изменения клеточной адгезии в присутствии натрийуретического пептида А-типа, № 5, 597–612.
 Евстигнеева С.С. см. Мокеев Д.И.
 Евтушенко Л.И. см. Потехина Н.В., № 3, 312–320.
 Евтушенко Л.И. см. Потехина Н.В., № 5, 547–553.
 Ельченинов А.Г. см. Кочеткова Т.В.
 Ершов А.П. см. Турова Т.П.
 Ефименко Т.А., Якушев А.В., Карабанова А.А., Глухова А.А., Демьянкова М.В., Васильева Б.Ф., Бойкова Ю.В., Малкина Н.Д., Терехова Л.П., Ефременкова О.В. Антимикробная активность бактерий, выделенных из многоножек *Nedyopus dawydoffiae* и *Orthomorpha* sp., № 6, 749–762.
 Ефременкова О.В. см. Ефименко Т.А.
 Журина М.В., Богданов К.И., Ганнесен А.В., Мартыанов С.В., Плакунов В.К. Микропластики – новая экологическая ниша в пластисфере для мультитиповых микробных биопленок, № 2, 131–149.
 Журина М.В. см. Дювенжи Е.В.
 Журина М.В. см. Николаев Ю.А.
 Заварзина Д.Г., Прокофьева М.И., Пихтерева В.А., Клюкина А.А., Маслов А.А., Меркель А.Ю., Гаврилов С.Н. *Deferrivibrio essentukiensis* sp. nov., gen. nov. – представитель нового семейства *Deferrivibrionaceae* Fam. Nov., выделенный из глубинного подземного водоносного горизонта Кавказских минеральных вод, № 2, 171–190.
 Заварзина Д.Г. см. Гаврилов С.Н.
 Зайко Е.В. см. Николаев Ю.А.
 Захаревич А.М. см. Муратова А.Ю.
 Заядан Б.К. см. Акмуханова Н.Р.
 Зорина А.С. см. Максимова Ю.Г.
 Иванова К.М., Гришко В.В., Ившина И.Б. Высокоэффективная биодеструкция экотоксичной дегидроабетиновой кислоты нерастущими клетками *Rhodococcus rhodochrous* ИЭГМ 107, № 4, 419–432.
 Иванова А.А. см. Дедыш С.Н.
 Ивановский Р.Н., Лебедева Н.В., Турова Т.П. Новый взгляд на механизм автотрофной ассимиляции CO₂ у зеленых серных бактерий, № 3, 274–284.
 Иванушкина Н.Е. см. Кочкина Г.А.
 Ившина И.Б. см. Иванова К.М.
 Кадников В.В. см. Саввичев А.С.
 Какоти М. см. Хазарика Д.Дж.
 Калита Р. см. Хазарика Д.Дж.
 Каллистова А.Ю. см. Пелевина А.В.
 Каллистова А.Ю. см. Пименов Н.В., № 2, 160–170.
 Каллистова А.Ю. см. Пименов Н.В., № 4, 410–418.
 Калмантаева О.В. см. Дювенжи Е.В.
 Канапацкий Т.А. см. Пименов Н.В.
 Карабанова А.А. см. Ефименко Т.А.
 Карпов М.В. см. Текучева Д.Н.
 Катаев В.Я. см. Горбунов М.Ю.
 Качалкин А.В. Филогения и реклассификация *Rhodotorula pinalis* как *Fellozyma pinalis* comb. nov., № 4, 475–479.

- Кевбрин В.В. см. Деткова Е.Н.
 Киреев Д.М. см. Турова Т.П.
 Киселева И.В., Холomeйдик А.Н., Щапова Л.Н., Панасенко А.Е. Влияние фторидных соединений сурьмы на почвенную микрофлору и методы их детоксикации, № 6, 763–768.
 Климко А.И. см. Брюханов А.Л.
 Клоки М. см. Летаров А.В.
 Клюкина А.А. см. Гаврилов С.Н.
 Клюкина А.А. см. Заварзина Д.Г.
 Козяева В.В. см. Саввичев А.С.
 Коробов В.П., Лемкина Л.М., Полюдова Т.В. Механизм антибактериального действия лантибиотика варнерина, № 2, 217–225.
 Корягина А.О., Османова Ф.Р., Тойменцева А.А., Лайков А.В., Шарипова М.Р. Количественный анализ сериновых протеиназ *Bacillus pumilus* у рекомбинантных штаммов бацилл, № 2, 234–242.
 Коряков И.С. см. Баймиев Ан.Х.
 Котова И.Б. см. Тактарова Ю.В.
 Кочеткова Т.В., Подосокорская О.А., Ельченинов А.Г., Кубланов И.В. Разнообразие термофильных прокариот в природных горячих источниках Российской Федерации, № 1, 3–31.
 Кочкина Г.А., Иванушкина Н.Е., Пинчук И.П., Озерская С.М. Эндوفитные грибы *Pezizula radicola* в клубеньках актиноридных растений, № 6, 742–748.
 Кравченко И.К., Сизов Л.Р., Тихонова Е.Н., Лысак Л.В. Влияние лантана на состав метанотрофного сообщества дерново-подзолистой почвы, № 5, 638–643.
 Краснова Е.Д. см. Саввичев А.С.
 Кубланов И.В. см. Кочеткова Т.В.
 Кудоярова Г.Р. см. Кузьмина Л.Ю.
 Кузьмина Л.Ю., Гильванова Е.А., Галимзянова Н.Ф., Архипова Т.Н., Рябова А.С., Актуганов Г.Э., Сидорова Л.В., Кудоярова Г.Р., Мелентьев А.И. Характеристика нового ростостимулирующего штамма *Advenella kashmirensis* IB-K1 и оценка эффективности его применения в условиях засоления почвы, № 2, 204–216.
 Кулакова А.А. см. Саввичев А.С.
 Куликов Е.Е. см. Летаров А.В.
 Куликовский М.С. см. Мальцева С.Ю.
 Куличевская И.С. см. Наумов Д.Г.
 Лазар Адлер Н. см. Летаров А.В.
 Лайков А.В. см. Корягина А.О.
 Лаптев А.Б. см. Турова Т.П.
 Лаптева Н.А. см. Федоров Р.А.
 Лебедева Н.В. см. Ивановский Р.Н.
 Лемкина Л.М. см. Коробов В.П.
 Летаров А.В., Летарова М.А., Лазар Адлер Н., Куликов Е.Е., Клоки М., Морозов А.Ю., Галев Э.Е. Влияние химических факторов на естественный биоконтроль популяций возбудителя мелиоидоза *amr1*-подобными бактериофагами в агроэкосистемах, № 2, 226–233.
 Летарова М.А. см. Летаров А.В.
 Летарова М.А. см. Саввичев А.С.
 Литти Ю.В. см. Пименов Н.В.
 Лойко Н.Г. см. Эль-Регистан Г.И.
 Лысак Л.В. см. Кравченко И.К.
 Любунь Е.В. см. Муратова А.Ю.
 Лютова Л.В., Наумов Г.И., Шнырева А.В., Наумова Е.С. Внутривидовой полиморфизм дрожжей *Kluyveromyces lactis*: генетические популяции, № 4, 480–491.
 Мазиди, С.М. см. Ширсалимиан М.С.
 Макарова М.А. см. Дювенжи Е.В.
 Максимова Ю.Г., Быкова Я.Е., Зорина А.С., Никулин С.М., Максимов А.Ю. Влияние немодифицированных многостенных углеродных нанотрубок на формирование и разрушение бактериальных биопленок, № 4, 507–516.
 Максимов А.Ю. см. Максимова Ю.Г.
 Максимов Г.В. см. Пелевина А.В.
 Малкина Н.Д. см. Ефименко Т.А.
 Мальцева С.Ю., Куликовский М.С., Мальцев Е.И. Функциональное состояние *Coelastrella multistriata* (*Sphaeropleales*, *Chlorophyta*)
 Мальцев Е.И. см. Мальцева С.Ю.
 Марданов А.В. см. Дедыш С.Н.
 Марданов А.В. см. Пелевина А.В.
 Марданов А.В. см. Пименов Н.В., № 2, 160–170.
 Марданов А.В. см. Пименов Н.В., № 4, 410–418.
 Мартьянов С.В. см. Дювенжи Е.В.
 Мартьянов С.В. см. Журина М.В.
 Маслов А.А. см. Гаврилов С.Н.
 Маслов А.А. см. Заварзина Д.Г.
 Маторин Д.Н. см. Акмуханова Н.Р.
 Махнева З.К., Москаленко А.А. Каротиноиды в комплексах LH2 из *Allochrochromatium vinosum* способны при освещении генерировать синглетный кислород, который окисляет БХл850, № 4, 466–474.
 Меденцев А.Г. см. Бирюкова Е.Н.
 Мелентьев А.И. см. Кузьмина Л.Ю.
 Меркель А.Ю. см. Гаврилов С.Н.
 Меркель А.Ю. см. Заварзина Д.Г.
 Милютина И.А. см. Белевич Т.А.
 Миронов В.В. см. Пименов Н.В.
 Мокеев Д.И., Волохина И.В., Телешева Е.М., Евстигнеева С.С., Гринев В.С., Пылаев Т.Е., Петрова Л.П., Шелудько А.В. Анализ устойчивости к осмотическому стрессу биопленок почвенных бактерий *Azospirillum brasilense*, № 6, 695–707.

- Морозов А.Ю.** см. Летаров А.В.
- Москаленко А.А.** см. Махнева З.К.
- Муратова А.Ю., Панченко Л.В., Дубровская Е.В., Любунь Е.В., Голубев С.Н., Сунгурцева И.Ю., Захаревич А.М., Бикташева Л.Р., Галицкая П.Ю., Турковская О.В.** Биоремедиационный потенциал иммобилизованных на биочаре бактерий *Azospirillum brasilense*, № 5, 554–564.
- Мухамеджанова Т.Г.** см. Шаненко Е.Ф.
- Назина Т.Н.** см. Турова Т.П., № 3, 285–299.
- Назина Т.Н.** см. Турова Т.П., № 6, 726–741.
- Насыров Н.А.** см. Николаев Ю.А.
- Наточин Ю.В., Орлова О.Г., Рыбальченко О.В., Шахматова Е.И.** Исследование секреции вазопрессина и окситоцина микроорганизмами, № 1, 125–128.
- Наумова Е.С.** см. Лютова Л.В.
- Наумов Г.И.** см. Лютова Л.В.
- Наумов Д.Г., Куличевская И.С., Дедыш С.Н.** Генетические детерминанты утилизации ксилана у планктомицета класса *Phycisphaerae*, *Humisphaera borealis* M1803, № 3, 300–311.
- Неволина Е.Д.** см. Дювенжи Е.В.
- Нетрусов А.И.** см. Брюханов А.Л.
- Нетрусов А.И.** см. Дин Фань
- Никитин Д.А., Семенов М.В.** Характеристика микобиоты почв Земли Франца-Иосифа методами микробиологического посева и ПЦР в реальном времени, № 1, 62–74.
- Никитин П.А.** см. Панкратов Т.А.
- Николаева В.М.** см. Текучева Д.Н.
- Николаев Ю.А.** см. Панкратов Т.А.
- Николаев Ю.А.** см. Пелевина А.В.
- Николаев Ю.А.** см. Пименов Н.В., № 2, 160–170.
- Николаев Ю.А.** см. Пименов Н.В., № 4, 410–418.
- Николаев Ю.А.** см. Шаненко Е.Ф.
- Николаев Ю.А.** см. Эль-Регистан Г.И.
- Николаев Ю.А.** см. Максимова Ю.Г.
- Образцова Е.А.** см. Сорокина Е.В.
- Озерская С.М.** см. Кочкина Г.А.
- Олескин А.В.** см. Шаненко Е.Ф.
- Орлова О.Г.** см. Наточин Ю.В.
- Османова Ф.Р.** см. Корягина А.О.
- Ошкин И.Ю.** см. Хмеленина В.Н.
- Панасенко А.Е.** см. Киселева И.В.
- Панкратов Т.А., Никитин П.А., Патутина Е.О.** Анализ геномов двух бактериобионтов лишайников, *Lichenibacterium ramalinae* и *Lichenibacterium minor*: токсин-антитоксин системы и белки секреции, № 2, 191–203.
- Панкратов Т.А., Николаев Ю.А., Ганнесен А.В., Эль-Регистан Г.И.** Эффекты гормонов адреналина, норадреналина и эстрадиола на образование персистеров в культурах стафилококков-представителей микробиоты человека и их устойчивость к голоданию и стрессу новой среды, № 3, 321–333.
- Панченко Л.В.** см. Муратова А.Ю.
- Патутина Е.О.** см. Панкратов Т.А.
- Пелевина А.В., Берестовская Ю.Ю., Грачев В.А., Дорофеев А.Г., Слатинская О.В., Максимов Г.В., Каллистова А.Ю., Николаев Ю.А., Груздев Е.В., Равин Н.В., Пименов Н.В., Марданов А.В.** Микробное сообщество, аккумулирующее фосфат в лабораторном биореакторе с доминированием “*Candidatus Accumulibacter*”, № 5, 631–637.
- Петрова Л.П.** см. Мокеев Д.И.
- Пименов Н.В., Николаев Ю.А., Дорофеев А.Г., Грачёв В.А., Каллистова А.Ю., Канапацкий Т.А., Литти Ю.В., Груздев Е.В., Бегматов Ш.А., Равин Н.В., Марданов А.В.** Внесение экзогенного активного ила как способ повышения эффективности удаления азота в процессе анаммокс, № 4, 410–418.
- Пименов Н.В., Николаев Ю.А., Дорофеев А.Г., Грачёв В.А., Каллистова А.Ю., Миронов В.В., Вантеева А.В., Григорьева Н.В., Берестовская Ю.Ю., Груздев Е.В., Бегматов Ш.А., Равин Н.В., Марданов А.В.** Биоаументация активного ила анаммокс нитрифицирующим сообществом бактерий как способ повышения эффективности удаления азота, № 2, 160–170.
- Пименов Н.В.** см. Пелевина А.В.
- Пименов Н.В.** см. Хмеленина В.Н.
- Пиневич А.В., Аверина С.Г.** На краю радуги: длинноволновые хлорофиллы и фотосинтетическая адаптация цианобактерий к дальнему красному свету, № 6, 666–684.
- Пинчук И.П.** см. Кочкина Г.А.
- Пихтерева В.А.** см. Заварзина Д.Г.
- Плакунов В.К.** см. Дювенжи Е.В.
- Плакунов В.К.** см. Журина М.В.
- Плакунов В.К.** см. Николаев Ю.А.
- Плотникова Е.Г.** см. Пьянкова А.А.
- Подосокорская О.А.** см. Кочеткова Т.В.
- Полюдова Т.В.** см. Коробов В.П.
- Портная Е.А.** см. Редькина В.В.
- Потапов Е.Г.** см. Гаврилов С.Н.
- Потехина Н.В., Арискина Е.В., Шашков А.С., Тульская Е.М., Евтушенко Л.И.** Гликополимеры клеточной стенки как диагностический признак *Arthrobacter crystallopoietes*, № 3, 312–320.
- Потехина Н.В., Шашков А.С., Арискина Е.В., Присяжная Н.В., Тульская Е.М., Хасаева Ф.М., Евтушенко Л.И.** Галактофуранан клеточной стенки “*Raenarthrobacter pyridinovorans*” ВКМ Ас-1098D, № 5, 547–553.
- Присяжная Н.В.** см. Потехина Н.В.
- Прокофьева М.И.** см. Гаврилов С.Н.

- Прокофьева М.И.** см. Заварзина Д.Г.
- Пылаев Т.Е.** см. Мокеев Д.И.
- Пьянкова А.А., Плотникова Е.Г.** Бактерии-деструкторы бензойной кислоты семейства *Halomonadaceae*, выделенные из района солеразработки: видовое разнообразие и анализ *benA*-генов, № 1, 102–115.
- Равин Н.В.** см. Дедыш С.Н.
- Равин Н.В.** см. Пелевина А.В.
- Равин Н.В.** см. Пименов Н.В., № 2, 160–170.
- Равин Н.В.** см. Пименов Н.В., № 4, 410–418.
- Раисния Н., Арефян Е., Амузегар М.А.** Анализ микробного сообщества манускрипта XI века культуральными и не использующими культивирование методами, № 3, 364–375.
- Ракитин А.Л.** см. Дедыш С.Н.
- Редькина В.В., Темралеева А.Д., Портная Е.А., Шалыгина Р.Р.** Морфология и филогения микроводоросли *Coleochlamys apoda* (*Microthamniales*, *Chlorophyta*), № 1, 50–61.
- Розова О.В.** см. Хмеленина В.Н.
- Русанов И.И.** см. Саввичев А.С.
- Рыбакова И.В.** см. Федоров Р.А.
- Рыбальченко О.В.** см. Наточин Ю.В.
- Рябова А.С.** см. Кузьмина Л.Ю.
- Саввичев А.С., Кулакова А.А., Краснова Е.Д., Воронов Д.А., Кадников В.В., Белецкий А.В., Козяева В.В., Русанов И.И., Летарова М.А., Веслопова Е.Ф., Беленкова В.В., Демиденко Н.А., Горленко В.М.** Микробное сообщество морского меромиктического желоба (Бухта Биофильтров), расположенного в Кандалакшском заливе Белого моря, № 4, 492–506.
- Садвакасова А.К.** см. Акмуханова Н.Р.
- Семенова Е.М.** см. Турова Т.П., № 3, 285–299.
- Семенова Е.М.** см. Турова Т.П., № 6, 726–741.
- Семенов М.В.** см. Никитин Д.А.
- Серых И.Н.** см. Шаненко Е.Ф.
- Сидорова Л.В.** см. Кузьмина Л.Ю.
- Сизов Л.Р.** см. Кравченко И.К.
- Слатинская О.В.** см. Пелевина А.В.
- Соколова Д.Ш.** см. Турова Т.П., № 3, 285–299.
- Соколова Д.Ш.** см. Турова Т.П., № 6, 726–741.
- Сорокина Е.В., Образцова Е.А.** Действие наночастиц углеродной природы с различной структурной организацией на биологические системы штамма *Escherichia coli* K12 TGI, № 3, 334–340.
- Стоянова Л.Г.** см. Дин Фань
- Сунгурцева И.Ю.** см. Муратова А.Ю.
- Тактарова Ю.В., Ширинкина Л.И., Будённая А.С., Гладченко М.А., Котова И.Б.** Биодegradация азокрасителя Methyl red метаногенными микробными сообществами, выделенными из донных отложений реки Волга, № 3, 341–352.
- Текучева Д.Н., Фокина В.В., Николаева В.М., Шутов А.А., Карпов М.В., Донова М.В.** Каскадная биоконверсия фитостерина в тестостерон штаммами *Mycolicibacterium neoaurum* ВКМ Ас-1815Д и *Nocardioides simplex* ВКМ Ас-2033Д, № 3, 353–363.
- Телешева Е.М.** см. Мокеев Д.И.
- Темралеева А.Д.** см. Редькина В.В.
- Терехова Л.П.** см. Ефименко Т.А.
- Тимофеев Н.П.** см. Акмуханова Н.Р.
- Титок М.А.** см. Гуринович А.С.
- Тихонова Е.Н.** см. Кравченко И.К.
- Тихонова Е.Н.** см. Николаев Ю.А.
- Тодоренко Д.А.** см. Акмуханова Н.Р.
- Тойменцева А.А.** см. Корягина А.О.
- Тореханова М.М.** см. Акмуханова Н.Р.
- Тульская Е.М.** см. Потехина Н.В.
- Тульская Е.М.** см. Потехина Н.В.
- Турковская О.В.** см. Муратова А.Ю.
- Турова Т.П.** см. Ивановский Р.Н.
- Турова Т.П., Соколова Д.Ш., Семенова Е.М., Ершов А.П., Груздев Д.С., Назина Т.Н.** Геномные и физиологические характеристики галофильных бактерий родов *Halomonas* и *Marinobacter* из нефтяных пластов, № 3, 285–299.
- Турова Т.П., Соколова Д.Ш., Семенова Е.М., Киреев Д.М., Лаптев А.Б., Назина Т.Н.** Состав микробных обрастаний на поверхности пластиков и стали, экспонированных в водоеме на полигоне твердых бытовых отходов, № 6, 726–741.
- Уйар Е.** см. Шатила Ф.
- Уманская М.В.** см. Горбунов М.Ю.
- Федоров Р.А., Рыбакова И.В., Белькова Н.Л., Лаптева Н.А.** Структурно-функциональная характеристика бактериальных обрастаний тростника обыкновенного (*Phragmites australis* (Cav.)) в Рыбинском водохранилище, № 3, 376–388.
- Филиппов Д.А.** см. Дедыш С.Н.
- Фирстова В.В.** см. Дювенжи Е.В.
- Фокина В.В.** см. Текучева Д.Н.
- Хазарика Д.Дж., Какоти М., Калита Р., Гаутом Т., Госвами Г., Баруах М., Боро Р.С.** Продигиозин штамма *Serratia marcescens* D1, выделенного из грибов, ингибирует образование биопленок грамположительными бактериями, № 2, 243–253.
- Хакимова Л.Р.** см. Чубукова О.В.
- Хасаева Ф.М.** см. Потехина Н.В.
- Хлопко Ю.А.** см. Горбунов М.Ю.
- Хмеленина В.Н., Бут С.Ю., Розова О.В., Ошкин И.Ю., Пименов Н.В., Дедыш С.Н.** Редактирование геномов метанотрофных бактерий: возможные мишени и доступный инструментарий, № 6, 647–665.
- Холомейдик А.Н.** см. Киселева И.В.

Чубукова О.В., Хакимова Л.Р., Акимова Е.С., Вершинина З.Р. Филогения и свойства новых штаммов *Pseudomonas* sp. из ризосферы бобовых растений Южного Урала, № 5, 537–546.

Шалыгина Р.Р. см. **Редькина В.В.**

Шаненко Е.Ф., Николаев Ю.А., Ганина В.И., Серых И.Н., Олескин А.В., Мухамеджанова Т.Г., Григорьева Н.В., Эль-Регистан Г.И. Синтез биогенных аминов молочнокислыми бактериями на средах растительного и животного происхождения, № 4, 433–450.

Шарипова М.Р. см. **Корягина А.О.**

Шатила Ф., Уйар Е., Ялсин Х.Т. Скрининг образования биосурфактантов штаммами *Yarrowia lipolytica* и оценка их антибиопленочной и антиадгезивной активности против биопленок *Salmonella enterica* ser. Enteritidis, № 1, 116–124.

Шахматова Е.И. см. **Наточин Ю.В.**

Шашков А.С. см. **Потехина Н.В.**, № 3, 312–320.

Шашков А.С. см. **Потехина Н.В.**, № 5, 547–553.

Шелудько А.В. см. **Мокеев Д.И.**

Ширинкина Л.И. см. **Тактарова Ю.В.**

Ширсалимиан М.С., Мазиди, С.М., Амузегар М.А. Пустыня Деште-Лут и ее микробное разнообразие: недавние и предполагаемые исследования, № 3, 263–273.

Шнырева А.В. см. **Лютова Л.В.**

Шутов А.А. см. **Текучева Д.Н.**

Щапова Л.Н. см. **Киселева И.В.**

Эль-Регистан Г.И., Лойко Н.Г., Николаев Ю.А. Выживание стареющих микробных популяций при летальных воздействиях, № 6, 708–719.

Эль-Регистан Г.И. см. **Николаев Ю.А.**

Эль-Регистан Г.И. см. **Панкратов Т.А.**

Эль-Регистан Г.И. см. **Шаненко Е.Ф.**

Юшина Ю.К. см. **Николаев Ю.А.**

Якушев А.В. см. **Ефименко Т.А.**

Ялсин Х.Т. см. **Шатила Ф.**