

ISSN 0026-3656

Том 92, Номер 3

Май - Июнь 2023



МИКРОБИОЛОГИЯ

www.sciencejournals.ru



СОДЕРЖАНИЕ

Том 92, номер 3, 2023

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- Гликозил-гидролазы облигатного метанотрофа *Methyloferula stellata*: необычная эволюционная стратегия без дальних горизонтальных переносов
Д. Г. Наумов, С. Н. Дедыш 243
- Анаэробные *Thermodesulfovibrio* и аэробные *Meiothermus* сосуществуют в глубинной термальной воде
А. П. Лукина, В. В. Кадников, И. И. Русанов, М. Р. Авакян, А. В. Белецкий, А. В. Марданов, Н. В. Пименов, Н. В. Равин, О. В. Карначук 250
- Поиск новых галофильных и галотолерантных продуцентов антимикробных соединений в различных экстремальных экосистемах
С. Н. Гаврилов, А. С. Барашкова, Т. А. Чердынцева, М. И. Прокофьева, О. В. Тресвятский, Д. А. Лукьянов, А. А. Никандрова, Т. Эртле, А. Ю. Меркель, Е. А. Бонч-Осмоловская, Е. А. Рогожин 261
- Адаптация ацидофильного гриба *Sistotrema brinkmannii* к рН фактору
Е. А. Януцевич, О. А. Данилова, О. А. Грум-Гржимайло, Н. В. Гроза, В. М. Терёшина 279
- Влияние гена AZOBR_r60123, кодирующего белок Wzt, на синтез липополисахаридов и формирование биопленок у бактерий *Azospirillum baldaniorum* Sp245
Л. П. Петрова, С. С. Евстигнеева, Ю. А. Филипьева, И. В. Волохина, Г. Л. Бурьгин, Л. Ю. Матора, А. В. Шелудько 289
- Микробные сообщества, ассоциированные с красными водорослями Белого моря, как источник ксиланолитических микроорганизмов
В. Д. Салова, А. М. Холдина, А. Д. Мельник, К. С. Заюлина, А. Г. Ельченинов, А. А. Клюкина, И. В. Кубланов 300
- Биодеструкция эфиров фталевой кислоты грибом белой гнили *Peniophora lycii*
О. С. Савинова, А. В. Шабает, Т. В. Федорова 310
- Биологическая активность и состав метаболитов штамма *Streptomyces carpaticus* K-11 RCAM04697 (SCPM-O-B-9993), перспективного для использования в растениеводстве
Ю. В. Батаева, Л. Н. Григорян, А. Г. Богун, А. А. Кисличкина, М. Е. Платонов, Е. А. Курашов, Ю. В. Крылова, А. Г. Федоренко, М. П. Андреева 318
-

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

- Влияние мутаций в экстрацитозольном домене H⁺-АТФазы плазматической мембраны дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* на ее активность и регуляцию
В. В. Петров 329
- Кальцинирующие бактерии в экстремальных экосистемах Южного Приаралья
К. В. Кондрашева, А. А. Умузиков, С. В. Калёнов, А. Ю. Меркель, Н. А. Черных, А. И. Слободкин, С. Н. Гаврилов, К. Д. Давранов 335
-
-

Contents

Vol. 92, No. 3, 2023

Experimental Articles

- Glycoside Hydrolases of the Obligate Methanotroph *Methyloferula stellata*:
an Unusual Evolutionary Strategy not Involving Distant Lateral Transfers
D. G. Naumoffa and S. N. Dedysch 243
- Anaerobic *Thermodesulfovibrio* and Aerobic *Meiothermus* Coexist in Deep Thermal Water
*A. P. Lukina, V. V. Kadnikov, I. I. Rusanov, M. R. Avakyan, A. V. Beletsky, A. V. Mardanov,
N. V. Pimenov, N. V. Ravin, and O. V. Karnachuk* 250
- Search for Novel Halophilic and Halotolerant Producers of Antimicrobial Compounds
in Various Extreme Ecosystems
*S. N. Gavrilov, A. S. Barashkova, T. A. Cherdyntseva, M. I. Prokofeva, O. V. Tresvyatskii,
D. A. Lukianov, A. A. Nikandrova, T. Haertle, A. Yu. Merkel,
E. A. Bonch-Osmolovskaya, and E. A. Rogozhin* 261
- Adaptation of the Acidophilic Fungus *Sistotrema brinkmannii* to the pH Factor
E. A. Ianutsevich, O. A. Danilova, O. A. Grum-Grzhimailo, N. V. Groza, and V. M. Tereshina 279
- Effect of the AZOBR_p60123 Plasmid Gene, Encoding the Wzt Protein,
on Lipopolysaccharide Synthesis and Biofilm Formation in the Bacterium
Azospirillum baldaniorum Sp245
*L. P. Petrova, S. S. Evstigneeva, Y. A. Filip'echeva, I. V. Volokhina, G. L. Burygin,
L. Y. Matora, and A. V. Shelud'ko* 289
- Microbial Communities Associated with the White Sea Red Algae as a Source
of Xylanolytic Microorganisms
*V. D. Salova, A. M. Kholdina, A. D. Mel'nik, K. S. Zayulina, A. G. El'cheninov,
A. A. Klyukina, and I. V. Kublanov* 300
- Biodegradation of Phthalic Acid Esters by the White Rot Fungus *Peniophora lycii*
O. S. Savinova, A. V. Shabaev, and T. V. Fedorova 310
- Biological Activity and Composition of Metabolites of Potential Agricultural Application
from *Streptomyces carpaticus* K-11 RCAM04697 (SCPM-O-B-9993)
*Yu. V. Bataeva, L. N. Grigoryan, A. G. Bogun, A. A. Kislichkina, M. E. Platonov,
E. A. Kurashov, J. V. Krylova, A. G. Fedorenko, and M. P. Andreeva* 318

Short Communications

- Effect of Mutations in the Extracytosolic Domain of the *Saccharomyces cerevisiae*
 H^+ -ATPase on Its Activity and Regulation
V. V. Petrov 329
- Calcinating Bacteria in Extreme Ecosystems of the Southern Aral Region
*K. V. Kondrasheva, A. A. Umruzokov, S. V. Kalenov, A. Yu. Merkel, N. A. Chernykh,
A. I. Slobodkin, S. N. Gavrilov, and K. D. Davranov* 335
-
-

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИ**

ГЛИКОЗИЛ-ГИДРОЛАЗЫ ОБЛИГАТНОГО МЕТАНОТРОФА *METHYLOFERULA STELLATA*: НЕОБЫЧНАЯ ЭВОЛЮЦИОННАЯ СТРАТЕГИЯ БЕЗ ДАЛЬНИХ ГОРИЗОНТАЛЬНЫХ ПЕРЕНОСОВ

© 2023 г. Д. Г. Наумов^а, *, С. Н. Дедыш^а

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

*e-mail: daniil_naumoff@yahoo.com

Поступила в редакцию 21.11.2022 г.

После доработки 08.12.2022 г.

Принята к публикации 09.12.2022 г.

В геноме облигатно метанотрофной бактерии *Methyloferula stellata* AR4 закодировано три десятка гликозил-гидролаз. Подавляющее большинство из них в качестве ближайших гомологов имеет белки из других бактерий класса *Alphaproteobacteria*. Два исключения составляют гены белков семейств GH39 и GH65, которые появились предположительно за счет горизонтального переноса из неблизкородственных бактерий. Настоящая работа посвящена исследованию эволюционной истории этих двух генов. В случае с представителем семейства GH65 гликозил-гидролаз этот сценарий не подтвердился. Кодированная этим геном фосфорилаза коджибиозы является типичной для альфапротеобактерий. Предполагавшийся горизонтальный перенос гена оказался направленным в противоположную сторону: в одну из эволюционных линий класса *Betaproteobacteria*. Потенциальная гликозил-гидролаза семейства GH39 является единственной, чей ген имеет непротеобактериальное происхождение. Обсуждается роль горизонтальных переносов в эволюции генов гликозил-гидролаз и их гомологов у метанотрофов и других бактерий.

Ключевые слова: гликозил-гидролаза, карбогидрат-фосфорилаза, семейство GH39, семейство GH65, метанотрофы, *Methyloferula stellata*, *Beijerinckiaceae*, *Burkholderiaceae*, филогенетическое древо белков, эволюция белков, горизонтальный перенос, поиск гомологов, аннотация генов

DOI: 10.31857/S002636562260078X, **EDN:** FWAFFVA

Methyloferula stellata AR4 – аэробный ацидофильный облигатный метанотроф из семейства *Beijerinckiaceae* класса *Alphaproteobacteria* (Vorobev et al., 2011). В отличие от подавляющего большинства известных метанотрофных бактерий и подобно метанотрофам рода *Methylocella*, в клетках *Methyloferula* отсутствует мембранная метанмонооксигеназа, а окисление метана осуществляет растворимая форма этого фермента. *M. stellata* AR4 растет на метане и метаноле, но не может расти ни на одном субстрате, содержащем C–C химическую связь, в том числе на углеводах. Следовательно, можно предположить, что все имеющиеся у этой бактерии гликозил-гидролазы используют исключительно субстраты, которые синтезируются внутриклеточно. Геномная последовательность *M. stellata* AR4 была определена в Joint Genome Institute и аннотирована нами ранее (Dedysh et al., 2015). Анализ генома выявил 30 генов потенциальных гликозил-гидролаз, относящихся к семействам GH2, GH3, GH10, GH13, GH15, GH23, GH25, GH39, GH65, GH77, GH94, GH102, GH103 и PF06202 (Naumoff, 2017). Использование каталитических доменов каждой из

них в качестве запроса при скрининге базы данных аминокислотных последовательностей почти во всех случаях выявляло белки представителей *Alphaproteobacteria* в качестве ближайших гомологов (исключение составили лишь два белка из семейств GH39 и GH65 гликозил-гидролаз). Полученные данные указывали на малую роль горизонтального переноса генов гликозил-гидролаз в эволюции облигатных метанотрофов. Это до сих пор является уникальным случаем среди бактерий, так как спектр закодированных гликозил-гидролаз обычно очень зависит от занимаемой экологической ниши (доступных углеводных субстратов) и может существенно отличаться даже у близкородственных микроорганизмов (Наумов, 2011). Согласно полученным нами ранее данным (Naumoff, 2017), предполагаемая β-галактозидаза *M. stellata* (GenPept, WP_020173696.1) из семейства GH39 имела в качестве ближайших гомологов (23–31% идентичности аминокислотных последовательностей) белки ряда бактерий филумов *Actinobacteria* и *Firmicutes*, а карбогидрат-фосфорилаза (WP_020177329.1) из семейства GH65 –

белки из бактерий класса *Betaproteobacteria* (60–64%).

Целью настоящей работы было исследование эволюционного происхождения генов этих двух нетипичных для метанотрофов белков.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Геномная последовательность *Methyloferula stellata* AR4 (GenBank, ARWA00000000.1) была использована в настоящем исследовании. Ближайших гомологов белков *M. stellata* искали по алгоритму blastp на сайте NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Списки экспериментально охарактеризованных представителей для анализируемых семейств гликозил-гидролаз составляли на основании информации, имеющейся в базе данных CAZy (Drula et al., 2022).

Для филогенетического анализа отбирали по несколько десятков ближайших гомологов исследуемых белков бактерии *M. stellata* AR4. Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей проводили вручную в программе-редакторе BioEdit (<https://bioedit.software.informer.com/7.2/>), при этом учитывали результаты попарных выравниваний с помощью программы blastp.

В качестве внешней группы при исследовании филогении семейства GH65 использовали четыре наиболее близких к белку из *M. stellata* экспериментально охарактеризованных ферментов (GenPept: AAC74398.1, ABR66077.1, ACL68803.1 и BAV97300.1). Для семейства GH39 специально внешняя группа не подбиралась; при визуализации древа в качестве внешней была выбрана наиболее дивергентная группа из числа проанализированных белков.

Результаты множественного выравнивания (после удаления наиболее вариабельных участков последовательностей) использовали для построения филогенетических деревьев с помощью программы PROTPARS (метод максимальной экономии, Protein Sequence Parsimony method, MP) из пакета PHYLIP (<http://evolution.gs.washington.edu/phylip.html>). Статистическую надежность узлов древа оценивали с использованием бутстреп-анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Семейство GH65 гликозил-гидролаз. С целью проверки ранее выдвинутой нами гипотезы (Naumoff, 2017) о возможном получении *Methyloferula stellata* гена потенциальной карбогидрат-фосфоорилазы от бетапиротеобактерий (ближайшим гомологом в базе данных NCBI в то время являлся белок SEE89066.1 из *Burkholderia* sp. WP9 с уровнем идентичности аминокислотных последовательностей 61%) был проведен филогенетический анализ с использованием пяти десятков ближайших ныне известных гомологов. Среди них пре-

обладали белки альфапротеобактерий. Бетапротеобактериальных белков оказалось существенно меньше, и все они принадлежали представителям только трех родов семейства *Burkholderiaceae*: *Burkholderia*, *Caballeronia* и *Paraburkholderia* (согласно таксономии GTDB эти таксоны относятся к классу *Gammaproteobacteria*; Parks et al., 2018). Мы дополнительно провели скрининг базы данных NCBI среди бетапиротеобактериальных белков, не принадлежащих бактериям этих трех родов, и обнаружили в качестве самого близкого гомолога белок бактерии *Herbaspirillum* sp. ST 5-3 (семейство *Oxalobacteraceae*; согласно таксономии GTDB – семейство *Burkholderiaceae*), который был также включен в выборку для филогенетического анализа. Для более надежного предсказания энзиматической активности исследуемой фосфоорилазы *M. stellata* было проведено ее попарное сравнение со всеми экспериментально охарактеризованными белками семейства GH65. Четыре ближайших гомолога из *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* (Yamamoto et al., 2011), *Escherichia coli* (Mukherjee et al., 2018), *Halothermothrix orenii* (De Beul et al., 2021) и *Thermoanaerobacter brockii* (Yamamoto et al., 2004) оказались обладателями одной и той же активности (К.Ф. 2.4.1.230) фосфоорилазы коджибиозы (англ. kojibiose phosphorylase); они были взяты нами для филогенетического анализа в качестве внешней группы. На основе полученных данных можно предположить, что все проанализированные в работе белки семейства GH65 обладают этой же энзиматической активностью.

На построенном филогенетическом древе семейства GH65 (рис. 1) белки бетапиротеобактерий трех родов семейства *Burkholderiaceae* сформировали четко обособленный субкластер I (100% бутстреп-поддержки) внутри альфапротеобактериального кластера (100%). Другой крупный субкластер IV (95%) внутри него сформировали метилотрофы, представители близкородственных родов *Methylobacterium* и *Methylorubrum*. Вне субкластера IV оказался белок из *Methylobacterium* sp. BTF04 (NEU14609.1). Белки метанотрофов *Methylocapsa palsarum* NE2 (SFK64348.1) и *Methyloferula stellata* AR4 (WP_020177329.1), а также филогенетически близкой алканокисляющей бактерии из газовых сипов *Candidatus Rhodoblastus alkanivorans* (Haque et al., 2022) не проявили существенной склонности к кластеризации. Белок из бетапиротеобактерии *Herbaspirillum* sp. (WP_136416394.1) занял внешнее по отношению к альфапротеобактериальному кластеру положение, примыкая к аутгруппе. Наблюдаемая топология филогенетического древа свидетельствует о том, что горизонтальный перенос гена карбогидрат-фосфоорилазы был осуществлен от альфапротеобактерий к бетапиротеобактериям семейства *Burkholderiaceae*, а белок *M. stellata* имеет типичное для альфапротеобактерий происхождение.

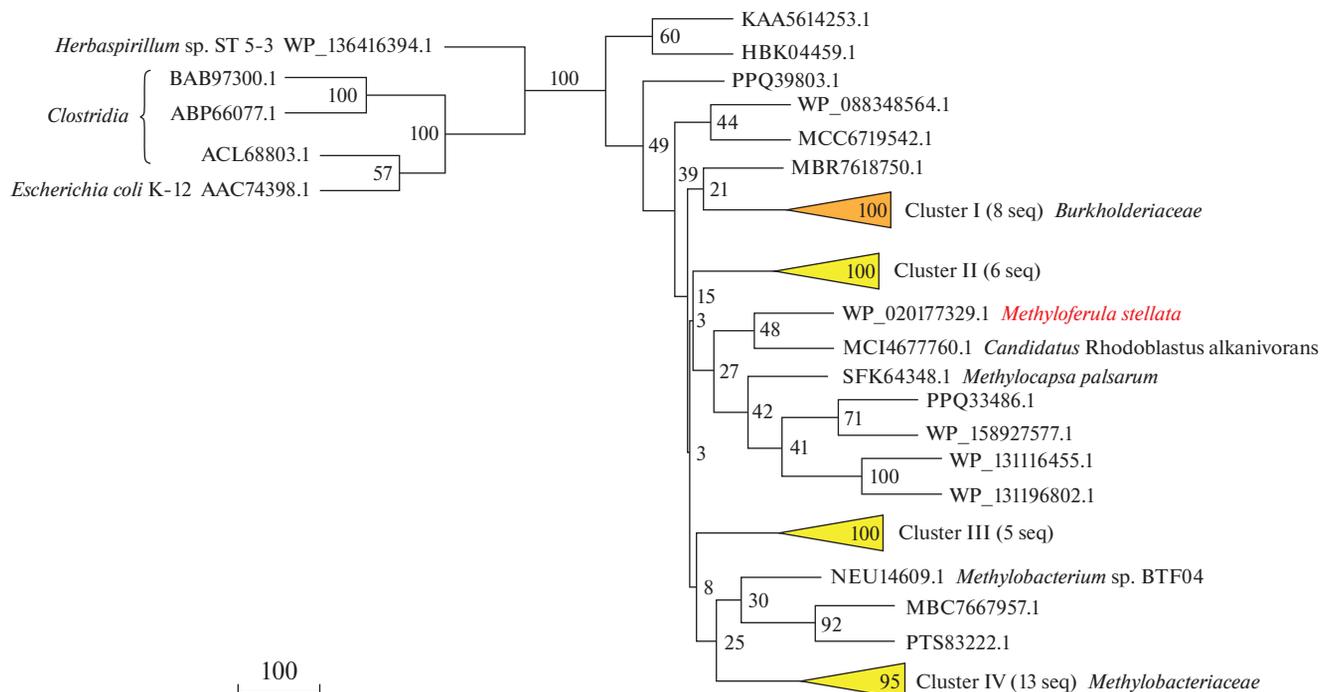


Рис. 1. Филогенетическое древо семейства GH65 гликозил-гидролаз, построенное методом максимальной экономии. Статистическую надежность узлов древа оценивали с помощью бутстреп-анализа, около каждого узла указано число подтверждающих псевдореplik из 100. Красным цветом указан белок из *M. stellata* (GenPept, WP_020177329.1). Подписаны названия организмов-хозяев для белков, обсуждаемых в тексте (все неподписанные белки принадлежат альфапротеобактериям). Треугольниками обозначены четыре кластера ветвей (I–IV), внутри каждого треугольника указана бутстреп-поддержка соответствующего кластера, а справа от него – число относящихся белков. Кластер I, закрашенный оранжевым цветом, содержит 8 белков из бактерий трех родов семейства *Burkholderiaceae*: *Burkholderia* (EIF33191.1 и SEE89066.1), *Caballeronia* (OTP72132.1, OXC75000.1 и SAL64053.1) и *Paraburkholderia* (CAB3772267.1, WP_175773125.1 и WP_244146697.1). Кластер II содержит 4 белка альфапротеобактерий (MBV8092699.1, MBV8522152.1, MBV9117068.1 и SHH85324.1) и по одному метагеномному белку, проаннотированному как принадлежащему к *Deltaproteobacteria* (MBV8360260.1) и *Verrucomicrobia* (MBV8815903.1). Кластер III содержит 5 белков альфапротеобактерий (MBV3873090.1, MBU2167958.1, PZO03164.1, PZO38736.1 и VDC48943.1). Кластер IV содержит 12 белков метилотрофов из родов *Methylobacterium* (ACA17291.1, ACL60972.1, ACL62778.1, AIQ92494.1, APT32891.1, AWW15942.1, KQQ21384.1, MBA9064749.1, MBO1021890.1, SFV05091.1 и UHC19996.1) и *Methylorubrum* (CAX21997.1), а также один белок из актинобактерии *Streptomyces purpurogeniscleroticus* NRRL B-2952 (KOX54615.1).

Семейство GH39 гликозил-гидролаз. Для исследования эволюционного происхождения гена потенциальной β-галактозидазы *M. stellata* (GenPept, WP_020173696.1) был проведен сравнительный анализ с использованием трех с половиной десятков ближайших гомологов. При этом самым близким из них на основании попарного сравнения оказался белок из *Candidatus Melainabacteria bacterium* GWF2_37_15 (OGI03707.1), который содержал два гомологичных домена (31 и 29% идентичности аминокислотных последовательностей для N- и C-концевого домена соответственно). Для более надежного предсказания энзиматической активности исследуемого белка *M. stellata* было проведено его попарное сравнение со всеми известными экспериментально охарактеризованными белками семейства GH39. Однако сколько-нибудь близких гомологов среди них обнаружено не было. Ближайшими оказались эндо-гликозидаза PslG из *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (AAG05625.1;

Yu et al., 2015) с 21% идентичности аминокислотных последовательностей (*E-value* = 0.003) и β-ксилозидаза XynB2 из *Caulobacter vibrioides* CB15 (AAK24328.1; Corrêa et al., 2012) с 25% идентичности (*E-value* = 0.065). Такой низкий уровень сходства последовательностей не дал возможности использовать их для проведения филогенетического анализа, а также не позволил сделать каких-либо заключений относительно возможной субстратной специфичности фермента из *M. stellata*. Наши предварительные выводы о предполагаемом наличии β-галактозидазной активности (Naumoff, 2017) следует считать необоснованным предсказанием (англ. overprediction).

На построенном филогенетическом древе семейства GH39 (рис. 2) гликозил-гидролаза *M. stellata* попала в один кластер (83.7% бутстреп-поддержки) с белками из филумов *Actinobacteria*, *Chloroflexi* и *Firmicutes*, что хорошо согласуется с ранее полученными нами данными (Naumoff,

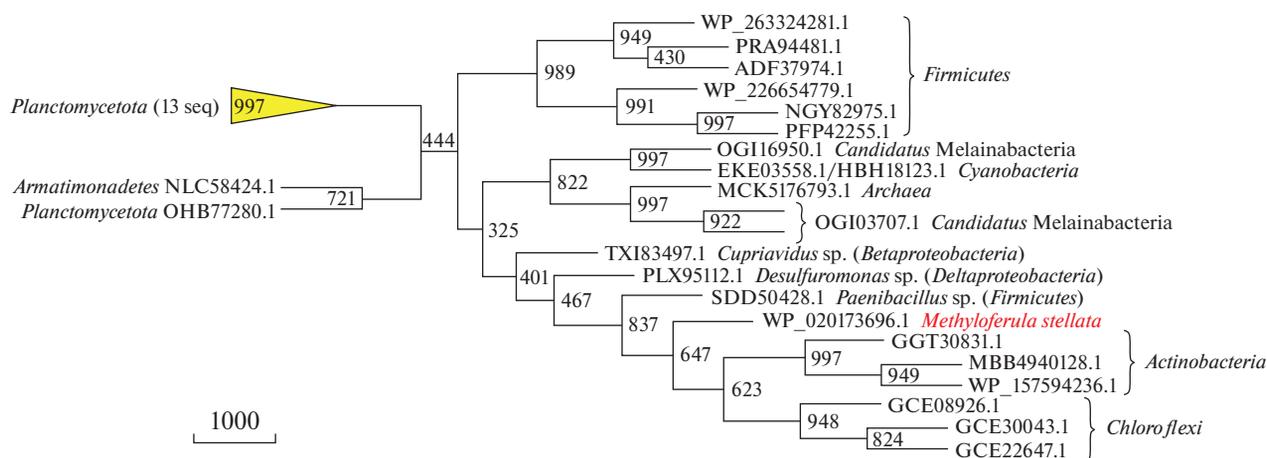


Рис. 2. Филогенетическое древо семейства GH39 гликозил-гидролаз, построенное методом максимальной экономии. Статистическую надежность узлов древа оценивали с помощью бутстреп-анализа, около каждого узла указано число подтверждающих псевдореplik из 1000. Красным цветом указан белок из *M. stellata* (GenPept, WP_020173696.1). Треугольником обозначен кластер ветвей, содержащий 13 белков филы *Planctomycetota* (HCO96457.1, KPL25053.1, MBL7154686.1, MBL7188229.1, MBN2312629.1, OHB65322.1, OHB72897.1, OHB81953.1, TKJ39371.1, TSA53485.1, UCC98674.1, UCE46477.1 и UCF13893.1). Внутри треугольника указана бутстреп-поддержка (99.7%). Белок из *Candidatus Melainabacteria bacterium GWF2_37_15* (OGI03707.1) содержит два гомологичных домена семейства GH39 гликозил-гидролаз.

2017) о предполагаемом переносе соответствующего гена от грамположительных бактерий. Два других взятых в анализ белка из протеобактерий — бетапиротеобактерии *Cupriavidus* sp. Bin_4_1 (GenPept, TXI83497.1; согласно таксономии GTDB — класс *Gammaproteobacteria*) и дельтапротеобактерии *Desulfuromonas* sp. VM515 (PLX95112.1; согласно GTDB — филум *Desulfobacterota*) — оказались за пределами этого кластера. Оба они закодированы в метагеномах, поэтому к указанной таксономической принадлежности их хозяев надо относиться с осторожностью. В правой части рисунка мы видим еще два стабильных кластера. Один из них (98.9%) состоит исключительно из белков фирмикут семейства *Bacillaceae*, а второй (82.2%) имеет крайне гетерогенный состав, указывающий на множественные горизонтальные переносы. Таким образом, эта уникальная потенциальная гликозил-гидролаза демонстрирует нетипичную для *M. stellata* эволюционную историю: кодирующий ее ген, вероятно, был получен из какой-то бактерии совсем другой филогенетической группы.

ОБСУЖДЕНИЕ

Семейство *Beijerinckiaceae*, к которому принадлежит *M. stellata*, включает бактерии метаболически различных групп, таких как облигатные и факультативные метанотрофы, факультативные метилотрофы, хемоорганотрофы и даже аноксигенные фототрофы (Dedysh et al., 2016). Исследование эволюции этого семейства на основании сравнительного геномного анализа позволило сделать предположение о происхождении его

представителей от общего метанотрофного предка (Tamas et al., 2014). Ряд членов этого семейства, таких как классический хемоорганотроф *Beijerinckia indica*, в ходе эволюции утратили метано- и метилотрофный потенциал и приобрели способность к росту на широком спектре углеводных субстратов. По всей видимости, все гены гликозил-гидролаз этой бактерии, обеспечивающие рост на углеводах, были получены в результате эволюционно недавних горизонтальных переносов. В частности, в геноме *B. indica* закодировано два белка семейства GH32 (ACB94959.1 и ACB95642.1) и по одному белку семейств GH25 (ACB95246.1), GH68 (ACB95643.1), GH108 (ACB96931.1) и GH144 (ACB96038.1) гликозил-гидролаз (Drula et al., 2022). Все эти семейства не представлены у *M. stellata*. Белок семейства GH39 из *B. indica* (ACB96331.1) имеет лишь 22% идентичности аминокислотных последовательностей со своим гомологом из *M. stellata* (WP_020173696.1). Будущие исследования происхождения всех этих генов *B. indica* позволят лучше понять эволюцию бактерий семейства *Beijerinckiaceae*. Наши предварительные данные показывают, что один из генов β -фруктозидазы семейства GH32 (ACB94959.1), вероятно, имеет эукариотическое происхождение (49% идентичности аминокислотных последовательностей с энзиматически охарактеризованной экзоинулиной из *Penicillium* sp. TN-88; VAC16218.1), в то время как другой (GenPept, ACB95642.1) был получен от бетапиротеобактерий.

Исследование возможного эволюционного происхождения закодированных в геноме *Methyloferula stellata* генов трех десятков гликозил-гид-

ролаз показало, что почти все они либо наследовались строго по вертикали, либо были переданы горизонтальным переносом от других представителей класса *Alphaproteobacteria* (Naumoff, 2017). Это резко контрастирует с огромным массивом накопленных данных о характере эволюции генов гликозил-гидролаз у хемоорганотрофных бактерий (Наумов, 2011). Играя ключевую роль в утилизации разнообразных углеводных субстратов, гликозил-гидролазы являются очень динамичной группой ферментов: их гены легко приобретаются посредством горизонтальных переносов от других обитателей той же экологической ниши, затем часто подвергаются дупликациям и дальше элиминируются при смене среды обитания. Даже у штаммов одного вида наблюдаются существенные различия в пуле закодированных в геноме гликозил-гидролаз. Лишь часть из этих ферментов отвечает за внутриклеточные функции и поэтому обладает большей эволюционной стабильностью. По всей видимости, у облигатных метанотрофов имеются гликозил-гидролазы только этого типа.

Проведенный нами ранее анализ (Naumoff, 2017) позволил выявить лишь два гена предполагаемых гликозил-гидролаз, для которых тогда не нашлось близких гомологов среди других альфа-протеобактерий. Это могло объясняться либо малым числом доступных тогда геномов, либо отражать имевший место относительно недавно горизонтальный перенос гена от неблизкородственной бактерии. Результаты настоящего исследования продемонстрировали, что в случае с семейством GN65 имел место первый сценарий. Горизонтальный перенос был направлен в противоположную сторону: бетапротеобактерии семейства *Burkholderiaceae* получили ген от альфапротеобактерий. Однако это не отменяет того факта, что данный ген является относительно редким среди последних. Так, из известных метанотрофов он оказался только в геномах *Methylocapsa palsarum* NE2 (Miroshnikov et al., 2017) и *Methyloferula stellata* AR4 (Dedysh et al., 2015). Это свидетельствует в пользу того, что функция закодированной в нем фосфорилазы коджибиозы является факультативной и у метанотрофов, и у других альфапротеобактерий.

В случае с семейством GN39 мы, очевидно, наблюдаем пример дальнего горизонтального переноса гена в геном *M. stellata*. Кодлируемый им белок является очень дивергентным представителем этого семейства. Даже со своими наиболее близкими гомологами он проявляет низкий уровень сходства аминокислотных последовательностей (около 30%). Среди этих белков нет ни одного экспериментально охарактеризованного, что не позволяет сделать достоверного предсказания о возможной субстратной специфичности фермента. Аннотации этих белков настолько противоречивы, что оставляют возможность усомниться в их принадлеж-

ности к обсуждаемому семейству. Однако, по крайней мере, один из них (GenPept, ADF37974.1; см. рис. 2) нам удалось обнаружить в списке семейства GN39, приведенном на сайте CAZy (Drula et al., 2022). Это позволяет рассматривать их как отдельное подсемейство в рамках этого семейства. Не исключено, что все эти белки не обладают какой-либо энзиматической активностью, выполняя иную биологическую функцию. Хорошо известны примеры из ряда белковых семейств, когда гомологи гликозил-гидролаз утрачивали ферментативные активности и превращались в ингибиторы, лактальбумины, рецепторы, транспортеры и т.д. (Coutinho et al., 2003; Stam et al., 2006; Drula et al., 2022). Если обсуждаемый белок *M. stellata* (GenPept, WP_020173696.1) тоже утратил гликозил-гидролазную активность, то это было бы хорошим объяснением, почему его ген имеет принципиально иную эволюционную историю в сравнении с генами других гликозил-гидролаз этого организма.

Следует отметить, что ранее нами (Наумов, 2016) был обнаружен другой редкий пример вертикального наследования генов, кодирующих гомологи гликозил-гидролаз. Все исследованные геномы гетеротрофных планктомицетов содержат ген, кодирующий белок семейства GN10 гликозил-гидролаз. Его филогения хорошо согласуется с таксономической принадлежностью организмов-хозяев генов (см. рис. 2 в работе (Наумов и соавт., 2014) и рис. 3 в работе (Наумов и соавт., 2022)). Детальное исследование первичных структур этих белков позволило показать, что они имеют разрушенный активный центр – в них отсутствуют два ключевых остатка Glu (см. рис. S1 в работе Rakitin et al., 2021), выполняющих роль донора протона и нуклеофила, – что делает невозможным наличие у них какой-либо ферментативной активности.

Полученные нами результаты указывают на необычный характер наследования генов гликозил-гидролаз у метанотрофных бактерий. Можно ожидать, что их близкие гомологи из хемоорганотрофных организмов тоже не вовлечены в утилизацию внеклеточных субстратов, а отвечают за внутриклеточные функции.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда, проект № 21-14-00034 (С.Н.Д.), а также Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Д.Г.Н.).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют отсутствие конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Наумов Д.Г. Иерархическая классификация гликозил-гидролаз // Биохимия. 2011. Т. 76. С. 764–780.
- Naumoff D.G. Hierarchical classification of glycoside hydrolases // Biochemistry (Moscow). 2011. V. 76. P. 622–635.
- Наумов Д.Г. Семейство GH10 гликозилгидролаз: структура и эволюционные связи // Мол. биология. 2016. Т. 50. С. 151–160.
- Naumoff D.G. GH10 family of glycoside hydrolases: structure and evolutionary connections // Mol. Biol. (Moscow). 2016. V. 50. P. 132–140.
- Наумов Д.Г., Иванова А.А., Дедыш С.Н. Филогения β-ксилазаз планктомицетов // Мол. биология. 2014. Т. 48. С. 508–517.
- Naumoff D.G., Ivanova A.A., Dedysh S.N. Phylogeny of β-xylanases from Planctomycetes // Mol. Biol. (Moscow). 2014. V. 48. P. 439–447.
- Наумов Д.Г., Куличевская И.С., Дедыш С.Н. Генетические детерминанты утилизации ксилана у планктомицета класса *Phycisphaerae*, *Humisphaera borealis* M1803^T // Микробиология. 2022. Т. 91. С. 300–311.
- Naumoff D.G., Kulichevskaya I.S., Dedysh S.N. Genetic determinants of xylane utilization in *Humisphaera borealis* M1803^T, a planctomycete of the class *Phycisphaerae* // Microbiology (Moscow). 2022. V. 91. P. 249–258.
- Corrêa J.M., Graciano L., Abrahão J., Loth E.A., Gandra R.F., Kadowaki M.K., Henn C., Simão Rde C. Expression and characterization of a GH39 β-xylosidase II from *Caulobacter crescentus* // Appl. Biochem. Biotechnol. 2012. V. 168. P. 2218–2229.
- Coutinho P.M., Stam M., Blanc E., Henrissat B. Why are there so many carbohydrate-active enzyme-related genes in plants? // Trends Plant Sci. 2003. V. 8. P. 563–565.
- De Beul E., Jongbloet A., Franceus J., Desmet T. Discovery of a kojibiose hydrolase by analysis of specificity-determining correlated positions in glycoside hydrolase family 65 // Molecules. 2021. V. 26. Art. 6321.
- Dedysh S.N., Haupt E.S., Dunfield P.F. Emended description of the family *Beijerinckiaceae* and transfer of the genera *Chelatococcus* and *Camelimonas* to the family *Chelatococcaceae* fam. nov. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2016. V. 66. P. 3177–3182.
- Dedysh S.N., Naumoff D.G., Vorobev A.V., Kyrpides N., Woyke T., Shapiro N., Crombie A.T., Murrell J.C., Kalyuzhnaya M.G., Smirnova A.V., Dunfield P.F. Draft genome sequence of *Methyloferula stellata* AR4, an obligate methanotroph possessing only a soluble methane monooxygenase // Genome Announc. 2015. V. 3. Art. e01555-14.
- Drula E., Garron M.-L., Dogan S., Lombard V., Henrissat B., Terrapon N. The carbohydrate-active enzyme database: functions and literature // Nucl. Acids Res. 2022. V. 50 (Database issue). P. D571–D577. (<http://www.cazy.org/>).
- Haque M.F.U., Hernández M., Crombie A.T., Murrell J.C. Identification of active gaseous-alkane degraders at natural gas seeps // ISME J. 2022. V. 16. P. 1705–1716.
- Miroshnikov K.K., Didriksen A., Naumoff D.G., Huntemann M., Clum A., Pillay M., Palaniappan K., Varghese N., Mikhailova N., Mukherjee S., Reddy T.B.K., Daum C., Shapiro N., Ivanova N., Kyrpides N., Woyke T., Dedysh S.N., Svenning M.M. Draft genome sequence of *Methylocapsa palsarum* NE2^T, an obligate methanotroph from subarctic soil // Genome Announc. 2017. V. 5. Art. e00504-17.
- Mukherjee K., Narindoshvili T., Raushel F.M. Discovery of a kojibiose phosphorylase in *Escherichia coli* K-12 // Biochemistry. 2018. V. 57. P. 2857–2867.
- Naumoff D.G. Glycoside hydrolases encoded by the *Methyloferula stellata* genome // Glycoconjugate J. 2017. V. 34. N. S1. P. S96–S97. (https://www.researchgate.net/publication/328772143_Glycoside_hydrolases_encoded_by_the_Methyloferula_stellata_genome).
- <https://doi.org/10.1007/s10719-017-9784-5>
- Parks D.H., Chuvochina M., Waite D.W., Rinke C., Skarshewski A., Chaumeil P.-A., Hugenholtz Ph. A standardized bacterial taxonomy based on genome phylogeny substantially revises the tree of life // Nat. Biotechnol. 2018. V. 36. P. 996–1004.
- Rakitin A.L., Naumoff D.G., Beletsky A.V., Kulichevskaya I.S., Mardanov A.V., Ravin N.V., Dedysh S.N. Complete genome sequence of the cellulolytic planctomycete *Telmatocola sphagniphila* SP2^T and characterization of the first cellulolytic enzyme from planctomycetes // Syst. Appl. Microbiol. 2021. V. 44. Art. 126276.
- Stam M.R., Danchin E.G., Rancurel C., Coutinho P.M., Henrissat B. Dividing the large glycoside hydrolase family 13 into subfamilies: towards improved functional annotations of α-amylase-related proteins // Protein Eng. Des. Sel. 2006. V. 19. P. 555–562.
- Tamas I., Smirnova A.V., He Z., Dunfield P.F. The (d)evolution of methanotrophy in the *Beijerinckiaceae* – a comparative genomics analysis // ISME J. 2014. V. 8. P. 369–382.
- Vorobev A.V., Baani M., Doronina N.V., Brady A.L., Liesack W., Dunfield P.F., Dedysh S.N. *Methyloferula stellata* gen. nov., sp. nov., an acidophilic, obligately methanotrophic bacterium possessing only a soluble methane monooxygenase // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2011. V. 61. P. 2456–2463.
- Yamamoto T., Maruta K., Mukai K., Yamashita H., Nishimoto T., Kubota M., Fukuda S., Kurimoto M., Tsujisaka Y. Cloning and sequencing of kojibiose phosphorylase gene from *Thermoanaerobacter brockii* ATCC35047 // J. Biosci. Bioeng. 2004. V. 98. P. 99–106.
- Yamamoto T., Nishio-Kosaka M., Izawa S., Aga H., Nishimoto T., Chaen H., Fukuda S. Enzymatic properties of recombinant kojibiose phosphorylase from *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* ATCC43494 // Biosci. Biotechnol. Biochem. 2011. V. 75. P. 1208–1210.
- Yu S., Su T., Wu H., Liu S., Wang D., Zhao T., Jin Z., Du W., Zhu M.J., Chua S.L., Yang L., Zhu D., Gu L., Ma L.Z. PslG, a self-produced glycosyl hydrolase, triggers biofilm disassembly by disrupting exopolysaccharide matrix // Cell Res. 2015. V. 25. P. 1352–1367.

Glycoside Hydrolases of the Obligate Methanotroph *Methyloferula stellata*: an Unusual Evolutionary Strategy not Involving Distant Lateral Transfers

D. G. Naumoff¹, * and S. N. Dedysh¹

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

*e-mail: daniil_naumoff@yahoo.com

Received November 21, 2022; revised December 8, 2022; accepted December 9, 2022

Abstract—The genome of the obligately methanotrophic bacterium *Methyloferula stellata* AR4 encodes thirty glycoside hydrolases. The closest homologues for most of these proteins belong to other members of the class *Alphaproteobacteria*. Two exceptions are represented by the genes encoding glycoside hydrolases of the families GH39 and GH65, which presumably appeared in *M. stellata* AR4 due to the lateral transfer from distantly related bacteria. This work was devoted to the study of the evolutionary history of these two genes. In the case of a member of the GH65 family of glycoside hydrolases, this scenario was not confirmed. Kojibiose phosphorylase encoded by this gene is common among *Alphaproteobacteria*. The suggested lateral transfer of the corresponding gene had an opposite direction, into one of the evolutionary lineages of the class *Betaproteobacteria*. The potential glycoside hydrolase of the GH39 family was shown to be the only one which gene is not of proteobacterial origin. The role of lateral transfers in the evolution of glycoside hydrolases and their homologues in methanotrophs and other bacteria is discussed.

Keywords: glycoside hydrolase, glycoside phosphorylase, GH39 family, GH65 family, methanotrophs, *Methyloferula stellata*, *Beijerinckiaceae*, *Burkholderiaceae*, protein phylogenetic tree, protein evolution, lateral gene transfer, search for homologues, gene annotation

АНАЭРОБНЫЕ *THERMODESULFOVIBRIO* И АЭРОБНЫЕ *MEIOTHERMUS*
СОСУЩЕСТВУЮТ В ГЛУБИННОЙ ТЕРМАЛЬНОЙ ВОДЕ© 2023 г. А. П. Лукина^а, В. В. Кадников^б, И. И. Русанов^с, М. Р. Авакян^а, А. В. Белецкий^б,
А. В. Марданов^б, Н. В. Пименов^с, Н. В. Равин^б, О. В. Карначук^{а, *}^а Лаборатория биохимии и молекулярной биологии, Томский государственный университет, Томск, 634050 Россия^б Институт биоинженерии им. К.Г. Скрябина, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, 119071 Россия^с Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, 119071 Россия

*e-mail: olga.karnachuk@green.tsu.ru

Поступила в редакцию 09.12.2022 г.

После доработки 13.12.2022 г.

Принята к публикации 13.12.2022 г.

Изучение микроорганизмов, обитающих в подземных водоносных горизонтах, основано на отборе проб воды, поступающих из глубинных скважин, и редко учитывает физико-химические процессы в системе вода–порода. Остается неясным, как метаболизируют аэробные прокариоты, обнаруживаемые под землей молекулярными методами. Для прямого определения отношения прокариот к кислороду необходимо культивирование. В настоящем исследовании проведено целевое выделение аэробных и анаэробных бактерий, обнаруженных в термальных радоновых водах на курорте Белокуриха молекулярными методами. Профилирование по гену 16S рПНК выявило доминирование представителей группы *Deionococcus–Thermus*, относящихся к роду *Meiothermus* (17.6% чтений) и считающихся строгими аэробами. Одновременно в воде присутствовали анаэробные сульфатредуцирующие *Thermodesulfovibrio*. Вода характеризовалась восстановительными и щелочными условиями. Целевое культивирование позволило выделить растущий аэробно *Meiothermus* sp. 1165, являющийся близким родственником *Meiothermus cerebeus*. Одновременно выделен алкалофильный анаэробный сульфатредуктор *Thermodesulfovibrio* sp. 1176. Измерение в воде Белокурихи интенсивности сульфатредукции с $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ продемонстрировало активный процесс, протекающий со скоростью 41.4 ± 1.06 мкг $\text{S}_{\text{восст}}/\text{л}/\text{сут}$ (1.29 нмоль S/мл/сут). Анализ генома штамма 1176 выявил присутствие различных механизмов, обеспечивающих относительную устойчивость к кислороду и окислительному стрессу и включающих супероксид редуктазу, рубредоксин, супероксид дисмутазу Fe-Mn семейства, каталазу-пероксидазу KatG и цитохром *bd* убихинол оксидазу. Низкий окислительно-восстановительный потенциал и интенсивный процесс анаэробной сульфатредукции подтверждают, что, в целом, подземные горизонты в Белокурихе характеризуются восстановительными условиями. Можно предположить пространственное разобщение аэробов и анаэробов в системе вода–порода, как это происходит в наземных микробных матах, а также протекание аэробных процессов в микрозонах.

Ключевые слова: подземная биосфера, аэробные и анаэробные прокариоты, сульфатредуцирующие бактерии, *Meiothermus*, *Thermodesulfovibrio*

DOI: 10.31857/S0026365622600833, **EDN:** FWKVNZ

Современные оценки предполагают, что 15% всей биомассы Земли приходится на обитающих в подземных горизонтах бактерий и архей (Var-On et al., 2018). Микроорганизмы подземных водоносных горизонтов остаются наименее изученной частью микробиоты планеты, прежде всего, в силу малой доступности подземных местообитаний для исследований. Отбор проб водоносных горизонтов возможен через глубинные скважины, которые образно называют “окнами в подземный мир” (Pedersen, 2000). Особое значение имеют артезианские скважины, из которых вода

поступает под давлением, что исключает возможность контаминации наземными микроорганизмами. Однако один только отбор проб воды недостаточен для понимания активности прокариот, связанной с физическими и геологическими характеристиками биотопов. Подземные горизонты представляют насыщенные водой проницаемые породы. Взаимодействие вода–порода является важным фактором, определяющим распространение и активность прокариот. Современные исследования показывают, что минеральная компонента, например, содержание глины, влияет на

скорость роста различных таксонов бактерий в почве (Finley et al., 2022). Увеличение содержания минералов ближнего порядка (аллофана, имоголита, ферригидрита) угнетало рост бактерий. Одна из нерешенных загадок “подземной биосферы” — вопрос о возможности присутствия кислорода в глубинных слоях и использования его аэробными микробами. Традиционно считают, что глубинные горизонты изолированы от атмосферы и характеризуются восстановительными и олиготрофными условиями (Lovley, Chapelle, 1995; Kieft et al., 2005). В условиях “подземной биосферы” энергетический метаболизм ограничивается анаэробным дыханием и брожением.

В предварительных исследованиях термальной воды из подземных водоносных горизонтов, используемых в бальнеологических целях на курорте Белокуриха (Алтайский край), мы обнаружили, что значительную часть микробного сообщества составляет группа *Deionococcus*—*Thermus*, для которых предпочтительным является аэробный метаболизм. Одновременно вода характеризовалась отрицательными значениями окислительно-восстановительного потенциала и присутствием сульфатредуцирующих бактерий, включая *Thermodesulfovibrio*. Молекулярное профилирование сообщества прокариот позволяет определить таксономическое положение флотипов и определить их возможное отношение к присутствию/отсутствию кислорода в среде. Однако для окончательного подтверждения характера роста необходимы эксперименты с культурами.

Настоящее исследование посвящено целевому культивированию доминирующих флотипов бактерий, совмещенному с параллельным профилированием сообщества прокариот по гену 16S рРНК, и выяснению особенностей метаболизма путем измерения скорости процесса сульфатредукции и анализа генома.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Отбор проб, измерение физико-химических характеристик. Отбор проб воды проводили из скважины, обозначаемой 4Э и используемой в качестве источника минеральной радоновой воды на курорте Белокуриха. Пробы были отобраны дважды; для молекулярного анализа использовали воду, отобранную 08.08.2019. Для культивирования, измерения скорости сульфатредукции и параллельного молекулярного анализа пробы воды были отобраны 13.08.2021. Пробы воды отбирали на месте излива скважины 4Э. Физико-химические параметры воды, рН, температуру и окислительно-восстановительный потенциал измеряли рН-метром HI18314F (“Hanna Instruments”, Германия). Элементный состав воды определяли масс-спектрометрией с индуктивно связанной

плазмой, как описано ранее (Карначук и соавт., 2015).

Измерение скорости сульфатредукции. Для измерения скорости сульфатредукции в условиях, приближенных к *in situ*, пробы воды разливали в пенициллиновые флаконы объемом 30 мл и закрывали резиновой пробкой без доступа воздуха. Аликвоты (300 мкл) $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ (4 мкКи; “Perkin-Elmer”, США) вносили в пенициллиновые флаконы шприцем через резиновую пробку. Все измерения скорости сульфатредукции проводили в трех повторностях. Инкубировали флаконы в течение 24 ч при температуре 42°C, после чего фиксировали 1 мл 1 N раствора КОН. В лаборатории проводили разделение восстановленных форм серы кислотной перегонкой (кислотно-растворимые сульфиды) и восстановлением CrCl_2 (элементная, пиритная и органическая сера), как описано ранее (Карначук и соавт., 2006).

Выделение чистых культур. Для культивирования концентрировали инокулят путем фильтрования через мембранный фильтр с диаметром пор 0.22 мкм. Для получения накопительных культур аэробных представителей группы *Deionococcus*—*Thermus* были использованы среды DSMZ256, DSMZ86 и DSMZ1004. Получение накопительных культур проводили на агаризованной среде DSMZ256, DSMZ86 и жидкой среде DSMZ1004. Накопительные культуры инкубировали при температуре 45, 50, 55 и 60°C.

Среда DSMZ1004 была модифицирована добавлением 1 мл/л раствора микроэлементов по Волину (Modified Wolin’s mineral solution, DSMZ141) и 2 мл/л раствора витаминов по Видделю (Widdel, Bak, 1992). Также вносили 1 мл/л раствор селената и вольфрамата и 2 мл/л раствора сульфида натрия по Видделю—Баку (Widdel, Bak, 1992). В качестве донора электронов использовали глюкозу (10 мМ); рН среды доводили раствором NaHCO_3 (8%) до 7.5.

Для получения культуры *Thermodesulfovibrio* использовали пресноводную среду Видделя—Бака (Widdel, Bak, 1992), содержащую (в г/л): Na_2SO_4 — 4, KH_2PO_4 — 0.2, NH_4Cl — 0.25, NaCl — 1, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ — 0.4, KCl — 0.5, CaCl_2 — 0.113, 2 мл раствора витаминов, 1 мл раствора микроэлементов, по 1 мл раствора Na_2SeO_3 и Na_2WO_4 . Формиат (7.5 мМ) и ацетат (9 мМ) использовали в качестве донора электронов и $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ — в качестве восстановителя.

Для определения филогенетического положения изолятов секвенировали ген 16S рРНК, амплифицированный с праймерами 27F-1492R. Выделение ДНК и условия амплификации аналогичны описанным ранее (Frank et al., 2016). Последовательности генов 16S рРНК штаммов *Thermodesulfovibrio* sp. 1176 и *Meiothermus* sp. 1165 депонированы

ны в GenBank NCBI под номерами OP919603 и OP926023 соответственно.

Анализ состава микробного сообщества. Образцы воды (объемом 50 л) фильтровали через фильтр с диаметром пор 0.22 мкм. Фильтры гомогенизировали, растирая с жидким азотом; препарат метагеномной ДНК выделяли с помощью Power Soil DNA Isolation Kit (“MO BIO Laboratories Inc.”, Carlsbad, США).

Состав сообщества прокариот определяли на основании анализа последовательностей варибельного региона V3–V4 гена 16S рРНК, амплифицированного с помощью ПЦР с использованием праймеров PRK341F (5'-CCTACGGGRBGCASCAG-3') и PRK806R (5'-GGACTACYVGGGTATCTAAT-3'). Полученные ПЦР фрагменты использовали для приготовления библиотеки для секвенирования с помощью набора Nextera XT DNA Library Prep Kit (“Illumina”, США) по протоколам производителя. Полученную библиотеку секвенировали на MiSeq (“Illumina”) с использованием набора MiSeq Reagent Kit v.3 (в формате парных чтений, 2 × 300 нт). Полученные пересекающиеся чтения объединяли с помощью программы FLASH v 1.2.11 (Magoč, Salzberg, 2011). В результате для образцов 2019 г. и 2021 г. было получено 137780 и 13979 последовательностей фрагментов генов 16S рРНК соответственно.

Последовательности фрагментов генов 16S рРНК кластеризовали в операционные таксономические единицы (ОТЕ) на уровне 97% идентичности с помощью программы USEARCH v. 11 (Edgar, 2010). Прочтения низкого качества, химерные последовательности и синглтоны удалялись алгоритмами USEARCH. Чтобы рассчитать относительные представленности ОТЕ, все полученные чтения были картированы на ОТЕ с глобальным порогом идентичности 97% с помощью USEARCH. Таксономическую классификацию ОТЕ проводили по базе последовательностей рРНК SILVA v. 138 с использованием алгоритма VSEARCH v. 2.14.1 (Rognes et al., 2016).

Полученные последовательности фрагментов генов 16S рРНК депонированы в базу NCBI Sequence Read Archive (SRA) под номерами SRRXXXXX (образец 2019 г.) и SRRXXXXX (образец 2021 г.).

Секвенирование генома штамма *Thermodesulfovibrio* sp. 1176. Геномную ДНК выделяли с использованием набора Power Soil (“MO BIO Laboratories”, Carlsbad, CA, США) и секвенировали с использованием платформы Illumina MiSeq. Библиотеку готовили с использованием набора NEBNext Ultra II (“New England BioLabs”, Ipswich, MA, США). В результате секвенирования этой библиотеки на Illumina MiSeq с использованием реагентов MiSeq Reagent Kit v.3 (в формате парных чтений, 2 × 300 нт) получено 1051896 чтений.

Перекрывающиеся парные чтения были объединены с помощью FLASH v1.2.11 (Magoč, Salzberg, 2011), а последовательности с низким качеством были удалены с помощью Sickle v1.33 (<https://github.com/najoshi/sickle/>). Чтения Illumina собирали в контиги с помощью SPAdes v.3.11.1 (Nurk et al., 2013). Поиск и аннотацию генов проводили с помощью сервера RAST (Brettin et al., 2015). Полноту драфт генома оценивали с помощью программы CheckM (Parks et al., 2015).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Физико-химические характеристики воды из скважины 4Э и скорость сульфатредукции. Температура воды скважины 4Э в момент отбора проб 08.08.2019 составляла 38.0°C, рН – 9.12 (табл. 1). Измеренный окислительно-восстановительный потенциал, –40 мВ, мог быть несколько завышен в силу того, что из-за конструкции подводных путей не было возможности провести измерения непосредственно на изливе скважины. Измерения проводили в бутылки с пробой воды. Концентрация сульфата в воде изменялась от 88.6 мг/л в 2019 г., до 57.0 мг/л – в 2021 г. Заметной особенностью микроэлементного состава воды была высокая концентрация вольфрама, достигавшая 140 мкг/л. Также высокой была концентрация молибдена, составлявшая 38 мкг/л.

Средняя скорость сульфатредукции, измеренная в пробах воды в августе 2021 г., составляла 41.4 ± 1.06 мкг $S_{\text{восст}}/л/сут$ (1.29 нмоль S/мл/сут). Большая часть (92.5%) восстановленной серы находилась в форме сероводорода (кислоторастворимая сера, КРС). Остальная часть метки находилась в форме серы, восстанавливаемой $CrCl_3$ (ХВС), которая может включать пирит (FeS_2), элементную и органическую серу.

Состав микробного сообщества. В микробном сообществе воды, отобранной из скважины 4Э в 2019 г., доминировали бактерии, доля архей составляла лишь 0.3% всех последовательностей генов 16S рРНК. На уровне филумов доминировали представители *Proteobacteria* (32.5%), *Deinococcota* (18.5%), *Candidatus Eremiobacterota* (13.8%), *Chloroflexi* (10.3%), *Patescibacteria* (6.8%), *Actinobacteriota* (4.2%), *Armatimonadota* (3.4%), *Planctomycetota* (2.6%), *Acidobacteriota* (2.5%), *Bacteroidota* (1.6%); доли остальных линий уровня филума не превышали 1% (рис. 1).

Большинство протеобактерий представляли классы альфа (24.3%) и гамма (8.2%). Наиболее многочисленная ОТЕ альфапротеобактерий, представлявшая 9.9% сообщества, имела 97.6%-ю гомологию последовательности гена 16S рРНК с *Parvibaculum lavamentivorans*, – аэробной гетеротрофной бактерией, идентифицированной в сточных водах (Schleheck et al., 2004). Также среди

Таблица 1. Физико-химические параметры воды скважины 4Э

Параметры и единицы измерения	Значения
pH	9.12
Температура, °С	38.0
Еh, мВ	–40
Содержание в воде, мг/л:	
SO ₄ ²⁻	88.6
Cl ⁻	11.3
NO ₃ ⁻	4.6
F ⁻	17.6
Na	69.3
Mg	0.0017
Ca	2.75
Si	26.2
K	1.06
Sr	0.070
W	0.140
Mo	0.038
Cs	0.030
B	0.29
Li	0.50
Fe	<0.02
Ba	0.00025
Se	0.00083
P	<0.2
Rb	0.012
Mn	0.000068
Al	0.0024
Ge	0.0050
Zn	0.0013
Cr	<0.0005
As	0.0026

альфапротеобактерий были обнаружены представители порядков *Caulobacterales* (2.0%), *Rhizobiales* (3.4%), *Rhodobacterales* (1.6%), *Sphingomonadales* (5.5%), *Acetobacterales* (0.3%) и *Azospirillales* (0.4%). На уровне рода были идентифицированы *Brevundimonas* (1.8%), *Rubellimicrobium* (1.3%), *Novosphingobium* (2.4%), *Sphingomonas* (2.9%), среди культивируемых представителей которых преобладают аэробные гетеротрофы, встречающиеся в почвах и водоемах (Dastager et al., 2008; Asaf et al., 2020; Liu et al., 2021). Среди гаммапротеобактерий были обнаружены семейства *Comamonadaceae* (2.3%) и *Hydrogenophilaceae* (5.4%); последнее включало род *Thiobacillus* (3.8%) и неклассифицируемые на

уровне рода филотипы. Представители *Thiobacillus* являются хемолитоавтотрофами, способными окислять железо или восстановленные соединения серы (Rawlings, Kusano, 1994).

Во втором по относительной численности филуме, *Deinococcota*, доминировал род *Meiothermus* (17.6%), наиболее многочисленный филотип которого (15.4%) был близок к *Meiothermus ruber* (99.1% идентичности по 16S рРНК). Представители этого рода – умеренно термофильные гетеротрофы, встречающиеся в термальных водах, включая подземные (Tindall et al., 2010). Около 0.9% сообщества составляли представители семейства *Deinococcaceae*.

Третья по численности линия, кандидатный филум *Eremiobacterota* (WPS-2), был представлен одной ОТЕ. Этот филум включает представителей с разнообразными путями метаболизма, включая аноксигенный фотосинтез, автотрофный рост за счет окисления атмосферного водорода и СО, анаэробное дыхание и органотрофию (Ji et al., 2021).

Около 6.8% сообщества составляют *Patescibacteria*, большая часть которых относится к одной ОТЕ кандидатного класса WWE3 (по таксономии Silva). Возможно, реальное содержание *Patescibacteria* даже выше, поскольку из-за небольших размеров клеток представителей этого филума часть их может теряться при использовании для сбора биомассы 0.2 мкм фильтра (Herrmann et al., 2019). Представители *Patescibacteria* характерны для грунтовых вод и преимущественно распространены в бескислородных средах, реже встречаются в подземных водах, содержащих кислород (Nelson, Stegen, 2015). *Patescibacteria* обладают небольшими геномами (обычно менее ~1 млн нт) и лишены многих ключевых биосинтетических путей (Brown et al., 2015). Предположительно, *Patescibacteria* являются паразитами или симбионтами других микроорганизмов (Ji et al., 2022).

Остальные филумы бактерий были в основном представлены линиями гетеротрофов, характерных для почв и подземных вод. Это *Chloroflexi* (в основном класс *Anaerolineae*), *Actinobacteria* (в основном *Corynebacteriales*, *Micrococcales* и *Solirubrobacterales*), *Armatimonadetes* (*Fimbriimonadales*), *Planctomycetes* (*Phycisphaerales*, *Gemmatales* и *Isosphaerales*), *Acidobacteria* (*Bryobacteriales* и *Blastocatellales*) и *Bacteroidota*.

Среди известных линий диссимиляционных сульфатредукторов были детектированы представители порядка *Desulfitobacterales* филума *Firmicutes*, – *Desulfosporosinus*, *Desulfotomaculum* и *Desulfurispora*, но их суммарная доля составляла менее 0.02%. Около 0.03% сообщества представлял ‘*Desulforudis audaxviator*’, – эндемичная для глубинной подземной биосферы бактерия, ранее выделенная нами из подземных вод Западно-Сибирского региона (Karnachuk et al., 2019). Потенциальными

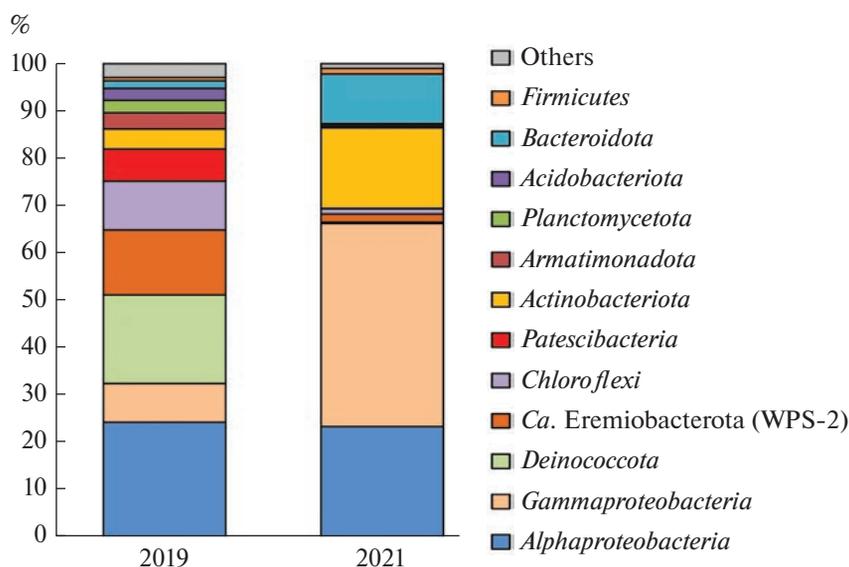


Рис. 1. Состав микробного сообщества на уровне филумов по данным профилирования гена 16S рРНК в 2019 и 2021 гг.

сульфатредукторами также могут быть представители класса *Thermodesulfovibrionia* филума *Nitrospirota* (0.6% сообщества), который включает термофильных сульфатредукторов рода *Thermodesulfovibrio*. Однако детектированные ОТЕ были филогенетически удалены от культивируемых *Thermodesulfovibrio* и не были классифицированы даже на уровне порядка. Отметим, что известные сульфатредукторы филума *Desulfio bacterota* не были обнаружены.

Микробное сообщество воды, отобранной в 2021 г., содержало те же основные таксономические группы микроорганизмов, хотя их соотношения заметно отличались. Преобладали представители трех филумов *Proteobacteria* (66.3%, в основном класса гамма), *Actinobacteriota* (17.1%) и *Bacteroidota* (10.5%), доли филумов *Deinococcota*, *Candidatus Eremiobacterota*, *Chloroflexi* и *Patescibacteria* были намного ниже, чем в образцах 2019 г. (0.3, 1.7, 1.1 и 0.03% соответственно). Наиболее многочисленный филотип 2021 г. (21.9%), представляющий род *Cavicella* семейства *Moraxellaceae*, не был детектирован в 2019 г. Представитель этого рода, *Cavicella subterranea*, является органотрофным аэробом и был выделен из подземного водоносного горизонта глубиной 150 м в Португалии (França et al., 2015). Второй по численности филотип, актинобактерии рода *Dietzia*, представители которого могут окислять углеводороды (Ali et al., 2022), составляли 16.7% сообщества в 2021 г. и лишь 0.7% в 2019 г. Тем не менее, представители рода *Meiothermus* и неклассифицируемые *Thermodesulfovibrionia* были обнаружены и в образцах 2021 г., составляя, соответственно, 0.3 и 0.2% сообщества.

Выделение чистых культур. Учитывая результаты профилирования по гену 16S рРНК, полученные в 2019 г., целевыми филотипами для выделения в культуру были выбраны аэробные *Meiothermus* и строго анаэробные *Thermodesulfovibrio*. Для получения накопительных культур аэробных *Meiothermus* была использована среда DSMZ256, содержащая пептон и крахмал, и DSMZ86, содержащая триптон. Однако рост на агаризованной среде в условиях температур от 45 до 60°C отсутствовал. Одновременно наблюдали присутствие морфологически однородных палочковидных клеток, образующих тяжи, на среде DSMZ1004 с глюкозой для *Chloroflexi* при культивировании в анаэробных условиях при температуре 50°C. Последующее культивирование накопительной культуры в аэробных условиях на качалке (160 об./мин) на модифицированной среде DSMZ1004 привело к выделению чистой культуры, обозначенной как штамм 1165. Филогенетический анализ последовательности гена 16S рРНК штамма 1165 показал, что он относится к роду *Meiothermus* (рис. 2). Ближайшими родственниками являются *Meiothermus cerbereus* и *Meiothermus ruber* со сходством последовательностей гена 16S рРНК 99.13 и 97.8% соответственно. Штамм рос в узком диапазоне температур от 40 до 50°C, оптимальная температура роста составляла 50°C. При росте на жидкой среде штамм 1165 мог использовать в качестве субстрата крахмал, глюкозу, сахарозу, фруктозу, триптон, пептон и соевый пептон.

Целевое выделение *Thermodesulfovibrio* проводили на пресноводной среде Видделя—Бака с форматом и ацетатом в качестве донора электронов и источника углерода и сульфитом в качестве акцептора, при 70°C; pH среды увеличивали до 8.5 с учетом

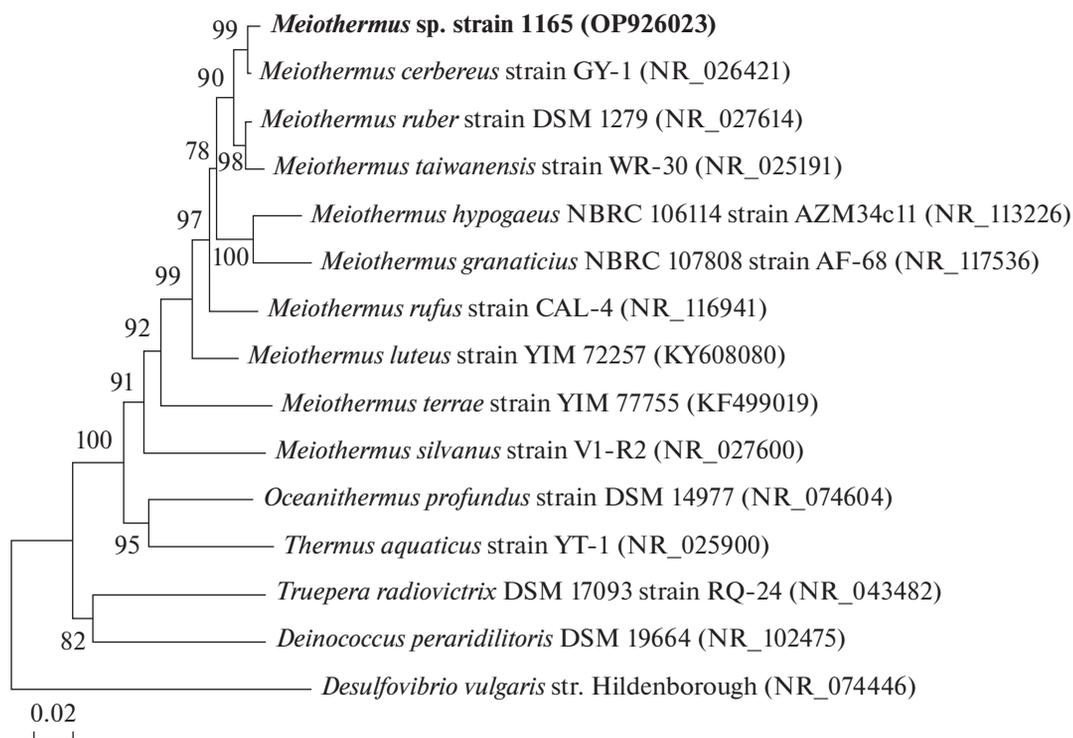
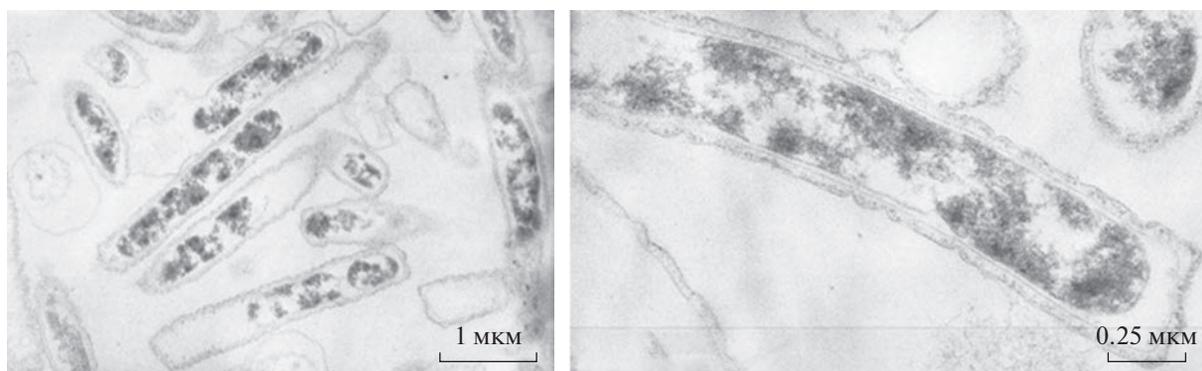


Рис. 2. Микрофотографии ультратонких срезов клеток и дерево, показывающее филогенетическое положение штамма *Meiothermus* sp. 1165 на основе анализа последовательностей гена 16S рРНК, определенное методом Neighbor-Joining. Бутстреппы рассчитаны из 1000 итераций.

щелочной реакции среды в термальной воде. Полученный сульфидоген был обозначен как штамм 1176. Филогенетический анализ последовательности гена 16S рРНК штамма 1176 подтвердил, что бактерия относится к роду *Thermodesulfovibrio* (рис. 3). Ближайшим родственником штамма 1176 является алкалолотерантный *Thermodesulfovibrio* sp. N1, выделенный из термальных подземных вод мезозойских отложений в поселке Белый Яр Томской области (Frank et al., 2016). Проведенный анализ сходства нуклеотидных последовательностей геномов показал, что среднее сходство (ANI) штаммов 1176 и N1 составляет 99.13% и не превышает порог 95%, предложенный для разграничения видов (Chun et al., 2018). Молекулярные дан-

ные свидетельствуют о принадлежности штаммов N1 и 1176 к одному виду. Штамм 1176 рос в диапазоне температур от 37 до 65°C с оптимумом при 55°C. Штамм характеризовался широким диапазоном рН для роста от 5.5 до 12, с оптимумом 10.5.

Анализ генома *Thermodesulfovibrio* sp. 1176. Геном штамма *Thermodesulfovibrio* sp. 1176 был получен в виде 32 контигов суммарной длиной 2083381 нт. Полнота собранного драфт генома оценивается CheckM в 99.1%. Проведенный анализ сходства нуклеотидных последовательностей геномов показал, что ANI между геномами штаммов 1176 и N1 (GCA_001707915) составляет 99.61%, что указывает на их принадлежность к одному виду (Chun et al., 2018). В геноме предсказано 2222 белок-ко-

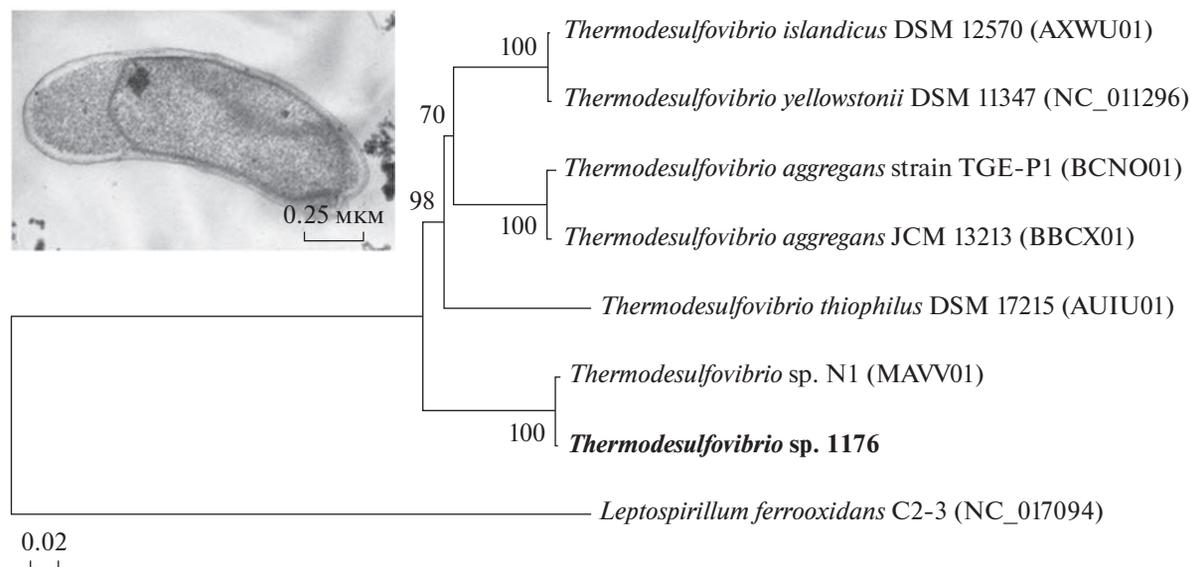


Рис. 3. Микрофотографии ультратонких срезов клеток и дерево, показывающее филогенетическое положение штамма *Thermodesulfovibrio* sp. 1176 на основе анализа конкатенированных аминокислотных последовательностей 120 однокопийных белков-маркеров. Дерево построено методом Neighbor-Joining. Бутстреппы рассчитаны из 1000 итераций. Неясные позиции были удалены для каждой пары последовательностей (pairwise deletion option). Общее количество позиций – 5040. Эволюционный анализ проведен в MEGA11.

дирующих гена, 3 гена рРНК и 46 генов транспортных РНК (тРНК). Сравнение геномов этих штаммов выявили минимальные отличия в наборах присутствующих у них генов; штамм-специфические гены, в основном, кодировали белки мобильных элементов и гипотетические белки с неизвестными функциями.

Анализ генома штамма 1176 показал, что он содержит набор генов диссимиляционной сульфат-редукции, включая сульфатаденил трансферазу, аденозин-фосфосульфат редуктазу ArgAB, мембранно-связанный электрон-транспортный комплекс QmoABC, диссимиляционную сульфитредуктазу DsrABC и ассоциированный с ней комплекс DsrMKJOP. Наличие поглощающей гидрогеназы и формиатдегидрогеназы указывает на возможность окисления водорода и формиата. Помимо сульфата, штамм 1176 может использовать в качестве акцепторов электронов нитрит и тиосульфат, о чем свидетельствует присутствие соответствующих мембранно-связанных оксидоредуктаз. В отличие от *T. yellowstonii*, *T. aggregans* и *T. islandicus*, у штамма 1176, как и у штамма N1, отсутствует нитрогеназа. Общим для штаммов 1176 и N1 адаптивным признаком, связанным с алкалофилией, является наличие мультисубъединичного Na^+/H^+ антипортера Mnh семейства.

У штамма 1176 имеются различные механизмы, которые могут обеспечивать его относительную устойчивость к кислороду и окислительному стрессу. Наряду с обычно встречающимися у анаэробов супероксид редуктазой и рубредокси-

ном, в геноме кодируются характерные для аэробов супероксиддисмутаза Fe-Mn семейства и каталаза-пероксидаза KatG, которые могут обеспечивать детоксификацию супероксид-радикала. Также у штамма 1176 имеется мембранно-связанная цитохром *bd* убухинол оксидаза. Эти ферменты имеют высокое сродство к кислороду (Jünemann, 1997) и могут обеспечивать не только защиту от окислительного стресса в микроаэробных условиях (Vogtsov et al., 2021), но и генерацию трансмембранного протонного градиента. Наряду с ферментативными механизмами, толерантность штамма 1176 к кислороду может обеспечиваться за счет внеклеточного полисахаридного матрикса. Его формирование возможно благодаря *bcsABZC*-оперону, кодирующему целлюлоз-синтазу. Помимо штамма 1176, это оперон имеется у родственного штамма N1 и у *T. aggregans* (Frank et al., 2016), но отсутствует у других видов *Thermodesulfovibrio*.

ОБСУЖДЕНИЕ

Молекулярный анализ термальной радоновой воды выявил присутствие как аэробных, так и анаэробных бактерий. Однако для окончательного подтверждения характера роста необходимы эксперименты с культурами. Несмотря на снижение численности *Meiothermus* в воде в 2021 г., представитель этого рода, штамм 1165, был успешно культивирован, и продемонстрирован его аэробный рост на сахарах и белках. *Meiothermus* sp. 1165 сохранял жизнеспособность и в анаэробных условиях. До последнего времени представителей

Meiothermus рассматривали как строго аэробных умеренно термофильных гетеротрофов (Habib et al., 2017). Некоторые представители *Meiothermus* могут использовать нитрат в качестве акцептора электронов. Достаточное для протекания нитратредукции количество NO_3^- (4.6 мг/л) обнаружено в воде скважины 4Э.

Представители *Meiothermus* устойчивы к радиации (Masurat et al., 2005). Авторы обнаружили биопленки *Meiothermus* внутри системы для хранения отходов отработанного ядерного топлива. Анализ по гену 16S рРНК показал, что *Meiothermus*, образующий микробные обрастания в радиоактивных местообитаниях, представляет удаленную ветвь внутри рода, но его ближайшим родственником является *M. cerbereus*. Дальнейшего описания бактерии не было проведено. Термальные воды курорта Белокуриха содержат радон и природную радиоактивность. Содержание радона в скважине 4Э составляет 5–8 нКи/л (Джабарова и соавт., 2016). Возможная устойчивость штамма 1165 к радиоактивности обуславливает его распространение в воде подземных горизонтов. Сходство последовательностей генов 16S рРНК штамма 1165 и *M. cerbereus* составляло 99.13% и превышало установленный порог для разграничения видов 98.7% (Kim et al., 2014). Вероятно, бактерия, выделенная из термальных вод в Белокурихе, представляет новый штамм *M. cerbereus*. Штамм 1165 отличается от типового штамма GY-1 активным ростом на жидкой среде, в то время как вид получил свое латинское название “*cerbereus*” из-за трудностей, связанных с выращиванием на жидкой среде (Chung et al., 1997). Штамм 1165 рос только на жидкой среде и не поддавался культивированию на агаризованных средах.

Несмотря на более ранние представления об отсутствии кислорода и существовании восстановленных условий в подземных горизонтах, последние исследования демонстрируют возможность существования низкого парциального давления O_2 . В частности, 0.42–2.3 мл/л растворенного O_2 было обнаружено в водах шахты по добыче золота в Южной Африке (Weinstein et al., 2019) на глубине 1.3 км. Из этого биотопа была выделена подземная нематода *Halicephalobus mephisto* (Borgonie et al., 2011). Нематода поддерживала аэробный метаболизм в условиях гипоксии при парциальном давлении кислорода всего 0.4 кПа. Авторы предполагают, что нематода питается населяющими глубинные слои прокариотами. Для поддержания энергетического метаболизма животное должно находиться в микробных биопленках, развивающихся во вмещающих породах. Наши исследования подземной термофильной спирохеты *Longineta margulisaе* предполагают возможность образования микробных обрастаний в глубинных водоносных горизонтах, аналогичных развивающимся в наземных условиях микробным матам (Karnachuk

et al., 2021). Прямые доказательства существования сестонных форм в подземной биосфере были получены при изучении колоннок фракционных пород (Wanger et al., 2006). Авторы наблюдали участки органического вещества и микроколонию клеток, связанные с породой в колонках фракционной зоны шахты Мпоненг в Южной Африке, в водах которой ранее был обнаружен ‘*Desulforudis audaxviator*’.

Несмотря на общепризнанный факт широкого распространения сульфатредуцирующих прокариот в термальных подземных водоносных горизонтах (Bell et al., 2020), измерение скорости процесса сульфатредукции в этих биотопах фактически не проводили. Нам известно единственное сообщение об определении скорости сульфатредукции с использованием радиоактивного сульфата в воде офолитов Самаил (Samail Ophiolite) в султанате Оман (Glombitza et al., 2021). Авторы провели измерение скорости процесса в воде, полученной из 12 скважин, глубиной от 78 до 472 м и температурой от 30.0 до 35.7°C. Скорость сульфатредукции была низкой, максимальная величина составляла 2.1 пмоль мл/сут, что было на три порядка меньше измеренной нами в воде Белокурихи. Интересно отметить, что профилирование микробного сообщества по гену 16S рРНК в водах офолитов выявило доминирование представителей *Meiothermus* (6.78% всех чтений) и *Thermodesulfovibrio* (5.33% всех чтений) (Rempfert et al., 2017). Подземную воду офолитов и изученную нами радоновую подземную воду объединяет щелочная реакция среды; рН в воде скважин офолитов Самаил изменялась в пределах от 7.6 до 11.4. *Meiothermus* также доминировали в щелочной термальной воде офолитов Замбала (Zambala) на Филиппинах (Woycheese et al., 2015), где они составляли 45% всего сообщества. Исследованные пробы воды характеризовались низкими значениями окислительно-восстановительного потенциала (от –194 до –580 мВ) и рН около 10.

Высокие концентрации вольфрама и молибдена, зафиксированные в воде скважины 4Э в Белокурихе, известны для геотермальных вод (Planer-Friedrich et al., 2020; Zhao et al., 2021). Интересно отметить, что оба металла являются важными кофакторами формилдегидрогеназ у классических сульфатредукторов *Desulfovibrionales* (Zhang, Gladyshev, 2008). Недавно на примере модельного *Desulfovibrio vulgaris* Heldenborough были описаны новые регуляторы транскрипции TaoR, контролирующие экспрессию транспортеров вольфрама и молибдена (Rajeev et al., 2018). Оба микроэлемента используются в питательных средах для выращивания сульфатредукторов (Widdel, Bak, 1992), и их доступность в подземной воде может быть дополнительным фактором, способствующим развитию СРБ.

Таким образом, наши результаты свидетельствуют в пользу существования гетерогенных

условий в глубинных водоносных горизонтах в Белокурихе, что обеспечивает одновременное присутствие аэробных *Meiothermus* и анаэробных *Thermodesulfovibrio*. Низкий окислительно-восстановительный потенциал и интенсивный процесс анаэробной сульфатредукции подтверждают, что, в целом, подземные горизонты характеризуются восстановительными условиями. Можно предположить пространственное разобщение аэробов и анаэробов в системе вода–порода, как это происходит в наземных микробных матах. Кроме того, выделенный нами *Thermodesulfovibrio* sp. 1176 может образовывать внеклеточные полисахариды, благодаря *bcsABZC* оперону, кодирующему целлюлоз-синтазу. Очевидно, что гетерогенность водоносных горизонтов может обеспечивать существование микроразнообразия, известных для морских осадков. Только в случае анаэробных водоносных горизонтов, характеризующихся восстановительными условиями, можно ожидать существование микроразнообразия с низким парциальным давлением кислорода.

БЛАГОДАРНОСТИ

Мы благодарим Андрея Александровича Миллера за помощь с электронной микроскопией и Эдуарда Владимировича Галажинского за поддержку и установление контактов на курорте Белокуриха.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Выделение чистой культуры *Meiothermus* sp. 1165 поддержано стипендией Президента РФ для молодых ученых в 2021–2023 гг. (СП-3706.2021.1 А.П.Л.). Отбор проб, определение физико-химических параметров воды, определение скорости сульфатредукции, культивирование и характеристика сульфидогенов поддержана Российским научным фондом (грант № 21-14-00114, О.В.К.). Молекулярный анализ состава сообщества и секвенирование генома штамма 1176 поддержано Российским научным фондом (грант № 22-14-00178, Н.В.Р.).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Отбор проб и определение физико-химических параметров воды проведен А.П. Лукиной, В.В. Кадниковым, И.И. Русановым, О.В. Карначук и Н.В. Равиным. Культивирование, получение чистых культур и их характеристика проведена А.П. Лукиной. Определение скорости сульфатредукции проводили И.И. Русанов и

Н.В. Пименов. Профилирование по гену 16S рРНК, определение последовательности и анализ генома проведен В.В. Кадниковым, А.В. Белецким и А.В. Мардановым. Филогенетический анализ проведен М.Р. Авакяном. Анализ данных и подготовка статьи выполнены О.В. Карначук и Н.В. Равиным. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Джабарова Н.К., Яковенко Э.С., Сидорина Н.Г., Коханенко А.А., Воробьев В.А., Зайцев А.А., Коваленко Т.С., Жиляков И.В.* Перспективы развития Белокурихинской курортной зоны Алтайского края // Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры. 2016. № 2. С. 43–47.
- Карначук О.В., Пименов Н.В., Юсупов С.К., Франк Ю.А., Пухакка Я.А., Иванов М.В.* Распределение, разнообразие и активность сульфатредуцирующих бактерий в водной толще озера Гек-Гель, Азербайджан // Микробиология. 2006. Т. 75. С. 101–109.
- Karnachuk O.V., Pimenov N.V., Yusupov S.K., Frank Yu.A., Puhakka Ya.A., Ivanov M.V.* Distribution, diversity, and activity of sulfate-reducing bacteria in the water column in Gek-Gel Lake, Azerbaijan // Microbiology (Moscow). 2006. V. 75. P. 82–89.
- Карначук О.В., Курганская И.А., Авакян М.Р., Франк Ю.А., Иккерт О.П., Филенко Р.А., Данилова Э.В., Пименов Н.В.* Ацидофильный *Desulfosporosinus* из окисленных отходов добычи металлов в Забайкальском крае // Микробиология. 2015. Т. 84. С. 595–605.
- Karnachuk O.V., Kurganskaya I.A., Avakyan M.R., Frank Ya.A., Ikkert O.P., Filenko R.A., Danilova E.V., Pimenov N.V.* An acidophilic *Desulfosporosinus* isolated from the oxidized mining wastes in the Transbaikalian area // Microbiology (Moscow). 2015. V. 84. P. 677–686.
- Ali N., Khanafar M., Al-Awadhi H.* Indigenous oil-degrading bacteria more efficient in soil bioremediation than microbial consortium and active even in super oil-saturated soils // Front. Microbiol. 2022. V. 13. Art. 950051.
- Asaf S., Numan M., Khan A.L., Al-Harrasi A.* *Sphingomonas*: from diversity and genomics to functional role in environmental remediation and plant growth // Crit. Rev. Biotechnol. 2020. V. 40. P. 138–152.
- Bar-On Y.M., Phillips R., Milo R.* The biomass distribution on Earth // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2018. V. 115. P. 6506–6511.
- Bell E., Lamminmäki T., Alneberg J., Andersson A.F., Qian C., Xiong W., Hettich R.L., Fruttschi M., Bernier-Latmani R.* Active sulfur cycling in the terrestrial deep subsurface // ISME J. 2020. V. 14. P. 1260–1272.
- Borgonie G., García-Moyano A., Lithauer D., Bert W., Bester A., van Heerden E., Möller C., Erasmus M., Onstott T.C.* Nematoda from the terrestrial deep subsurface of South Africa // Nature. 2011. V. 474. P. 79–82.
- Borisov V.B., Siletsky S.A., Nastasi M.R., Forte E.* ROS defense systems and terminal oxidases in bacteria // Antioxidants (Basel). 2021. V. 10. Art. 839.
- 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. 3rd, 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. Art. 8365.
- Brown C.T., Hug L.A., Thomas B.C., Sharon I., Castelle C.J., Singh A., Wilkins M.J., Wrighton K.C., Williams K.H., Banfield J.F. Unusual biology across a group comprising more than 15% of domain *Bacteria* // *Nature*. 2015. V. 523. P. 208.
- 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.
- Chung A.P., Rainey F., Nobre M.F., Burghardt J., da Costa M.S. *Meiothermus cerebereus* sp. nov., a new slightly thermophilic species with high levels of 3-hydroxy fatty acids // *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1997. V. 47. P. 1225–1230.
- Dastager S.G., Lee J.C., Ju Y.J., Park D.J., Kim C.J. *Rubellimicrobium mesophilum* sp. nov., a mesophilic, pigmented bacterium isolated from soil // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2008. V. 58. P. 1797–1800.
- Edgar R.C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST // *Bioinformatics* 2010. V. 26. P. 2460–2461.
- Finley B.K., Mau R.L., Hayer M., Stone B.W., Morrissey E.M., Koch B.J., Rasmussen C., Dijkstra P., Schwartz E., Hungate B.A. Soil minerals affect taxon-specific bacterial growth // *ISME J.* 2022. V. 16. P. 1318–1326.
- França L., Albuquerque L., da Costa M.S. *Cavicella subterranea* gen. nov., sp. nov., isolated from a deep mineral-water aquifer, and emended description of the species *Perlucidibacca piscinae* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2015. V. 65. P. 3812–3817.
- Frank Y.A., Kadnikov V.V., Lukina A.P., Banks D., Beletsky A.V., Mardanov A.V., Sen'kina E.I., Avakyan M.R., Karnachuk O.V., Ravin N.V. Characterization and genome analysis of the first facultatively alkaliphilic *Thermodesulfovibrio* isolated from the deep terrestrial subsurface // *Front. Microbiol.* 2016. V. 7. Art. 2000.
- Glombitza C., Putman L.I., Rempfert K.R., Kubo M.D., Schrenk M.O., Templeton A.S., Hoehler T.M. Active microbial sulfate reduction in fluids of serpentinizing peridotites of the continental subsurface // *Commun. Earth Environ.* 2021. V. 2. Art. 84.
- Habib N., Khan I.U., Hussain F., Zhou E.M., Xiao M., Dong L., Zhi X.Y., Li W.J. *Meiothermus luteus* sp. nov., a slightly thermophilic bacterium isolated from a hot spring // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2017. V. 67. P. 2910–2914.
- Herrmann M., Wegner C.E., Taubert M., Geesink P., Lehmann K., Yan L., Lehmann R., Totsche K.U., Küsel K. Predominance of *Cand.* Patescibacteria in groundwater is caused by their preferential mobilization from soils and flourishing under oligotrophic conditions // *Front. Microbiol.* 2019. V. 10. Art. 1407.
- Ji M., Williams T.J., Montgomery K., Wong H.L., Zaugg J., Berengut J.F., Bissett A., Chuvochina M., Hugenholtz P., Ferrari B.C. *Candidatus eremiobacterota*, a metabolically and phylogenetically diverse terrestrial phylum with acid-tolerant adaptations // *ISME J.* 2021. V. 15. P. 2692–2707.
- Ji Y., Zhang P., Zhou S., Gao P., Wang B., Jiang J. Widespread but poorly understood bacteria: Candidate Phyla Radiation // *Microorganisms*. 2022. V. 10. Art. 2232.
- Jünemann S. Cytochrome *bd* terminal oxidase // *Biochim. Biophys. Acta*. 1997. V. 1321. P. 107–127.
- Karnachuk O.V., Frank Y.A., Lukina A.P., Kadnikov V.V., Beletsky A.V., Mardanov A.V., Ravin N.V. Domestication of previously uncultivated *Candidatus Desulforudis audax* viator from a deep aquifer in Siberia sheds light on its physiology and evolution // *ISME J.* 2019. V. 13. P. 1947–1959.
- Karnachuk O.V., Lukina A.P., Kadnikov V.V., Sherbakova V.A., Beletsky A.V., Mardanov A.V., Ravin N.V. Targeted isolation based on metagenome-assembled genomes reveals a phylogenetically distinct group of thermophilic spirochetes from deep biosphere // *Environ. Microbiol.* 2021. V. 23. P. 3585–3598.
- Kieft T.L., McCuddy S.M., Onstott T.C., Davidson M., Lin L.-H., Mislowack B., Pratt L., Boice E., Lollar B.S., Lippmann-Pipke J., Pfiffner S.M., Phelps T.J., Gihring T., Moser D., van Heerden A. Geochemically generated, energy-rich substrates and indigenous microorganisms in deep, ancient groundwater // *Geomicrobiol. J.* 2005. V. 22. P. 325–335.
- Kim M., Oh H.S., Park S.C., Chun J. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2014. V. 64. P. 346–351.
- Liu L., Feng Y., Wei L., Zong Z. Genome-based taxonomy of *Brevundimonas* with reporting *Brevundimonas huaxiensis* sp. nov. // *Microbiol. Spectr.* 2021. V. 9. e0011121.
- Lovley D.R., Chapelle F.H. Deep subsurface microbial processes // *Rev. Geophys.* 1995. V. 33. P. 365–381.
- Magoc T., Salzberg S.L. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies // *Bioinformatics*. 2011. V. 27. P. 2957–2963.
- Masurat P., Fru E.C., Pedersen K. Identification of *Meiothermus* as the dominant genus in a storage system for spent nuclear fuel // *J. Appl. Microbiol.* 2005. V. 98. P. 727–740.
- Nelson W.C., Stegen J.C. The reduced genomes of *Parcubacteria* (OD1) contain signatures of a symbiotic lifestyle // *Front. Microbiol.* 2015. V. 6. Art. 713.
- Nurk S., Bankevich A., Antipov D., Gurevich A.A., Korobeynikov A., Lapidus A., Pribelski A.D., Pyshkin A., Sirotkin A., Sirotkin Y., Stepanauskas R., Clingenpeel S.R., Woyke T., McLean J.S., Lasken R., Tesler G., Alekseyev M.A., Pevzner P.A. Assembling single-cell genomes and mini-metagenomes from chimeric MDA products // *J. Comput. Biol.* 2013. V. 20. P. 714–737.
- Parks D.H., Imelfort M., Skennerton C.T., Hugenholtz P., Tyson G.W. CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes // *Genome Res.* 2015. V. 25. P. 1043–1055.
- Pedersen K. Exploration of deep intraterrestrial microbial life: current perspectives // *FEMS Microbiol. Lett.* 2000. V. 185. P. 9–16.
- Planer-Friedrich B., Forberg J., Lohmayer R., Kerl C.F., Boeing F., Kaasalainen H., Stefánsson A. Relative abundance of thiolated species of As, Mo, W, and Sb in hot springs of Yellowstone National Park and Iceland // *Environ. Sci. Technol.* 2020. V. 54. P. 4295–4304.
- Rajeev L., Garber M.E., Zane G.M., Price M.N., Dubchak I., Wall J.D., Novichkov P.S., Mukhopadhyay A., Kazakov A.E. A new family of transcriptional regulators of tungstoenzymes and molybdate/tungstate transport // *Environ. Microbiol.* 2019. V. 21. P. 784–799.
- Rawlings D.E., Kusano T. Molecular genetics of *Thiobacillus ferrooxidans* // *Microbiol. Rev.* 1994. V. 58. P. 39–55.

- Rempfert K.R., Miller H.M., Bompard N., Nothhaft D., Matter J.M., Kelemen P., Fierer N., Templeton A.S. Geological and geochemical controls on subsurface microbial life in the Samail Ophiolite, Oman // *Front. Microbiol.* 2017. V. 8. Art. 56.
- Rognes T., Flouri T., Nichols B., Quince C., Mahé F. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics // *Peer J. Preprints.* 2016. V. 4. e2409v1.
- Schleheck D., Tindall B.J., Rosselló-Mora R., Cook A.M. *Parvibaculum lavamentivorans* gen. nov., sp. nov., a novel heterotroph that initiates catabolism of linear alkylbenzene-sulfonate // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2004. V. 54. P. 1489–1497.
- Tindall B.J., Sikorski J., Lucas S., Goltsman E., Copeland A., Glavina Del Rio T., Nolan M., Tice H., Cheng J.F., Han C., Pitluck S., Liolios K., Ivanova N., Mavromatis K., Ovchinnikova G., Pati A., Fährnich R., Goodwin L., Chen A., Palaniappan K., Land M., Hauser L., Chang Y.J., Jeffries C.D., Rohde M., Göker M., Woyke T., Bristow J., Eisen J.A., Markowitz V., Hugenholtz P., Kyrpides N.C., Klenk H.P., Lapidus A. Complete genome sequence of *Meiothermus ruber* type strain (21) // *Stand. Genomic Sci.* 2010. V. 3. P. 26–36.
- Wanger G., Southam G., Onstott T.C. Structural and chemical characterization of a natural fracture surface from 2.8 kilometers below land surface: biofilms in the deep subsurface // *Geomicrobiol. J.* 2006. V. 23. P. 443–452.
- Weinstein D.J., Allen S.E., Lau M.C.Y., Erasmus M., Asalone K.C., Walters-Conte K., Deikus G., Sebra R., Borgonie G., van Heerden E., Onstott T.C., Bracht J.R. The genome of a subterrestrial nematode reveals adaptations to heat // *Nat. Commun.* 2019. V. 10. Art. 5268.
- Widdel F.F., Bak R. Gram negative mesophilic sulfate reducing bacteria // *The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications* / Eds. Balows A. et al. Berlin: Springer, 1992. P. 3352–3378.
- Woycheese K.M., Meyer-Dombard D.R., Cardace D., Argayosa A.M., Arcilla C.A. Out of the dark: transitional subsurface-to-surface microbial diversity in a terrestrial serpentinizing seep (Manleluag, Pangasinan, the Philippines) // *Front. Microbiol.* 2015. V. 6. Art. 44.
- Zhang Y., Gladyshev V.N. Molybdoproteomes and evolution of molybdenum utilization // *J. Mol. Biol.* 2008. V. 379. P. 881–899.
- Zhao Q., Guo Q., Luo L., Yan K. Tungsten accumulation in hot spring sediments resulting from preferred sorption of aqueous polytungstates to goethite // *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2021. V. 18. P. 12629.

Anaerobic *Thermodesulfovibrio* and Aerobic *Meiothermus* Coexist in Deep Thermal Water

A. P. Lukina¹, V. V. Kadniko², I. I. Rusanov³, M. R. Avakyan¹, A. V. Beletsky², A. V. Mardanov², N. V. Pimenov³, N. V. Ravin², and O. V. Karnachuk^{1, *}

¹Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology, Tomsk State University, Tomsk, 634050 Russia

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

³Winogradsky Institute of Microbiology, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

*e-mail: olga.karnachuk@green.tsu.ru

Received December 9, 2022; revised December 13, 2022; accepted December 13, 2022

Abstract—Research on the microorganisms inhabiting deep aquifers is based on sampling the water released from deep wells and is seldom concerned with the physicochemical processes of the water-rock system. The issue of metabolism of aerobic prokaryotes revealed in deep habitats by molecular techniques remains unclear. Cultivation is required for direct determination of relation of prokaryotes to oxygen. In the present work, aerobic and anaerobic bacteria, which were revealed in thermal radon baths of the Belokurikha resort by molecular techniques, were isolated. Profiling by the 16S rRNA gene revealed predominance of members of the *Deionococcus-Thermus* group belonging to the genus *Meiothermus* (17.6% reads) and considered strictly aerobic. Anaerobic sulfate-reducing *Thermodesulfovibrio* were also present in the sample. The habitat was characterized by reductive, alkaline conditions. Target-oriented cultivation revealed aerobically growing *Meiothermus* sp. 1165, which was closely related to *Meiothermus cerebeus*. An alkaliphilic anaerobic sulfate reducer *Thermodesulfovibrio* sp. 1176 was also isolated. The rate of sulfate reduction measured in the Belokurikha water using $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ yielded the value of $41.4 \pm 1.06 \mu\text{m S}_{\text{red}} \text{L}^{-1} \text{day}^{-1}$, or $1.29 \text{ nmol S mL}^{-1} \text{day}^{-1}$. Analysis of the genome of strain 1176 revealed the presence of various mechanisms responsible for its relative resistance to oxygen and oxidative stress, which included superoxide reductase, rubredoxin, a Fe-Mn family superoxide dismutase, a KatG catalase-peroxidase, and a cytochrome *bd* ubiquinol oxidase. The low redox potential and intense anaerobic sulfate reduction provide evidence for the generally reduced conditions in the Belokurikha deep horizons. Spatial separation of aerobes and anaerobes in the water-rock system, similar to the one occurring in the terrestrial microbial mats, may be hypothesized, as well as occurring of aerobic processes in microniches.

Keywords: deep biosphere, aerobic and anaerobic prokaryotes, sulfate-reducing bacteria, *Meiothermus*, *Thermodesulfovibrio*

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИ

ПОИСК НОВЫХ ГАЛОФИЛЬНЫХ И ГАЛОТОЛЕРАНТНЫХ
ПРОДУЦЕНТОВ АНТИМИКРОБНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В РАЗЛИЧНЫХ
ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ ЭКОСИСТЕМАХ

© 2023 г. С. Н. Гаврилов^{а, *}, А. С. Барашкова^б, Т. А. Чердынцева^с, М. И. Прокофьева^а,
О. В. Тресвятский^с, Д. А. Лукьянов^{д, е}, А. А. Никандрова^{с, е}, Т. Эртле^г, А. Ю. Меркель^а,
Е. А. Бонч-Осмоловская^{а, с}, Е. А. Рогожин^{б, г}

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

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

^сМГУ им. М.В. Ломоносова, Биологический факультет, Москва, 119234 Россия

^дМГУ им. М.В. Ломоносова, Химический факультет, Москва, 119234 Россия

^еЦентр наук о живом, Сколковский институт науки и технологий, Москва, 121205 Россия

^гInstitut National de Recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement, Нант, Франция

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

*e-mail: sngavrilov@gmail.com

Поступила в редакцию 15.12.2022 г.

После доработки 30.01.2023 г.

Принята к публикации 30.01.2023 г.

Проблема роста антибиотикорезистентности патогенных микроорганизмов в последнее время побудила повышенный интерес к поиску новых антимикробных соединений и их продуцентов. Среди них галофильные микроорганизмы рассматриваются в числе наиболее перспективных, поскольку в этой физиологической группе широко представлены актиномицеты, являющиеся источником большинства известных клинически значимых классов антибиотиков. Мы описываем результаты применения трех различных подходов к поиску новых антимикробных соединений у галофильных и галотолерантных микроорганизмов, населяющих три различных типа экстремальных экосистем. В результате анализа метагеномов микробных сообществ подземных термальных минеральных вод нами выявлены кластеры биосинтеза потенциальных антимикробных соединений, принадлежащие археям и актинобактериям новых некультивируемых групп. Из холодных глубинных океанских осадков получены накопительные культуры с антимикробной активностью; анализ их филогенетического разнообразия позволил определить потенциальных продуцентов антимикробных соединений как представителей класса *Desulfuromonadia*. Наконец, нами охарактеризована антимикробная активность нового вида почвенных натронофильных стрептомицетов *Streptomyces* sp. ACA25, которая проявляется только против грамположительных бактерий. Геном этого организма секвенирован, и в нем идентифицированы пути биосинтеза полипептидных, поликетидных и β-лактамных антибиотиков, получены активные фракции культур ACA25, содержащие антимикробные соединения поликетидной и β-лактамной природы. Активный поликетид идентифицирован как антибиотик структурной группы макролидов розамицин. Однако отсутствие ингибирования бактериальной трансляции новым поликетидом указывает на его структурные отличия от розамицина.

Ключевые слова: экстремофилы, галофилы, *Streptomyces*, новые антибиотики, антимикробная активность архей

DOI: 10.31857/S0026365622600845, **EDN:** FWMEJT

Успех применения антимикробных веществ и прогресс в технологиях их производства имел и обратную сторону: широкое и, часто, чрезмерное и бесконтрольное применение антибиотиков существенно сократило срок их эффективного действия, что, вместе с эволюцией путей антибиотикорезистентности у микроорганизмов, включающей активный горизонтальный перенос генов, привело к

множественной лекарственной устойчивости патогенов и постоянной потребности человечества в новых антимикробных препаратах. При этом снизился и темп открытия новых соединений: после окончания “золотой эры антибиотиков” в 1980-х гг. было одобрено только шесть новых классов антибиотиков, ни один из которых не активен против грамотрицательных бактерий (But-

ler et al., 2017). Эта ситуация является критической, по данным журнала “Ланцет”, смертность от бактериальных инфекций, устойчивых к противомикробным препаратам, в 2019 г. составила почти 5 млн человек, и по прогнозам в ближайшие годы этот кризис будет только нарастать (Hofer, 2019; Murray et al., 2022).

Усилия по поиску новых антибиотиков привели к обнаружению новых веществ и новых механизмов их действия на граммотрицательные организмы (Parker et al., 2022), но они пока еще далеки от внедрения в лечебную практику. Новые подходы к поиску антимикробных соединений включают в себя расширение проверки уже известных прокариот и грибов на антимикробную активность (с особым вниманием к представителям новых и/или глубоких филогенетических линий), а также анализ их геномов и природных метагеномов с целью поиска путей биосинтеза соединений с антимикробной активностью (Castro et al., 2014; Kim et al., 2017). Несколько новых антибиотиков уже было получено благодаря обнаружению и идентификации генных кластеров их биосинтеза, клонированию этих кластеров в известных продуцентов и последующей модификации синтезированного пептида. В частности, так был получен лантибиотик галодурацин, требующий посттрансляционной модификации (McClellan et al., 2006). Методы генной инженерии особенно актуальны для выделения антимикробных препаратов из некультивируемых организмов. Отмечается, что некультивируемые микроорганизмы зачастую обладают отдельными биосинтетическими генами или генными кластерами, не встречающимися у культивируемых бактерий-продуцентов антибиотиков (Butler et al., 2016). Обнаружение, клонирование и экспрессия генов целого биосинтетического пути вторичных метаболитов экстремофильной археи в эффективном термофильном продуценте *Thermus thermophilus* было недавно описано в работе De Rose et al. (2021). Этот подход вполне применим и к получению антибиотиков, биосинтетические кластеры которых обнаружены в геномах экстремофилов. В этой связи эффективным представляется поиск продуцентов новых антимикробных соединений у экстремофилов (Coker, 2016), а также широкого спектра некультивируемых прокариот, накопительных и ко-культур нескольких микроорганизмов (Mantravadi et al., 2019). Работа с экстремофилами дает также возможность обнаружения антибиотических веществ и ферментов их биосинтеза с повышенной устойчивостью к контрастам физико-химических условий среды, что может иметь важное практическое значение при применении повышенных температур на производстве новых антибиотиков, воздействии УФ-излучения при хранении препаратов, или при влиянии высокой кислотности желудка на активность антимикробных препаратов.

В последнее время появилось достаточно много данных об активных антагонистических взаимодействиях и продукции антимикробных веществ у галофильных, термофильных и термоацидофильных бактерий и архей. Однако большинство обнаруженных до сих пор активностей и антимикробных соединений экстремофилов действует только против экстремофильных же микроорганизмов (Besse et al., 2015). Антимикробных веществ, продуцируемых экстремофилами и действующих против актуальных для человека патогенов, описано пока немного. Известны новые антибиотики из термофильных и натронофильных (галоалкалофильных) бактерий и архей (Birbir et al., 2004, 2007; Quadri et al., 2016; Vaičikauskaitė et al., 2019). К умеренно термофильным продуцентам новых антибиотиков относят также представителей хорошо известного класса *Bacilli*, образующих, в основном, бактериоцины (Soltani et al., 2021). Среди потенциальных продуцентов новых антибиотиков галофилы и галоалкалофилы представляют наибольший интерес, т.к. в этой физиологической группе широко представлены различные актиномицеты и, в частности, стрептомицеты, давшие человечеству почти все известные классы антибиотиков природного происхождения (Ravel et al., 2000; Proscópio et al., 2012). В 2001 г. было проведено математическое исследование, целью которого была оценка количества существующих в природе антибиотиков, которые возможно выделить из актинобактерий рода *Streptomyces*. Это количество было оценено в 294 300 различных антибиотических веществ. Тем не менее, исследование выявило тренд к снижению скорости открытия новых антибиотиков в 1990-х гг., что вряд ли может быть связано с исчерпанием доступных соединений. Действительно, согласно модели, именно снижение усилий по скринингу новых антибиотиков было основной причиной стагнации в области открытия новых антибиотиков в 1990-е годы (Watve et al., 2001).

Обращение к исходной “золотой жиле” — почвенным бактериям, в том числе из гиперсоленых почв — позволило выделить новые антимикробные соединения и их новых продуцентов. В первую очередь, ими снова оказались стрептомицеты, в том числе, галофильные, с широким спектром антимикробных активностей по отношению к грамположительным бактериям, включая высокорезистентные клинические изоляты группы ESCAPE, мицелиальным грибам, некоторым патогенным простейшим и линиям опухолевых клеток человека (Dietera et al., 2003; Al-Dhabi et al., 2016; Terra et al., 2018). Однако считается, что даже такого продуктивного источника антибиотиков, как почвы и населяющие их стрептомицеты, недостаточно для покрытия существующего дефицита новых антимикробных соединений. Проводится всесторонний скрининг и других мест обитания потенциальных

продуцентов. В этой связи интерес представляют осадочные и глубинные подземные экосистемы, где микроорганизмы существуют в виде конгломератов в порах пород или осадков, что способствует возникновению активных антагонистических взаимодействий между ними и повышает шанс найти новую антимикробную активность. Исследования этих экосистем на предмет поиска новых продуцентов пока единичны (Mullis et al., 2019). В частности, показано наличие в Марианской впадине актиномицетов, из которых более половины имеют гены антимикробной активности (Pathom-Aree et al., 2006). В глубоко залегающих отложениях на окраине Перу гены антибиотической активности были обнаружены у актинобактерий, протеобактерий, представителей *Bacteroidota* и *Firmicutes* (*Bacillota*). Также, гены антибиотической активности были обнаружены при анализе метагеномов термальных экосистем подводного океанского хребта Хуан де Фука, донных отложений западного склона Срединно-Атлантического хребта, офиолитов прибрежного хребта Северной Калифорнии (Mullis et al., 2019). Эти данные дают стимул к продолжению поисков новых антибиотиков в глубоководных океанских экосистемах, как современных, так и древнего происхождения.

Целью нашей работы был поиск новых потенциальных продуцентов антимикробных соединений среди экстремофилов, населяющих три различных типа экстремальных экосистем с повышенной соленостью. Были использованы три основных современных подхода к поиску новых продуцентов вторичных метаболитов – метагеномный анализ микробных сообществ, получение накопительных культур с целевой активностью и выявление в них потенциальных продуцентов этой активности, исследование антимикробных свойств чистых культур, выделение и идентификация новых индивидуальных антимикробных соединений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Отбор проб и получение накопительных культур.

Пробы подземных минеральных вод Эссентукского месторождения (ЕММВ) для последующего выделения тотальной ДНК были отобраны в 2021 г. непосредственно на устьях эксплуатационных скважин 46 и 49-Э путем ультрамикрофильтрации минеральных вод через стерильные фильтры из трековой мембраны с диаметром пор 0.2 мкм. Из каждой скважины было профильтровано по 100 л воды по методике, описанной ранее (Гаврилов и соавт., 2022).

Пробы глубинных железистых донных отложений Патагонского склона Атлантического океана были отобраны в марте 2020 г. в ходе 79-го рейса НИС “Академик Мстислав Келдыш” совместно с сотрудниками Института океанологии им. П.П. Ширшова РАН в рамках 4-го этапа Ком-

плексных исследований экосистем Антарктики и Атлантического океана. Образцы донных отложений, предназначенные для постановки накопительных культур, отбирали из анаэробной части керна (глубина под поверхностью осадка 19–40 см, смешанная проба). КERN осадка был отобран гравитационной трубкой в системе подводных каньонов Амигино в южной Атлантике с глубины 2208 м. Температура придонной воды в месте отбора пробы составляла 1.79°C, соленость – 34.76 psu, pH 7.8. Пробы донных отложений сразу же после их отбора из керна стерильным шпателем были помещены в стерильные пробирки Хангейта, содержащие один из следующих минералов железа или марганца – синтезированный ферригидрит (Fe(III)), сидерит гидротермального происхождения (Fe(II)), родохрозит (Mn(II)) или оксид марганца (Mn(IV)). Пробирки были залиты под горлышко придонной океанской водой для полного вытеснения из них окружающего воздуха и укуплены резиновыми пробками с завинчивающимися крышками. Параллельно были отобраны пробы придонной океанской воды для приготовления сред для накопительных культур.

В качестве первичных накопительных культур были использованы пробирки с пробами донных осадков, минералами и придонной океанской водой, инкубированные в течение 3-х мес. в холодильнике при температурах 2–4°C. В качестве субстратов перед началом инкубирования добавляли ацетат, лактат или формиат натрия в количестве 10 мМ из стерильных анаэробных растворов. Рост культур контролировали микроскопированием; инкубирование останавливали при прекращении прироста клеток по результатам прямого счета в препаратах, окрашенных акридиновым оранжевым красителем, на флуоресцентном микроскопе AxioPlan (“Zeiss”, Германия).

Для дальнейших пересевов накопительных культур использовали среду на основе придонной океанской воды. Воду кипятили, охлаждали до комнатной температуры, продувая N₂ (ос. ч.), и разливали под током CO₂ в пробирки Хангейта, содержащие вышеупомянутые минералы железа или марганца. В пробирках оставляли 1–2 мл газовой фазы (100% CO₂). Среду стерилизовали при 121°C 20 мин. Пересевы накопительных культур осуществляли анаэробно, шприцами; инкубирование вели при 4°C до прекращения прироста клеток по результатам флуоресцентной микроскопии, микроскопирование проводили один раз в неделю. Углеродные субстраты (ацетат, лактат, формиат натрия) добавляли из отдельно стерилизованных анаэробных растворов, формиат стерилизовали фильтрованием.

Штамм *Streptomyces* sp. ACA25 и условия его культивирования. Организм был первоначально выделен как штамм DS8 *Streptomyces sodiiphilus*

Сорокиным и соавторами из водной вытяжки донных осадков одного из содовых озер Кулундинской степи (район Карасук), рН 10.2; соленость 37 г/кг почвы (3.7 мас. %), карбонатная щелочность 117 мМ (Sorokin et al., 2017). Штамм культивировали аэробно при 35°C на жидкой среде описанного ранее состава (Sorokin et al., 2017) с крахмалом (2 г/л) или сахарозой (3 г/л) в качестве углеродных субстратов. Дрожжевой экстракт, углеродные субстраты и $MgCl_2$ добавляли в среду после автоклавирования из отдельно стерилизованных растворов. Среду автоклавировали при 121°C 20 мин в плотно закрытых бутылках для сохранения концентрации бикарбоната. Культивирование для тестирования антимикробной активности культуральной жидкости и клеточной биомассы вели с крахмалом в стерильных пластиковых пробирках типа Falcon объемом 15 мл; рост контролировали микроскопированием. По достижении стационарной фазы роста пробирки с культурами центрифугировали при 4000 g (4°C, 20 мин) и отдельно собирали супернатант и клеточную биомассу для анализа антимикробной активности. Культивирование для дальнейшего хроматографического разделения культуральной жидкости и биомассы вели с сахарозой, в плотно закрытых литровых бутылках, объем жидкой среды составлял 400 мл, газовой фазы (воздух) – 600 мл. Биомассу отделяли от культуральной жидкости центрифугированием при 9000 g (4°C, 30 мин).

Выделение ДНК, подготовка библиотек и секвенирование. Фильтры с биомассой из минеральных вод фиксировали на месте, как описано ранее (Гаврилов и соавт., 2022). ДНК выделяли непосредственно из фиксированных фильтров при помощи набора FastDNA™ SPIN Kit for Soil (“MP Biomedicals”, США) согласно инструкции производителя. Тем же набором реактивов выделяли ДНК из образцов психрофильных накопительных культур и из биомассы штамма *Streptomyces* sp. ACA25. Для выделения ДНК из накопительных культур отбирали образцы объемом 5 мл. Для выделения ДНК *Streptomyces* sp. ACA25 отбирали образцы биомассы, выращенной с сахарозой.

Подготовку и секвенирование библиотек ампликонов гена 16S рРНК из накопительных культур проводили по методике, описанной ранее (Гаврилов и соавт., 2022). Необработанные прочтения были депонированы в базе данных SRA (NCBI) под номером биопроекта PRJNA926348.

Приготовление геномных и метагеномных библиотек осуществляли с использованием набора реагентов KAPA HyperPlus Library Preparation Kit (“KAPA Biosystems”, Великобритания) согласно инструкции производителя. Секвенирование производили на системе NovaSeq 6000 (“Illumina”, США) с реагентами, обеспечивающими длину чтения 100 пар оснований с каждого конца ам-

пликона. Первичную обработку метагеномных данных, а также сборку контигов и биннинг осуществляли по методике, описанной ранее (Merkel et al., 2021). Необработанные прочтения были депонированы в базе данных SRA (NCBI) под номером биопроекта PRJNA926348. Для анализа были отобраны “композитные геномы” удовлетворительного качества с полнотой сборки от 70.1 до 100.0% и контаминацией от 0.0 до 4.93%; разброс размеров собранных геномов составил от 0.5 до 7 млн п.о. Усредненные значения полноты сборки и контаминации по всем собранным геномам составили 90.8 и 1.43% соответственно.

Первичную обработку геномных данных, а также сборку контигов осуществляли по методике, описанной ранее (Khomyakova et al., 2022). Геном был депонирован в базе данных GenBank под номером JAQKPV000000000.

Анализ геномных и метагеномных данных. Полученные прочтения V4-участков генов 16S рРНК после первичной обработки были проанализированы с помощью Интернет-сервиса SILVAngs (<https://ngs.arb-silva.de/silvangs/>) против базы данных SILVA для определения относительной представленности таксонов микроорганизмов в накопительных культурах. При этом была использована версия базы данных 138.1, в которой названия таксонов синхронизированы с таковыми в полногеномной таксономической базе GTDB.

Автоматическую аннотацию генома *Streptomyces* sp. ACA25 и композитных геномов, полученных из метагеномных данных, проводили с помощью программного пакета PGAP 2021-07-01 (Tatusova et al., 2016).

Поиск генных кластеров биосинтеза вторичных метаболитов в собранных “композитных геномах” и в геноме *Streptomyces* sp. ACA25 проводили с помощью Интернет-сервиса antiSMASH версии bacterial version 6.0 (Blin et al., 2021); значение параметра точности предсказаний (“detection strictness”) выбирали “strict”, что обеспечивает детекцию только четко обособленных генных кластеров, содержащих все присущие им части. Все дополнительные функции сервиса были включены (параметр “Extra features” = “All on”). Геномные данные загружали для анализа в виде нуклеотидных последовательностей в формате GenBank (расширение файлов .gbk). Для анализа метагеномов микробных сообществ минеральных вод по каждой из скважин загружали один файл, содержащий совокупность всех композитных геномов сообщества надлежащего качества сборки (см. выше). Гомологичные генные кластеры выявляли с использованием встроенных дополнительных функций KnownClusterBlast и MIBiG cluster comparison.

Определение антимикробной активности. Тестирование на наличие антимикробной активности

осуществляли методом диффузии в агар в соответствии с протоколом CLSI, 2020. Использовали тест-культуры с плотностью порядка 1×10^5 КОЕ/мл на агаризованной твердой питательной среде. Тестовые культуры высевали газоном на поверхность агаризованной среды, исследуемые препараты вносили в лунки или на стерильные диски из фильтровальной бумаги на поверхности агара и инкубировали чашки Петри в течение 12–48 ч. Диаметр всех лунок и дисков составлял 8 мм, объем каждого из тестируемых образцов культур – 50 мкл. Антимикробную активность определяли по образованию зон подавления роста тест-культур вокруг лунок или дисков. Сравнительный анализ активности осуществляли измерением диаметров зон подавления электронным штангенциркулем. Во всех экспериментах использовали следующие штаммы тест-культур: *Staphylococcus aureus* KM 144, *Micrococcus luteus* KM 128 и *Escherichia coli* K-12 из коллекции кафедры микробиологии Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, *Pseudomonas aeruginosa* PAW1, *Enterococcus faecium* и *Bacillus alkaliphilus* из коллекции Института микробиологии им. С.Н. Виноградского ФИЦ Биотехнологии РАН. Все эти штаммы культивировали на мясо-пептонном агаре (1.5%) при 35°C. Для тестирования активности культур *Streptomyces* sp. ACA25 дополнительно использовали штаммы грамположительных бактерий, вызывающих порчу продуктов питания, *Pedococcus pentosaceus* DMST 18752, *Latilactobacillus sakei* subsp. *sakei* JCM 1157, *Brochothrix thermosphacta* DSMZ 20171^T и *Carnobacterium maltaromaticum* NCDO 2762 из коллекции Национального института сельскохозяйственных, пищевых и экологических исследований Франции (INRAE). Штаммы *P. pentosaceus* и *L. sakei* культивировали на агаре де Мана-Рогосы-Шарпе (MRP) при 37°C, штаммы *B. thermosphacta* и *C. maltaromaticum* культивировали на сердечно-мозговом агаре (ВН1) при 25 и 30°C соответственно.

В качестве контролей использовали образцы стерильных сред, инкубированных то же время и в тех же условиях, что и исследуемые культуры. При исследовании активностей фракций культур ACA25 в качестве контролей использовали соответствующие буферные растворы с растворителями, присутствующими в тестируемых препаратах (диметилсульфоксид (ДМСО), бутанол, этилацетат, метанол).

Образцы культуральной жидкости непосредственно перед тестированием антимикробной активности центрифугировали в микропробирках типа Eppendorf при 20800 g (4°C, 10 мин). Полученный супернатант отбирали автоматической пипеткой и тестировали отдельно от осадка клеток. Образцы фракций культур и культуральной жидкости штамма ACA25 готовили для тестиро-

вания антимикробной активности высушиванием досуха с последующим разведением 1%-м водным раствором ДМСО до объема 200 мкл. Перед разведением определяли массу сухого вещества на аналитических весах.

Фракционирование культур *Streptomyces* ACA25 осуществляли комбинацией методов жидкофазной экстракции и жидкостной хроматографии низкого и высокого давления. Для анализа локализации активности против *S. aureus* культуральная жидкость штамма ACA25, отделенная от клеток центрифугированием, была подвергнута первичному разделению с помощью гидрофобного сорбента Amberlite XAD2 (“Serva”, США) в соответствии с ранее описанным протоколом (Лапчинская и соавт., 2016). Элюат этой колонки упаривали полностью с помощью роторного концентратора IKA RV 05 (“IKA-Werke”, Германия), перерастворяли в 50%-м водном этаноле и подвергали процедуре обессоливания (твердофазной экстракции) посредством полупрепаративной обращенно-фазовой ВЭЖХ на колонке Aquapore 10 × 100 мм, 300 Å (“Applied Biosystems”, США) при скорости потока подвижной фазы 2.5 мл/мин и детектировании поглощения при длине волны 220 нм. Фракции, полученные в результате элюирования с колонки 28%-м и 72%-м водным ацетонитрилом с добавлением 0.1% трифторуксусной кислоты (ТФУ), упаривали с помощью вакуумной центрифуги SpeedVac Vacuum Concentrator (“Labconco”, США) и лиофилизовали с помощью FreeZone Lyophilizer (“Labconco”, США). Фракцию несвязавшихся с неподвижной фазой компонентов после разделения методом гидрофобной хроматографии на Amberlite XAD2 экстрагировали бутанолом-1 (“Химмед”, Россия) в объемном соотношении 1 : 1.

Для анализа локализации антимикробной активности против *P. pentosaceus* и *B. thermosphacta* предварительно разделенные образцы культуральной жидкости и клеток штамма ACA25 подвергали экстракции этилацетатом с помощью набора реактивов QuEChERS (“Waters”, США) согласно инструкции производителя. Полученные экстракты высушивали в атмосфере азота при 30°C, затем растворяли в 50%-м водном метаноле или в 50 мМ фосфатном буфере (pH 7.0) и тестировали на наличие антимикробной активности.

Идентификация антимикробных соединений, продуцируемых штаммом ACA25. Идентификацию проводили методом МАЛДИ-времяпролетной масс-спектрометрии с помощью установки Ultra-Flex MALDI-TOF/TOF (“Bruker Daltonics”, Германия) в режиме положительных ионов. В качестве матрицы для анализа хроматографических фракций использовали 2,5-дигидроксибензойную кислоту (ДНВ) (“Sigma-Aldrich”, США) в концентрации 20 мг/мл в 80%-м водном растворе ацетонитрила (“Panreac”, Испания). В качестве матрицы для

анализа этилацетатных экстрактов культуральной жидкости и клеток использовали метанол. Анализируемые образцы (0.8–1 мкл) смешивали с эквивалентным объемом матрицы и наносили на мишень. Анализ масс-спектров осуществляли с использованием ПО FlexAnalysisforBruker.

Тестирование ингибирования бактериальной трансляции. Активность, ингибирующую трансляцию *in vivo*, тестировали на штамме *E. coli lptD^{mut}*, модифицированном репортерной последовательностью *pDualrep2* (Osterman et al., 2016), в котором остановка процесса трансляции приводит к экспрессии красного флуоресцентного белка Katushka2S, а повреждение ДНК запускает SOS-ответ и приводит к экспрессии красного флуоресцентного TurboRFP. Тестируемые фракции культур штамма ACA25 наносили по 25 мкг в лунки агаризованной среды с тестовым штаммом. В качестве контролей использовали эритромицин и левофлоксацин той же массы. Чашки с тестовым штаммом инкубировали при 37°C в течение ночи, уровень экспрессии флуоресцентных белков в штамме, содержащем плазмиду *pDualrep2*, и зоны подавления роста оценивали с помощью системы визуализации ChemiDoc (“Bio-Rad”, США). Ингибирование синтеза белка *in vitro* тестировали на бесклеточной системе трансляции люциферазы светлячка, как было описано ранее (Svetlov et al., 2006). T7-транскрибируемая мРНК (*Fluc*) люциферазы светлячка (*Photinus pyralis*) транслировалась в бесклеточной *E. coli* S30 системе. Тестируемые образцы добавляли к системе в концентрации 50 мкг/мл, уровень трансляции *in vitro* после инкубирования измеряли с помощью системы Bright-Glo® Luciferase Assay System (“Promega”, США) на планшетном мультиридере VICTORX5 Multilabel Plate Reader (“PerkinElmer”, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Поиск генов биосинтеза антимикробных соединений в метагеномах микробных сообществ подземных минеральных вод Эссентукского месторождения. В ходе исследования влияния активности микроорганизмов на формирование состава подземных минеральных вод нами были отобраны пробы воды типов Эссентуки № 17 и № 4 из скважин 46 и 49-Э соответственно, расположенных на Новоблагодарненском участке ЕММВ. Температура вод на устьях скважин достигает 45°C, а в верхнемеловом водоносном горизонте, вскрываемом этими скважинами, температура может достигать и более высоких значений (Абрамов, Вавичкин, 2010). Отобранные нами воды по составу являются хлоридно-гидрокарбонатными натриевыми с минерализацией 8.0–14.0 г/л и содержат значительное количество растворенного углекислого газа – до 1.4 г/л (Гаврилов и соавт., 2022). Профилирование микробных сообществ этих вод

по гену 16S рРНК выявило доминирование некультивируемых архей филума *Hadarchaeota* в воде Эссентуки № 17 скважины 46 и некультивируемых актинобактерий нескольких новых классов в воде Эссентуки № 4 скважины 49-Э; были также обнаружены существенные различия в составе микробных сообществ, населяющих водоносные горизонты этих двух скважин (Гаврилов и соавт., 2022). В рамках текущей работы мы секвенировали метагеномы этих микробных сообществ и проанализировали их на наличие генов биосинтеза потенциальных антимикробных соединений. Из пула метагеномных данных было собрано 54 композитных генома отдельных таксонов для дальнейшего анализа с полнотой сборки >70% и контаминацией <5%. С помощью онлайн-сервиса antiSMASH в метагеноме микробного сообщества воды скважины 46 было выявлено 6 композитных геномов, содержащих кластеры биосинтеза рантипептидов, сактипептидов, тиаомитидов, β-лактонов, а также биосинтетический кластер, кодирующий поликетидсинтазу III типа (ТЗРКС). Интересно, что все выявленные кластеры принадлежали генотипам, представляющим глубокие некультивируемые линии прокариот, в том числе, архей группы ANME-1-THS филума *Haloarchaeota* и класса *Bathyarchaeia* филума *Thermoproteota*, а также бактерий нового семейства в порядке *Thermodesulfobacteriales* (табл. 1). Схожий результат наблюдался и для сообщества минеральной воды скважины 49-Э, в метагеноме которого было выявлено 8 кластеров биосинтеза вторичных метаболитов с потенциальной антимикробной активностью, относящихся к 7 композитным геномам некультивируемых архей и бактерий глубоких филогенетических линий, включая представителей филума *Aenigmataarchaeota*. В частности, в этих геномах были обнаружены кластеры генов биосинтеза β-лактонов, тиаомитидов, рантипептидов и других рибосомально синтезируемых и посттрансляционно модифицируемых пептидов (RiPP-like peptides) (табл. 1). Почти для всех выявленных биосинтетических кластеров были найдены гомологичные кластеры биосинтеза известных антибиотиков или цитотоксинов, однако сходство с этими кластерами во всех случаях было крайне низким (табл. 1), что позволяет предположить высокую вероятность обнаружения путей биосинтеза новых антимикробных соединений в метагеномах микробных сообществ минеральных вод ЕММВ.

Антимикробная активность психрофильных накопительных культур из глубинных донных осадков Патагонского склона Атлантического океана. В 2020 г. в рамках 4-го этапа Комплексных исследований экосистем Антарктики и Атлантического океана на борту НИС “Академик Мстислав Келдыш” было отобрано 20 проб глубинных (более 1 км) железистых донных осадков и придонной оке-

Таблица 1. Кластеры биосинтеза вторичных метаболитов, выявленные при анализе всех упомянутых в нашей работе геномов и метабеномов галотолерантных и галофильных прокариот и их сообществ с помощью Интернет-сервиса antiSMASH

Тип кластера antiSMASH	Геном, в котором обнаружен кластер (для метабеномов указаны скважина-МАГ-контиг)	Координаты кластера в геноме (№ antiSMASH Region; нуклеотиды, старт-финиш)	Таксономическое положение генотипа	Ближайший подобный генный кластер (тип и название синтезируемого метаболита, продуцент)	Сходство (similarity score или %) ¹
ranthipeptide	46-09-13	13; 33222-44625	Пор. <i>Thermodesulfobibrionales</i> , некульт. сем. SM23-35	Антибиотик hygromycin A, <i>Streptomyces hygrosopicus</i>	0.22
sactipeptide	46-13-2	196; 6628-27983	Некульт. род ANME-1-THS	Антибиотик duramycin, <i>S. cinnamomeus</i>	0.17
thioamitides	46-13-70	264; 1-10791	»	Цитотоксины thiovarsolins A-D, <i>S. varsoviensis</i>	0.21
sactipeptide	46-07-12	374; 22681-44324	Пор. <i>Methanocellales</i> , некульт. сем. UBA148	Антибиотик 2,3,4,5-tetrahydro- <i>Pseudalteromonas piscicida</i>	0.14
betalactone	46-05-2	630; 50360-80266	Кл. <i>Bathylarchaeia</i> , некульт. сем. UBA233	Противомаларийное вещество FR-900098, <i>S. rubellomurinus</i>	0.22
TЗPKS	46-05-16	644; 1-21486	»	Антибиотик kanglenycin, <i>Amycolatopsis vancoremycina</i>	5%
betalactone	46-02-1	681; 283072-313064	Р. <i>Nocardioidea</i>	Антибиотик и фунгицид Iomofungin, <i>S. lomondensis</i>	0.27
betalactone	49-34-2825	79; 1-6551	Кл. <i>Bathylarchaeia</i> , некульт. сем. UBA233	Противомаларийное вещество FR-900098, <i>S. rubellomurinus</i>	0.17
ranthipeptide	49-24-2	172; 46383-87566	<i>Aenigmataarchaeota</i> , некульт. пор. CG 10238-14	—	—
thioamitides	49-21-14	198; 11797-33861	<i>Methanothermobacter wolfeii</i>	Цитотоксины thiovarsolins A-D, <i>S. varsoviensis</i>	0.19
betalactone	49-06-6	213; 158042-191381	<i>Actinomycesota</i> , некульт. пор. RBG-13-55-18	Антибиотик и цитотоксин jadomycin, <i>S. venezuelae</i> ATCC 10712	0.21
RiPP-like	49-03-18	273; 1-6158	<i>Methanomicrobiales</i> , некульт. сем.	—	—
thioamitides	49-03-23	278; 1-13392	»	Цитотоксины thiovarsolins A-D, <i>S. varsoviensis</i>	0.21

Таблица 1. Окончание

Тип кластера antiSMASH	Геном, в котором обнаружен кластер (для метагеномов указаны скважина-МАG-контиг)	Координаты кластера в геноме (№ antiSMASH Region; нуклеотиды, старт-финиш)	Таксономическое положение генотипа	Ближайший подобный генный кластер (тип и название синтезируемого метаболита, продуцент)	Сходство (similarity score или %) ¹
betalactone	49-25-4	325; 29705-61763	<i>Actinomyces</i> sp., некульг. род SURF-21 в пор. RBG-13-55-18	Антибиотик и цитотоксин jadomycin, <i>S. venezuelae</i> ATCC 10712	0.21
ranthipeptide	49-25-23	344; 17544-47206	»	Антибиотик WGK (trygysin), <i>Streptococcus ferus</i>	0.27
T3PKS	<i>Streptomyces</i> ACA25	1.5; 706846-747919	<i>Streptomyces</i> sp., штамм ACA25	Антибиотик alkyl-O-dihydrogeranyl-methoxyhydroquinol, <i>Actinoplanes missouriensis</i> 431	57%
other, NRPS, T1PKS	»	2.1; 314014-423271	»	Цитотоксин polyoxureptin, <i>Streptomyces</i> sp. МК498-98F14	81%
lanthipeptide-class-III	»	4.1; 288327-10912	»	Лантибиотик SapB, <i>S. coelicolor</i> A3(2)	100%
NRPS	»	6.1; 183007-243605	»	Антибиотик маннопертимусин, <i>S. hygrosopicus</i>	51%
T2PKS, betalactone	»	12.2; 112747-169921	»	Цитотоксин LLD, <i>S. vinaceustrappus</i>	35%
T1PKS, lanthipeptide-class-IV	»	16.1; 1-45123	»	Антибиотики stambomycins A-D, <i>S. ambofaciens</i> ATCC 23877	52%
arylpolyene	NZ_ARWE01000001.1	1.3; 3630965-3690455	<i>Geosyzygobacter electrodiphilus</i>	Антибиотик granaticin, <i>S. violaceoruber</i>	0.27
betalactone	NZ_CP015455.1	1.2; 1051261-1074416	<i>Syntrophotalea acetylenica</i>	Антибиотик fosfomycin, <i>Pseudomonas syringae</i>	0.21

¹ Оценка гомологии обнаруженных и ранее описанных генных кластеров дана в соответствии с критериями, используемыми функциями MIBiG cluster comparison (similarity score) и KnapClusterBlast (% similarity) Интернет-сервиса antiSMASH версии bacterial version 6.0 (Blin et al., 2021). Для *Streptomyces* sp. ACA25 указаны только те из обнаруженных кластеров биосинтеза вторичных метаболитов, которые имеют высокое сходство (>30%) с ранее описанными кластерами биосинтеза антибиотиков и цитотоксинов. Серым фоном выделены кластеры биосинтеза поликетидных соединений, родственных розамицину (кластер, содержащий поликетидсинтазы I типа), и биосинтеза β-лактонов.

анской воды Патагонского склона в южной Атлантике. Физико-химические условия отобранных донных отложений характеризуются несколькими экстремумами: постоянно низкими температурами (2–4°C), повышенной соленостью (34.76 г/л), а также повышенным содержанием железистых минералов, что существенно сказывается на балансе окислительных и восстановительных процессов в данной экосистеме. С отобранными пробами было получено 40 первичных накопительных культур с органическими кислотами и минералами Fe(II), Mn(II), Fe(III) и Mn(IV) в качестве характерных для этих экосистем энергетических субстратов и акцепторов электронов.

Накопительные культуры инкубировали при естественной для этих экосистем низкой температуре в течение 2–3 мес. до остановки прироста клеток, после чего были сделаны вторые пересевы каждой из культур на среды того же состава. В процессе культивирования проводили скрининг антимикробной активности накопительных культур против *E. coli*, *S. aureus*, *M. luteus*, *P. aeruginosa*. В результате скрининга была выявлена антимикробная активность вторых пересевов железовосстанавливающих накопительных культур 23-2 и 24-2, выращенных с лактатом в качестве источника углерода и энергии и ферригидритом в качестве акцептора электронов. Активность проявлялась только против штамма *P. aeruginosa* PAW1, диаметр зон подавления роста тест-культур при диффузии активного вещества из лунок составлял 11–13 мм. В нескольких других, параллельно выращенных железовосстанавливающих культурах, полученных из тех же природных проб, антимикробной активности не было, что указывает на отсутствие побочного действия минералов Fe(II/III) на тестовый штамм и подтверждает подавление его роста за счет продукции антимикробных веществ культурами 23-2 и 24-2. Микроскопия этих культур выявила клетки двух основных морфотипов: короткие палочковидные и длинные тонкие нитевидные, склонные к образованию крупных колоний на поверхности минералов железа. Максимальная концентрация клеток в каждой из культур к стационарной фазе роста достигала 4×10^7 кл./мл. Интересно, что в культуре 23-2 доминировали палочковидные, а в культуре 24-2 – нитевидные формы, и при этом обе культуры обладали сопоставимой антимикробной активностью, что может указывать на накопление в них различных продуцентов антимикробных соединений. Это предположение подтвердилось профилированием культур по гену 16S рРНК, выявившем различия в их филогенетическом составе (рис. 1). В обеих культурах доминировали представители класса *Desulfuromonadia* филума *Desulfobacterota* (80.1–92.4% всех прочтений гена 16S рРНК), однако в культуре 23-2 этот класс был представлен, в основном, бактериями новой некультивируемой группы порядка, в

меньшей степени, филотипами *Geopsychrobacter* и некультивируемой группы Sva1033 (67.3, 12.6 и 12.5% прочтений 16S соответственно). Напротив, в культуре 24-2 доминировала некультивируемая группа Sva1033 (68.1%), *Geopsychrobacteraceae* были представлены родом *Desulfuromusa* (11.3%), а бактерии нового порядка класса *Desulfuromonadia* составили лишь минорную часть сообщества (0.7%). В контрольной накопительной культуре с ферригидритом и лактатом, не проявившей антимикробной активности, представители всех упомянутых филотипов *Desulfuromonadia*, кроме Sva1033, детектированы не были, а группа Sva1033 составляла только 6.3% разнообразия (рис. 1). Доминировал в контрольной неактивной культуре филотип, относящийся к семейству *Desulfocapsaceae* класса *Desulfobulbia* (85.8%). В настоящее время отсутствуют сведения о продуцентах антимикробных веществ среди представителей родов *Desulfuromusa*, *Geopsychrobacter* или группы Sva1033. Нами был проведен биоинформатический поиск кластеров биосинтеза антимикробных соединений в геномах микроорганизмов, родственных филотипам, доминирующим в культурах 23-2 и 24-2. В базе данных GTDB с помощью стандартной процедуры blastn было найдено 6 таких геномов, принадлежащих бактериям видов *Syntrophotalea acetylenica*, *Geopsychrobacter electrophilus*, *Desulfuromonas acetoxidans*, *Malonomonas rubra* и sp001873285 некультивируемой группы CG2-30-53-67 уровня филума. В геноме *S. acetylenica* было обнаружено 4 кластера биосинтеза терпеновых соединений, β -лактонов и фосфонатов, а в геноме *G. electrophilus* – 4 кластера биосинтеза рантипептидов, арилполиенов и β -лактонов. Кластеры, для которых были выявлены гомологи, кодирующие биосинтез известных антимикробных соединений, приведены в табл. 1.

Антимикробная активность чистой культуры натронофильного актиномицета. Почвенные экосистемы являются источником выделения большинства известных на сегодняшний день продуцентов антибиотиков (Егоров, 1994; Cheng et al., 2002; Horwood et al., 2004). В этой связи, изучение физиологии микроорганизмов, населяющих экстремальные почвенные экосистемы, например, содовые солончаки, увеличивает вероятность обнаружения новых продуцентов антимикробных соединений с повышенной устойчивостью к нескольким различным физико-химическим экстремумам среды. Содовые солончаки характеризуются как высокой соленостью, так и гидрокарбонатной щелочностью, а также периодическим высыханием или промерзанием. Недавно Д.Ю. Сорокиным и соавторами была описана коллекция новых штаммов натронофильных стрептомицетов, выделенных из засоленных почв Кулундинской степи (Sorokin et al., 2017). В ходе первичного скрининга нескольких из этих штаммов на наличие антимикробной ак-

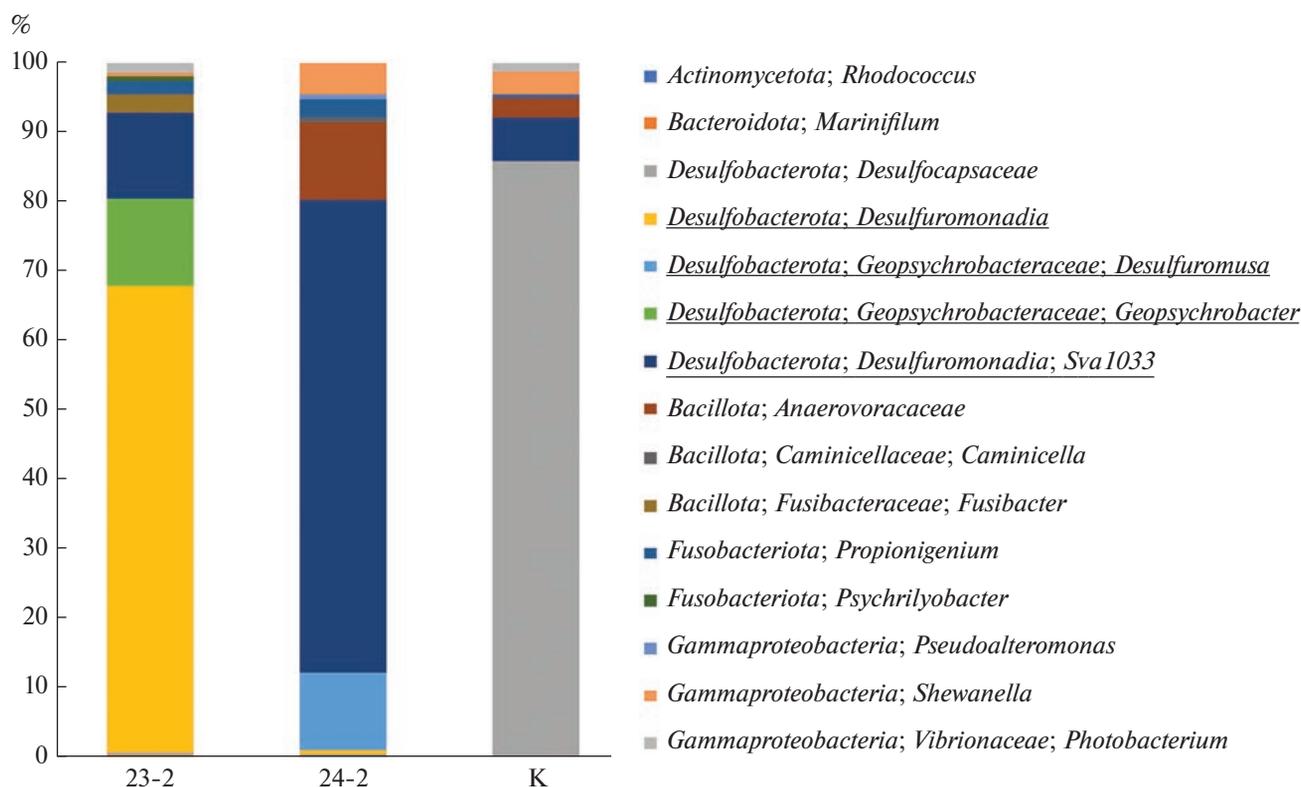


Рис. 1. Филогенетический состав по результатам профилирования по гену 16S рРНК накопительных культур, полученных из образцов донных отложений Патагонского склона Атлантического океана. По оси X: 23-2 и 24-2 – две разные культуры с антимикробной активностью против *P. aeruginosa*; К – культура, полученная из того же образца донных отложений, не проявившая антимикробной активности (первичная накопительная культура для 24-2). Подчеркнуты филоциты предполагаемых продуцентов антимикробных соединений.

тивности против *S. aureus* (полные результаты скрининга будут опубликованы отдельно) была выявлена активность штамма ACA25, первоначально описанного как штамм DS8 вида *Streptomyces sodiiphilus* (Sorokin et al., 2017). Антимикробная активность этого штамма была выявлена нами как в культуральной жидкости, так и в биомассе клеток. Образцы культуральной жидкости проявляли ингибирующую активность по отношению к *M. luteus*, *Staphylococcus aureus* (табл. 2), *B. alkaliphilus*, *E. faecium*, *Brochothrix thermosphacta*, *Pediococcus pentosaceus*, *L. sakei*. На тест-культурах *B. thermosphacta* было показано, что антимикробная активность отсутствует в культуральной жидкости стрептомицета после первых суток культивирования и проявляется на более поздних стадиях роста микроорганизма, после инкубирования в течение 45 и 51 ч. Активность биомассы клеток штамма ACA25, собранной после 48 ч инкубирования, проявлялась против *S. aureus*, *P. pentosaceus* и *B. thermosphacta*. Проявление антимикробной активности штамма ACA25 варьировало от культуры к культуре при одинаковых условиях культивирования, что выражалось в периодическом уменьшении диаметра зон ингибирования. Наиболее стабиль-

ная активность клеток ACA25 и культуральной жидкости наблюдалась против *M. luteus*, *S. aureus* и *B. thermosphacta*. Средний размер зон ингибирования роста *S. aureus* и *M. luteus* для культуральной жидкости ACA25 составлял 16–18 мм. Активность культуральной жидкости против *B. thermosphacta* сохранялась после предварительного прогрева образца при 80°C в течение 15 мин, или после его обработки протеиназой К в течение 2 ч. Ни один из препаратов ACA25 не проявлял активности против грамотрицательных бактерий *E. coli* и *P. aeruginosa*, а также против грамположительных *C. maltaromaticum* и *L. innocua*. Активность контрольных образцов культуральной среды для ACA25 во всех наших экспериментах отсутствовала.

Антимикробная активность экстрактов культуральной жидкости и биомассы штамма ACA25. Антимикробная активность штамма ACA25 сохранялась при фракционировании культуральной жидкости и клеток и проявлялась в тестах *in vitro*. Этилацетатные экстракты культуральной жидкости, полученные после 45 и 51 ч инкубирования культур стрептомицета, проявляли активность по отношению к *B. thermosphacta*. Этилацетатный

Таблица 2. Антимикробная активность различных препаратов культур *Streptomyces* sp. ACA25, детектированная методом диффузии в агар

Препарат	Метод (дискодиффузионный/ луночный)	Диаметр** зоны подавления роста, см	Тест-культура
Культуральная жидкость	Диски	1.60 ± 0.10	<i>M. luteus</i>
	Лунки	2.28 ± 0.13	<i>S. aureus</i>
	Лунки	1.26 ± 0.13	<i>B. thermosphacta</i>
Контроли с неинокулированной питательной средой	Диски	0.0	<i>M. luteus</i>
	Лунки	0.0	<i>S. aureus</i> ,
	Лунки	0.0	<i>B. thermosphacta</i>
Фракция культуральной жидкости с колонки Amberlite в 50%-м водном этаноле	Лунки	1.25 ± 0.05	<i>S. aureus</i>
Контроль с питательной средой и 50%-м водным этанолом	Лунки	0.90 ± 0.05	<i>S. aureus</i>
Этилацетатный экстракт культуральной жидкости в метаноле	Лунки	0.0	<i>B. thermosphacta</i>
Этилацетатный экстракт культуральной жидкости в 50 мМ фосфатном буфере	Лунки	1.89 ± 0.06	<i>B. thermosphacta</i>
Биомасса клеток	Лунки	1.14 ± 0.04	<i>B. thermosphacta</i>
Этилацетатный экстракт биомассы клеток в 50 мМ фосфатном буфере	Лунки	1.20 ± 0.06	<i>B. thermosphacta</i>
Контроли* – этилацетатный экстракт неинокулированной среды в метаноле или 50 мМ фосфатном буфере, метанол, фосфатный буфер	Лунки	0.0	<i>B. thermosphacta</i>

* Приведен результат для четырех разных вариантов контролей.

** Вместе с диаметром лунок или дисков (0.8 см).

экстракт клеточной биомассы (полученной после 48 ч инкубирования) ингибировал рост *B. thermosphacta* (табл. 2) и *P. pentosaceus*. Следует отметить, что активность всех этилацетатных экстрактов проявлялась при использовании фосфатного буфера в качестве их растворителя и отсутствовала при их разведении в метаноле.

В результате фракционирования образца культуральной жидкости методом гидрофобной хроматографии низкого давления антимикробная активность была выявлена в элюате с колонки Amberlite XAD2. В несвязавшейся с данной смолой фракции, а также в ее бутанольном экстракте (при максимальной тестируемой концентрации 20 мг/мл) антимикробная активность отсутствовала. Дальнейшее фракционирование активного элюата с Amberlite XAD2 проводили методом полупрепаративной обращенно-фазовой ВЭЖХ в ступенчатом градиенте повышения концентрации ацетонитрила от 28 до 72%. В результате,

вручную были собраны три фракции: несвязавшиеся компоненты (“провал с колонки”, фракция 0), фракция элюата при 28% ацетонитрила с добавлением 0.1% ТФУ (фракция 1) и фракция элюата при 72% ацетонитрила с добавлением 0.1% ТФУ (фракция 2). Антибактериальная активность по отношению к *S. aureus* и *M. luteus* была детектирована только во фракции 2 с размерами зон подавления 2.2 и 2.3 см соответственно. Таким образом, была получена обогащенная фракция, содержащая в себе преимущественно гидрофобные соединения. Дальнейшая аналитическая обращенно-фазовая ВЭЖХ данной фракции не позволила получить приемлемый профиль и локализовать индивидуальные пики ввиду наличия, по всей видимости, высокомолекулярных компонентов, приводящих к снижению разрешающей способности (данные не приведены).

Определение филогенетического положения штамма ACA25 и поиск детерминант антимикробной

активности в его геноме. По результатам сборки генома штамма ACA25 было получено 87 контигов общим размером 5433563 п.о. с ГЦ-составом 71.46%, размер наибольшего контига составил 825440 п.о., значение параметра N50 – 299656 п.о. Окончательное покрытие сборки генома составило 130×, полнота сборки – 95.7%, контаминация – 0.5%, что было достаточно для достоверной аннотации и анализа генома. С помощью программного пакета NCBI PGAP в геноме было предсказано 4475 белок-кодирующих генов. Анализ полной последовательности гена 16S рРНК против базы данных NCBI nucleotide выявил, что ближайшим родственником штамма ACA25 является *Streptomyces jeddahensis* с уровнем сходства последовательности гена 16S РНК 96.88%, что указывает на принадлежность штамма ACA25 к новому виду рода *Streptomyces*. Это подтвердилось при анализе средней идентичности аминокислотных последовательностей (ANI), которая составила для штамма ACA25 ~85% с ближайшим родственным организмом (предварительный отбор наиболее близкородственных организмов был произведен с помощью blast-анализа последовательности гена *rpoB* ACA25 против баз данных NCBI gene). Таким образом, для дальнейшей работы этот организм был обозначен *Streptomyces* sp. ACA25. Анализ генома при помощи Интернет-сервиса antiSMASH выявил 36 различных кластеров биосинтеза вторичных метаболитов (regions), в том числе, пептидов с антимикробной активностью (линаридина, лантипептидов, тиаамидов), поликетидных соединений, бутиролактонов и β-лактонов, а также рибосомально синтезируемых посттрансляционно модифицируемых пептидов (RiPP; Arnison et al., 2013), к которым относится известный антимикробный полипептид низин. Для 30 из 36 выявленных кластеров программным средством KnownClusterBlast были найдены гомологичные кластеры биосинтеза известных антибиотиков или цитотоксинов. Данные по кластерам биосинтеза вторичных метаболитов *Streptomyces* sp. ACA25 с наибольшей гомологией к уже известным кластерам указаны в табл. 1. Большинство выявленных кластеров биосинтеза вторичных метаболитов в геноме ACA25 кодирует различные поликетидсинтазы – ключевые ферменты биосинтеза поликетидных вторичных метаболитов, многие из которых, в частности, доксициклин и эритромицин, являются важнейшими антибиотиками. Интересно, что два кластера генов поликетидсинтаз содержат также гены нерибосомальных пептидсинтаз (NRPS), определяющих биосинтез другого обширного класса вторичных метаболитов – нерибосомально синтезируемых пептидов (табл. 1).

Идентификация антимикробных соединений в активных фракциях культуральной жидкости и клеток штамма ACA25. Для выявления известных

классов антимикробных соединений во фракциях культур ACA25 были использованы различные модификации MALDI-TOF MS-анализа. В качестве базы данных для идентификации результатов масс-спектрометрических исследований из предыдущих публикаций были получены значения молекулярных масс всех антибиотиков, продукция которых штаммом ACA25 была предсказана биоинформатическими методами (табл. 1). Прямой анализ активного этилацетатного экстракта культуральной жидкости *Streptomyces* sp. ACA25 выявил наличие характерного пика в масс-спектре (рис. 2а), который был также детектирован в активном экстракте биомассы клеток, но отсутствовал в контрольных препаратах, полученных из неинкулированной питательной среды и неактивной культуральной жидкости, собранной после 24 ч инкубирования (данные не показаны). Этот пик соответствует веществу массой 326.2 [M + H] Да и на основании сравнения с базами данных может принадлежать β-лактаму или хинолону. Анализ элюата активной культуральной жидкости, полученного на гидрофобной колонке Amberlite XAD2, также выявил в масс-спектре характерный пик вещества массой 582.3 [M + H] Да или, собственно, массой молекулярного иона 581.28 Да (рис. 2б). Наиболее близкой к этому значению массой обладает розамицин (581.7 Да). Предполагаемые кластеры биосинтеза розамицина в геноме ACA25, содержащие гены поликетидсинтаз I типа, выделены цветом в табл. 1.

Скрининг компонентов экстрактов культуральной жидкости штамма ACA25, ингибирующих бактериальную трансляцию. Препараты различных фракций культур штамма ACA25 были протестированы на наличие активности, ингибирующей трансляцию у бактерий *in vitro*. Слабая ингибирующая активность в бесклеточной системе трансляции мРНК люциферазы светлячка (*Fluc*) была зафиксирована только в препарате элюата активной культуральной жидкости, полученном на гидрофобной колонке Amberlite XAD2, высушенном досуха и затем растворенном в 50%-м водном этаноле. На целых клетках *Streptomyces* sp. ACA25 или на нативной культуральной жидкости такой эффект зафиксирован не был, побочная активность экстрагентов и растворителей также отсутствовала. При этом активный элюат не индуцировал люциферазный репортер *in vivo* у тестового штамма *E. coli lptD^{mut}*. Этот штамм не только трансформирован репортерной плазмидой pDualrep2 (Osterman et al., 2016), но и имеет мутацию в гене *lptD*, кодирующем один из ключевых белков сборки липополисахаридов во внешней мембране. Делеция в гене *lptD* значительно повышает чувствительность штамма к ряду антибиотиков, включая высокомолекулярные соединения, такие как тиострептон с молекулярной массой 1665 Да (Orelle et al., 2013). Ингибирование этого высоко-

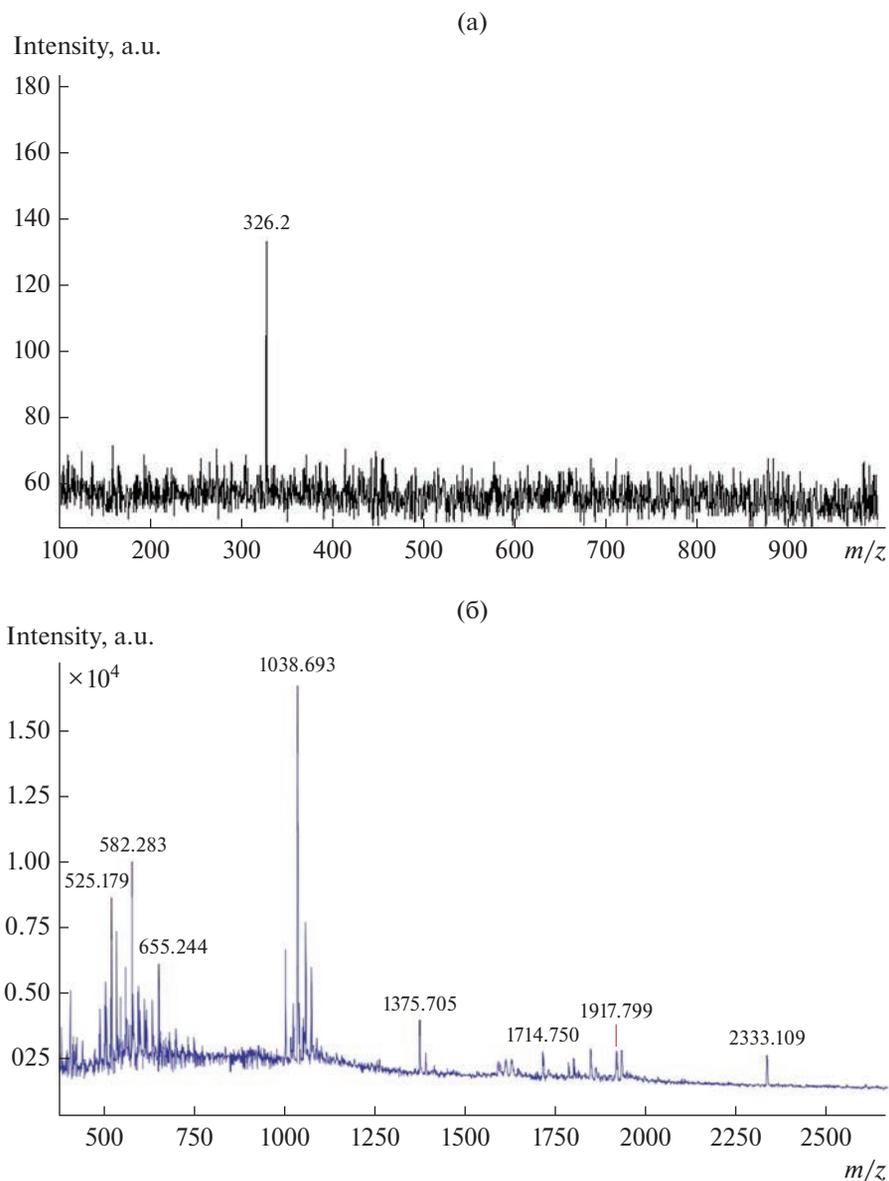


Рис. 2. Масс-спектры этилацетатного экстракта культуральной жидкости штамма ACA25 (а) и его активной фракции, элюированной с колонки Amberlite (б). Характерные пики предполагаемых антимикробных соединений соответствуют массе 326.200 Да (β -лактам или хинолон; хроматограмма (а)) и 581.283 Да (розамицин или его близкий гомолог; хроматограмма (б)).

чувствительного штамма ни для одного из препаратов культуральной жидкости ACA25 и ее фракций детектировано не было.

ОБСУЖДЕНИЕ

Проблема роста антибиотикорезистентности патогенных микроорганизмов порождает интерес к активному поиску все новых соединений, обладающих антимикробной активностью, а также к поиску их продуцентов, которые могут быть использованы в промышленных масштабах. Большой интерес представляют экстремофильные микроор-

ганизмы, эволюционно приспособленные к одному или нескольким физико-химическим экстремумам окружающей среды. С одной стороны, условия экстремальных экосистем (повышенные или пониженные температуры, повышенная кислотность или щелочность, высокие концентрации солей вплоть до насыщения) накладывают дополнительные ограничения на разнообразие населяющих их организмов и межвидовых антагонистических взаимодействий, результатом которых и является продукция антимикробных веществ. Однако с другой стороны, конкуренция в таких условиях может возрастать и стимулировать эволюцию путей

биосинтеза антимикробных соединений узкого спектра действия, но повышенной устойчивости и активности. Неудивительно, что такие вещества, галоцины, были обнаружены уже в первых работах, посвященных поиску новых продуцентов антибиотиков среди экстремофилов, а именно, среди галофилов (Rodríguez-Valera et al., 1982). Несмотря на то, что спектр активности антимикробных соединений, продуцируемых галофильными археями, оказался далек от практически значимого для человека (эти вещества активны, в основном, против других галофильных микроорганизмов), поиск новых вторичных метаболитов экстремофильных микроорганизмов продолжился и к настоящему времени уже выявил несколько соединений, активных против бактериальных и грибковых патогенов (Birbir et al. 2004, 2007, Quadri et al., 2016).

В настоящее время развиваются несколько стратегий поиска новых антибиотиков – биоинформатический поиск генных кластеров биосинтеза вторичных метаболитов в геномах отдельных микроорганизмов или метагеномах разнообразных микробных сообществ; классический микробиологический способ получения накопительных и чистых культур новых продуцентов антибиотиков с последующим выделением и идентификацией их антимикробных соединений; поиск новых веществ, образуемых известными продуцентами или близкородственными им микроорганизмами. В нашей работе мы применили каждый из этих подходов к трем различным группам экстремофильных микроорганизмов и их сообществ. Биоинформатический поиск путей биосинтеза вторичных метаболитов был применен к метагеномам микробных сообществ подземных термальных хлоридно-гидрокарбонатных натриевых минеральных вод. Скрининг антимикробной активности был проведен среди психрофильных накопительных культур, полученных из глубинных холодных океанских осадков. Кроме того, были идентифицированы классы антимикробных соединений, продуцируемых новым натронофильным изолятом рода *Streptomyces*, выделенным из содовых солончаков.

Биоинформатический поиск выявил нескольких новых потенциальных продуцентов антимикробных соединений в микробных сообществах минеральных вод типов Эссентуки № 4 и № 17. Интересно, что большинство потенциальных продуцентов относится к некультивируемым таксонам, для которых ранее антимикробная активность не была показана даже на уровне геномов. Так, в сообществе минеральной воды Эссентуки № 4 скважины 46 ЕММВ среди предполагаемых продуцентов антимикробных соединений оказались некультивируемые нитроспиреи порядка *Thermodesulfovibrionales*, некультивируемые актиномицеты порядка RBG-13-55-18, некультивируемые археи филума *Aenigmataarchaeota*, класса *Bathylarchaeia* филума *Thermoproteota*, а также порядков

Methanomicrobiales, *Methanocellales* и группы ANME-1-THS филума *Halobacteriota* (табл. 1). В настоящее время антимикробная активность показана только для представителей *Halobacteriota*, эволюционно далеких от вышеупомянутых групп метаногенов и метанотрофов (Singh, Singh, 2017). Тем не менее, с помощью программных средств MIBiG cluster comparison и KnownClusterBlast Интернет-сервиса antiSMASH были выявлены кластеры биосинтеза известных антибиотиков и цитотоксинов, гомологичные кластерам, детектированным нами у некультивируемых групп бактерий и архей (табл. 1), хотя уровень гомологии был ожидаемо низким. Интересно, что потенциальные продуценты антибиотиков присутствуют в природных микробных сообществах минеральных вод типов Эссентуки № 4 и № 17, используемых в лечебных целях. Ранее имелись единичные сообщения об антимикробной активности представителей рода *Pseudomonas*, детектированных в бутилированных минеральных водах, однако прямая связь между активностью соответствующих штаммов в чистой культуре и в микробном сообществе минеральной воды прослежена не была (Leclerc, da Costa, 2005).

Скрининг антимикробной активности психрофильных накопительных культур, растущих при повышенной солености океанской воды, выявил микробные сообщества с антагонистической активностью против *P. aeruginosa*. Филогенетический анализ этих накопительных культур показал отбор в них нескольких филотипов класса *Desulfuromonadia* (рис. 1), для которых ранее также не была показана способность к продукции антимикробных соединений. Анализ геномов бактерий, филогенетически наиболее близких к обнаруженным филотипам, выявил кластеры биосинтеза вторичных метаболитов с потенциальной антимикробной активностью (табл. 1), что позволяет предположить способность к продукции антибиотиков представителями рода *Geopsychrobacter* и новой некультивируемой группы внутри *Desulfuromonadia* с ближайшим родственным секвенированным организмом рода *Syntrophotalea*, накопившимися в полученных нами культурах 23-2 и 24-2.

Наиболее стабильная антимикробная активность широкого спектра действия была детектирована у натронофильного стрептомицета штамма ACA25, который был отнесен нами к новому виду рода *Streptomyces* на основании геномного анализа. Этот результат был вполне ожидаем для актиномицета, выделенного из почвенного образца. Характерен и факт наличия выраженной антимикробной активности исключительно по отношению к грамположительным бактериям у *Streptomyces* sp. ACA25. Это является достаточно распространенным свойством стрептомицетов (Quinn et al., 2020; Al-Shaibani et al., 2021). Все известные к настоящему времени антибиотики бактерий рода *Strept-*

tomyces включают в себя 5 классов веществ по механизму антибактериального действия или 8 классов веществ, различных по своей химической структуре. Стрептомицеты продуцируют антибиотики, подавляющие ДНК-топоизомеразу (хинолоны), ДНК-зависимую РНК-полимеразу (рифамицин), биосинтез клеточной стенки (ванкомицин), рибосомальный синтез белков (стрептомицин, канамицин), а также антибиотики, изменяющие проницаемость клеточных мембран (даптомицин). В структурном отношении большая часть антибиотиков стрептомицетов относится к пептидам. К концу XX в. было описано несколько сотен пептидных антибиотиков (Hancock, Chapple, 1999), в их числе продуцируемые актиномицетами липопептиды, 2,5-дикетопиперазины (ДКП), димерные пептиды, нуклеозидные пептиды, тиоамитиды (тиоамидсодержащие пептиды), тиопептиды, пептиды лассо (также иногда называемые лариатными пептидами) и типичные циклические пептиды. Большинство пептидных антибиотиков синтезируется нерибосомально. Известны среди них и рибосомально синтезируемые, посттрансляционно модифицируемые пептиды (RiPP), например, лантибиотики (Arnison et al., 2013).

В геноме натронофила *Streptomyces* sp. ACA25 нами были выявлены пути биосинтеза пептидных антибиотиков, в том числе, был обнаружен генный кластер, практически идентичный кластеру биосинтеза лантибиотика SapB (Kodani et al., 2004), продуцируемого штаммом A3(2) *S. coelicolor*, а также генные кластеры, кодирующие поликетидсинтазы трех различных типов (T1-3PKS) и путь биосинтеза непептидных антибиотиков класса β -лактамов (табл. 1). Полученные геномные данные соотносятся с результатами идентификации двух различных классов антимикробных соединений в экстрактах культуральной жидкости и клеток штамма ACA25. В активном этилацетатном экстракте культуральной жидкости и биомассы было детектировано вещество, относящееся к классам β -лактамов или хинолонов (рис. 2а). В то же время, в хроматографической фракции культуральной жидкости после ее разделения на гидрофобной колонке было детектировано вещество, идентичное по своей массе розамицину, синтез которого обуславливается активностью поликетидсинтаз 1 типа (рис. 2б). В геноме штамма ACA25 нами были обнаружены кластеры биосинтеза обоих этих классов антимикробных соединений (табл. 1). Розамицин представляет собой жирорастворимый основной макролид, сходный с эритромицином. У этого вещества есть липидный хвост, что обуславливает его гидрофобность и, следовательно, возможность связываться с гидрофобной фазой хроматографической колонки. Известно, что розамицин обладает большей активностью в отношении грамтрицательных бак-

терий (Rfimann, Jaret, 1972; Waitz et al., 1972). В наших экспериментах большинство фракций и препаратов культур штамма ACA25 были неактивны против них. Однако одна из активных хроматографических фракций культуральной жидкости все же проявила слабую активность ингибирования трансляции *in vitro* в бесклеточной системе, что косвенно подтверждает наличие некоего гомолога розамицина в смеси продуцируемых штаммом ACA25 антимикробных соединений. Тем не менее, противомикробные свойства этого организма нельзя в полной мере объяснить синтезом именно розамицина, что дает основания предположить продукцию новых веществ, сходных по химическому составу с розамицином, но отличающихся по спектру действия. Этот факт, а также отсутствие в полученных нами активных фракциях пептидных антибиотиков, биосинтез которых детерминирован в геноме *Streptomyces* sp. ACA25, говорит о необходимости продолжения работ по изучению всего спектра антимикробных соединений, продуцируемых этим микроорганизмом.

В целом, результаты нашего поиска новых продуцентов антимикробных соединений показали, что даже потенциал стрептомицетов в этом отношении еще не исчерпан, и можно ожидать обнаружения как новых, так и уже известных антимикробных соединений с различным спектром активности, продуцируемых экстремофильными представителями рода *Streptomyces*. Кроме того, более широкий скрининг микробных сообществ, приспособленных к разнообразным физико-химическим экстремумам среды, в частности, к высокой солености в сочетании с одним или несколькими другими критическими для развития жизни факторами, позволяет выявить потенциальных продуцентов совершенно новых антимикробных веществ, многие из которых могут представлять собой новые классы соединений по своей структуре и спектру биологической активности. При этом, сочетание геномных и культуральных методов скрининга является, на наш взгляд, наиболее эффективной стратегией поиска продуцентов новых антибиотиков. Так, выявленные генные кластеры биосинтеза вторичных метаболитов у представителей некультивируемых групп микроорганизмов могут быть использованы для получения рекомбинантных штаммов-продуцентов новых антимикробных соединений. В то же время, накопительные культуры с антимикробной активностью можно использовать как для получения и характеристики чистых культур новых продуцентов, так и для получения рекомбинантных штаммов-продуцентов на основе геномных данных.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность за помощь в отборе океанских проб научной группе 79-го рейса, капи-

тану и команде НИС “Академик Мстислав Келдыш”, а также лично Наталье Шульга (ИО РАН) за организацию микробиологической работы на судне. Авторы также благодарны недропользователю ЕММВ ООО “Холдинг-Аква” за предоставление доступа к эксплуатационным скважинам месторождения. Авторы выражают признательность Ксении Заюлиной и Александру Ельченинову (ИНМИ ФИЦ Биотехнологии РАН) за подготовку биомассы *Streptomyces* sp. АСА25, а также Анитре Рабесона (Dr. Hanitra Rabesona, INRAE) за совместную работу по исследованию антимикробной активности этого организма в рамках проекта 347-ExtremoPharm в 2016–2018 гг.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при поддержке проекта РФФИ № 20-04-01142 (работа по *Streptomyces* sp. АСА25 и анализу метабеномов психрофильных накопительных культур), а также РНФ № 21-14-00333 (секвенирование и первичный анализ метабеномов микробных сообществ Ессентукских минеральных вод) и Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (постановка накопительных культур с минералами Fe и Mn). Работы проф. Т. Эртле по анализу активности *Streptomyces* sp. АСА25 были выполнены в 2016–2018 гг. при поддержке международного проекта РФФИ № 16-54-76022 ЭРА_а/347-ExtremoPharm.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют отсутствие конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Абрамов В.Ю., Вавичкин А.Ю. Особенности формирования термогазохимического состава минеральных вод Ессентукского месторождения // Разведка и охрана недр. 2010. № 10. С. 27–32.
- Гаврилов С.Н., Потапов Е.Г., Прокофьева М.И., Ключкина А.А., Меркель А.Ю., Маслов А.А., Заварзина Д.Г. Разнообразие новых некультивируемых прокариот в микробных сообществах минеральных подземных вод Ессентукского месторождения // Микробиология. 2022. Т. 91. С. 32–49.
- Gavrilov S.N., Potapov E.G., Prokofeva M.I., Klyukina A.A., Merkel A.Y., Maslov A.A., Zavarzina D.G. Diversity of novel uncultured prokaryotes in microbial communities of the Yessentukskoye underground mineral water deposit // Microbiology (Moscow). 2022. V. 91. P. 28–44.
- Лапчинская О.А., Катруха Г.С., Гладких Е.Г., Куляева В.В., Кудан П.В., Топольян А.П., Алфёрова В.А., Погочева В.В., Суконников М.А., Рогожин Е.А., Прохоренко И.А., Брылёв В.А., Королёв А.М., Слюндина М.С., Борисов Р.С., Себрякова М.В., Шувалов М.В., Ксенофонтов А.Л., Стоянова Л.Г., Остерман И.А., Формановский А.А., Ташицкий В.Н., Баратова Л.А., Тимофеева А.В., Тюрин А.П. Исследование антибиотического комплекса ИНА-5812 // Биоорганическая химия. 2016. Т. 42. С. 732–740.
- Al-Dhabi N.A., Esmail G.A., Duraipandiyar V., Arasu M.V., Salem-Bekhit M.M. Isolation, identification and screening of antimicrobial thermophilic *Streptomyces* sp. Al-Dhabi-1 isolated from Tharban hot spring, Saudi Arabia // Extremophiles. 2016. V. 20. P. 79–90.
- Alkhalili N., Canback B. Identification of putative novel class-I lanthipeptides in *Firmicutes*: a combinatorial in silico analysis approach performed on genome sequenced bacteria and a close inspection of Z-geobacillin lanthipeptide biosynthesis gene cluster of the thermophilic *Geobacillus* sp. strain ZGt-1 // Int. J. Mol. Sci. 2018. V. 19. P. 2650.
- Al-Shaibani M.M., Radin Mohamed R.M.S., Sidik N.M., Enshasy H.A.E., Al-Gheethi A., Noman E., Al-Mekhlafi N.A., Zin N.M. Biodiversity of secondary metabolites compounds isolated from phylum *Actinobacteria* and its therapeutic applications // Molecules. 2021. V. 26. P. 4504.
- Arnison P.G., Bibb M.J., Bierbaum G., Bowers A.A., Bugni T.S., Bulaj G., Camarero J.A., Campopiano D.J., Challis G.L. et al. Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products: overview and recommendations for a universal nomenclature // Nat. Prod. Rep. 2013. V. 30. P. 108–160.
- Besse A., Peduzzi J., Rebuffat S., Carré-Mlouka A. Antimicrobial peptides and proteins in the face of extremes: Lessons from archaeocins // Biochimie. 2015. V. 118. Art. 344e355.
- Birbir M., Eryilmaz S., Ogan A. Prevention of halophilic microbial damage on brine cured hides by extremely halophilic halocin producer strains // J. Soc. Leather Technol. Chem. 2004. V. 88. P. 99–104.
- Birbir M., Calli B., Mertoglu B., Bardavid R.E., Oren A., Ogmen M.N., Ogan A. Extremely halophilic Archaea from Tuz Lake, Turkey, and the adjacent Kaldirim and Kayacik salt-erns // World J. Microbiol. Biotechnol. 2007. V. 23. P. 309–316.
- Blin K., Shaw S., Kloosterman A.M., Charlop-Powers Z., van Weezel G.P., Medema M.H., Weber T. antiSMASH 6.0: improving cluster detection and comparison capabilities // Nucl. Acids Res. 2021. V. 49(W1). P. W29–W35.
- Bonade A., Murelli F., Vescovo M., Scolari G., Bonade A. Partial characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* // Lett. Appl. Microbiol. 2001. V. 33. P. 153–158.
- Butler M.S., Blaskovich M.A., Owen J.G., Cooper M.A. Old dogs and new tricks in antimicrobial discovery // Curr. Opin. Microbiol. 2016. V. 33. P. 25–34.
- Butler M.S., Blaskovich M.A., Cooper M.A. Antibiotics in the clinical pipeline at the end of 2015 // J. Antibiot. (Tokyo). 2017. V. 70. P. 3–24.
- de Castro A.P., Gabriel da R. Fernandes G.R., Franco O.L. Insights into novel antimicrobial compounds and antibiotic resistance genes from soil metagenomes // Front. Microbiol. 2014. e 00489.

- Cheng Y.Q., Tang G.L., Shen B. Identification and localization of the gene cluster encoding biosynthesis of the antitumor macrolactam leinamycin in *Streptomyces atroolivaceus* S-140 // J. Bacteriol. 2002. V. 184. P. 7013–7024.
- CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 30th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2020.
- Coker J.A. Extremophiles and biotechnology: current uses and prospects // F1000Res. 2016. V. 5: F1000 Faculty Rev-396. PMC4806705.
- Dietera A., Hamm A., Fiedler H., Goodfellow M., Muller W. et al. Pyrocoll, an antibiotic, antiparasitic and antitumor compound produced a novel alkaliphilic *Streptomyces* strain // J. Antibiot. (Tokyo). 2003. V. 56. P. 639–646.
- Garg N., Tang W., Goto Y., Nair S.K., Donk W.A. Van Der. Lantibiotics from *Geobacillus thermodenitrificans* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2012. V. 109. P. 5241–5246.
- Hancock R.E.W., Chapple D.S. Peptide antibiotics // Antimicrob. Agents Chemother. 1999. V. 43. P. 1317–1323.
- Hofer U. The cost of antimicrobial resistance // Nat. Rev. Microbiol. 2019. V. 17. s41579-018-0125-x
- Horwood P.F., Burgess G.W., Oakey H.J. Evidence for non-ribosomal peptide synthetase production of cereulide (the emetic toxin) in *Bacillus cereus* // FEMS Microbiol. Lett. 2004. V. 236. P. 319–324.
- Khomyakova M.A., Zavarzina D.G., Merkel A.Y., Klyukina A.A., Pikhtereva V.A., Gavrilov S.N., Slobodkin A.I. The first cultivated representatives of the actinobacterial lineage OPB41 isolated from subsurface environments constitute a novel order *Anaerosomatales* // Front. Microbiol. 2022. V. 13. Art. 1047580.
- Kodani S., Hudson M.E., Durrant M.C., Buttner M.J., Nodwell J.R., Willey J.M. et al. The SapB morphogen is a lantibiotic-like peptide derived from the product of the developmental gene *ramS* in *Streptomyces coelicolor* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004. V. 101. P. 11448–11453.
- Leclerc H., Costa M.S. Microbiology of natural mineral waters // Technology of Bottled Water. 2nd ed. / Eds. Senior D., Dege N. Blackwell, 2005. P. 325–387.
- Mantravadi P.K., Kalesh K.A., Dobson R.C.J., Hudson A.O. The quest for novel antimicrobial compounds: emerging trends in research, development, and technologies // Antibiotics. 2019. V. 8. P. 8.
- McClerren A.L., Cooper L.E., Quan C., Thomas P.M., Kelleher N.L. et al. Discovery and in vitro biosynthesis of haloduracin, a two-component lantibiotic // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006. V. 103. P. 17243–17248.
- Merkel A.Y., Chernyh N.A., Pimenov N.V., Elizaveta A., Bonch-Osmolovskaya E.A., Slobodkin A.I. Diversity and metabolic potential of the terrestrial mud volcano microbial community with a high abundance of Archaea mediating the anaerobic oxidation of methane // Life. 2021. V. 11. P. 953.
- Mullis M.M., Rambo I.M., Baker B.J., Reese B.K. et al. Diversity, ecology, and prevalence of antimicrobials in nature // Front. Microbiol. 2019. Art. e02518.
- Murray C.J.L., Ikuta K.S., Sharara F., Swetschinski L., Aguilar G.R., Gray A., Han C. et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis // Lancet. 2022. V. 399. P. 629–655.
- Novotny J.F., Perry J.J., Carolina N. Characterization of bacteriocins from two strains of *Bacillus thermoleovorans*, a thermophilic hydrocarbon-utilizing species // Appl. Environ. Microbiol. 1992. V. 58. P. 2393–2396.
- Orelle C., Carlson S., Kaushal B., Almutairi M.M., Liu H., Ochabowicz A., Quan S., Pham V.C., Squires C.L., Murphy B.T., Mankin A.S. Tools for characterizing bacterial protein synthesis inhibitors // Antimicrob. Agents Chemother. 2013. V. 57. P. 5994–6004.
- Osterman I.A., Komarova E.S., Shiryayev D.I., Korniltsev I.A., Khven I.M., Lukyanov D.A., Tashliitsky V.N., Serebryakova M.V., Efremenkova O.V., Ivanenkov Y.A., Bogdanov A.A., Sergiev P.V., Dontsova O.A. Sorting out antibiotics' mechanisms of action: a double fluorescent protein reporter for high-throughput screening of ribosome and DNA biosynthesis inhibitors // Antimicrob. Agents Chemother. 2016. V. 60. P. 7481–7489.
- Parker E.N., Cain B.N., Hajian B., Ulrich R.J., Geddes E.J., Barko S., Lee H.Y., Williams J.D., Raynor M., Caridha D., Zaino A., Shekhar M., Muñoz K.A., Rzasa K.M., Emily R., Temple E.R., Hunt D., Jin X., Vuong C., Pannone K., Kelly A.M., Mulligan M.P., Lee K.K., Lau G.W., Hung D.T., Hergenrother P.J. An iterative approach guides discovery of the FabI inhibitor fabimycin, a late-stage antibiotic candidate with *in vivo* efficacy against drug-resistant gram-negative infections // ACS Cent. Sci. 2022. V. 8. P. 1145–1158.
- Pathom-Aree W., Stach J.E., Ward A.C., Horikoshi K., Bull A.T., Goodfellow M. Diversity of actinomycetes isolated from Challenger Deep sediment (10,898 m) from the Mariana Trench // Extremophiles. 2006. V. 10. P. 181–189.
- Procópio R.E., Silva I.R., Martins M.K., Azevedo J.L., Araújo J.M. Antibiotics produced by *Streptomyces* // Braz. J. Infect. Dis. 2012. V. 16. P. 466–471.
- Rfimann H., Jaret R.S. Structure of rosamicin, a new macrolide from *Micromonospora rosaria* // J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1972. P. 1270.
- Quinn G.A., Banat A.M., Abdelhameed A.M., Banat I.M. Streptomyces from traditional medicine: sources of new innovations in antibiotic discovery // J. Med. Microbiol. 2020. V. 69. P. 1040–1048.
- Ravel J., Wellington E.M., Hill R.T. Interspecific transfer of *Streptomyces* giant linear plasmids in sterile amended soil microcosms // Appl. Environ. Microbiol. 2000. V. 66. P. 529–534.
- Sorokin D.Y., Kolganova T.V., Khijniak T.V., Jones B.E., Kublanov I.V. Diversity of cultivated aerobic poly-hydrolytic bacteria in saline alkaline soils // Peer J. 2017. e3796.
- Svetlov M.S., Kommer A., Kolb V.A., Spirin A.S. Effective cotranslational folding of firefly luciferase without chaperones of the Hsp70 family // Protein Sci. V. 15. P. 242–247.
- Tatusova T., DiCuccio M., Badretdin A., Chetvernin V., Nawrocki E.P., Zaslavsky L., Lomsadze A., Pruitt K.D., Borodovsky M., Ostell J. NCBI Prokaryotic genome annotation pipeline // Nucleic Acids Res. 2016. V. 44. P. 6614–6624.
- Terra L., Dyson P.J., Hitchings M.D., Thomas L., Abdelhameed A. et al. A novel alkaliphilic *Streptomyces* inhibits ES-KAPE pathogens // Front. Microbiol. 2018. V. 9. e2458.
- Quadri I., Hassani I.I., l'Haridon S., Chalopin M., Hacène H., Jebbar M. Characterization and antimicrobial potential of extremely halophilic archaea isolated from hypersaline en-

vironments of the Algerian Sahara // *Microbiol. Res.* 2016. V. 186–187. P. 119–131.
 Waitz J.A., Drube C.G., Moss E.L., Weinstein M.J. Biological studies with rosamicin, a new *Micromonospora*-produced macrolide antibiotic // *J. Antibiotics.* 1972. V. 25. P. 647–652.

Watve M.G., Tickoo R., Jog M.M., Bhole B.D. How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? // *Arch. Microbiol.* 2001. V. 176. P. 386–390.

Wick R.R., Judd L. M., Gorrie C.L., Holt K.E. Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads // *PLoS Comput. Biol.* 2017. e1005595.

Search for Novel Halophilic and Halotolerant Producers of Antimicrobial Compounds in Various Extreme Ecosystems

S. N. Gavrilo^{1, *}, A. S. Barashkova², T. A. Cherdyntseva³, M. I. Prokofeva¹, O. V. Tresvyatskii³,
 D. A. Lukianov^{4, 5}, A. A. Nikandrova^{3, 5}, T. Haertle⁶, A. Yu. Merkel¹,
 E. A. Bonch-Osmolovskaya^{1, 3}, and E. A. Rogozhin^{2, 7}

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

²Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117997 Russia

³Faculty of Biology, Moscow State University, Moscow, 119234 Russia

⁴Faculty of Chemistry, Moscow State University, Moscow, 119234 Russia

⁵Koltech Center of Life Science, Moscow, 121205 Russia

⁶Institut National de Recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement, Nantes, 44316 France

⁷All-Russian Institute of Plant Protection, St.-Petersburg-Pushkin, 196608 Russia

*e-mail: sngavrilo@gmail.com

Received December 15, 2022; revised January 30, 2023; accepted January 30, 2023

Abstract—The recent increase of antibiotic resistance in pathogenic microorganisms stimulated interest in the search for new antimicrobial compounds and their producers. Among the latter, halophilic microorganisms are considered to be the most promising group, since actinomycetes, producers of the majority of the known clinically important classes of antibiotics, are widely represented in this group. The present work reports the results of the search with three different approaches for new antimicrobial compounds in halophilic and halotolerant microorganisms inhabiting three different types of extreme ecosystems. Metagenomic analysis of microbial communities of subsurface thermal mineral waters revealed biosynthetic clusters of putative antimicrobial compounds, which belong to bacteria and archaea of uncultured lineages. Enrichment cultures with antimicrobial activity were obtained from the cold, deep oceanic sediments; analysis of their phylogenetic diversity resulted in identification of the potential producers of antimicrobial compounds as the members of class *Desulfuromonadia*. Finally, antimicrobial activity of a new species of soil natronophilic streptomycetes, *Streptomyces* sp. ACA25, was characterized; it was active only against gram-positive bacteria. The genome of this organism was sequenced, and the pathways for biosynthesis of polypeptide, polyketide, and beta-lactam antibiotics were identified. Active fractions of the ACA25 culture, containing antimicrobial compounds of polyketide and beta-lactam nature, were obtained. The active polyketide was identified as rosamicin, an antibiotic of the macrolide structural group. However, the fact that it did not inhibit bacterial translation highlighted structural differences between the new polyketide and rosamicin.

Keywords: extremophiles, halophiles, *Streptomyces*, novel antibiotics, archaeal antimicrobial activity

АДАПТАЦИЯ АЦИДОФИЛЬНОГО ГРИБА *SISTOTREMA BRINKMANNII* К pH ФАКТОРУ

© 2023 г. Е. А. Януцевич^{a, *}, О. А. Данилова^a, О. А. Грум-Гржимайло^{b, c},
Н. В. Гроза^d, В. М. Терёшина^a

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

^bБеломорская биологическая станция им. Н.А. Перцова биологического факультета
Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, 119234 Россия

^cЛаборатория генетики, группа изучения растений, университет Вагенингена, пер. Друвендал 1,
Вагенинген, 6708PV Нидерланды

^dКафедра химии и технологии биологически активных соединений, медицинской и органической химии
им. Н.А. Преображенского, МИРЭА – Российский технологический университет, Москва, 119571 Россия

*e-mail: e.a.ianutsevich@gmail.com

Поступила в редакцию 26.12.2022 г.

После доработки 17.01.2023 г.

Принята к публикации 17.01.2023 г.

Исследование скорости роста гриба *Sistotrema brinkmannii* при различных значениях pH среды, температуры и концентрации NaCl показало, что он является мезофилом, предпочитает бессолевою среду и относится к облигатным ацидофилам, так как имеет выраженный оптимум роста при pH 3.0–4.0 и не растет при pH 7.0. Для изучения защитных механизмов, позволяющих грибу развиваться в кислых условиях среды, был исследован состав его осмолитов и липидов. Впервые показано, что в мицелии гриба в динамике роста в оптимальных условиях присутствует большое количество трегалозы (4.0–6.6% от сухой массы), что доказывает участие осмолитов в адаптации у ацидофилов. При этом на границах диапазона роста (pH 2.6 и 6.0) количество трегалозы в мицелии гриба снижалось в 2.5 раза, что соответствует узкому оптимуму роста гриба в природных условиях (pH 3.0–4.0). Отличительной чертой состава мембранных липидов гриба является высокая доля сфинголипидов (до 60% от суммы), которая в динамике роста в оптимальных условиях снижается вдвое. К основным мембранным липидам, кроме сфинголипидов, также относятся фосфатидные кислоты, фосфатидилэтаноламины и стерины, доля которых с возрастом увеличивается. Состав мембранных липидов гриба при pH 2.6 практически не отличается от оптимальных условий, тогда как в околонейтральной области наблюдается двукратное повышение доли сфинголипидов, что указывает на их адаптивное значение. Одновременное снижение доли сфинголипидов и рост уровня трегалозы в динамике роста позволяет предположить взаимосвязь этих соединений в защите мембран клетки.

Ключевые слова: мицелиальные грибы, ацидофилия, осмолиты, трегалоза, мембранные липиды, фосфатидные кислоты

DOI: 10.31857/S0026365622600870, **EDN:** FXCVII

Среди всего многообразия живых организмов микроскопические грибы не имеют себе равных по способности осваивать различные экологические ниши (Gonçalves et al., 2012). Полагают, что грибы играют ключевую роль в функционировании экстремальных экосистем (Coleine et al., 2022). Исследование экстремофилов имеет значение не только для понимания биохимических основ жизни на Земле и поиска внеземной жизни, но также для экологии – сохранения биоценозов в условиях резких изменений климата и усилении антропогенного влияния (Hallsworth et al., 2021).

Изучение механизмов адаптации экстремофильных организмов дает возможность выявить, какие адаптационные механизмы и свойства биомолекул позволили им освоить экстремальные ниши обитания.

В природных условиях фактор pH оказывает большое влияние на рост и развитие микроорганизмов. Большинство грибов предпочитают околонейтральные условия (pH 6.0–7.0). Внешний pH изменяет заряд мембраны, влияет на усвояемость субстратов, функции белков, токсичность ионов металлов (Rousk et al., 2009).

Природные местообитания с кислыми условиями (рН 3.0–4.0) встречаются достаточно часто и включают почвы, озера, болота и торфяники (Gross, Robbins, 2000). Экстремально кислые местообитания (рН < 3.0) встречаются во многих частях мира и бывают как природного (наземные гидротермальные источники, вулканические озера), так и антропогенного (кислые отвалы угольных шахт, рудничные и промышленные сточные воды, дренаж) происхождения.

Помимо бактерий и архей в таких местообитаниях присутствуют также и эукариоты – водоросли, простейшие и грибы (Amaral-Zettler, 2012). Среди наиболее ацидофильных эукариот выделяют красную водоросль *Cyanidium caldarium* (оптимум рН 2.0–3.0), зеленую водоросль *Dunaliella acidophila* (оптимум рН 1.0) и 3 гриба: *Acontium cylatium*, *Cephalosporium* sp. и *Trichosporon cerebriae* (растут при рН 0) (Rothschild, Mancinelli, 2001). В природных условиях в гиперкислых местообитаниях (рН < 3.0) бактерии, грибы, водоросли и простейшие образуют биопленки (Baker et al., 2009; Aguilera, González-Toril, 2019), которые являются местом осаждения металлов и минералов и служат субстратом для последующих популяций микроорганизмов. Ацидофилами называют грибы, способные к росту в кислых условиях вплоть до рН 1.0, но не растущие в нейтральных условиях, тогда как ацидотолеранты растут в кислых, нейтральных или даже слабощелочных условиях (Coleine et al., 2022). Так, для ацидофильного гриба *Acidomyces acidophilus* оптимальными являются условия с рН 3.0–5.0, но и при рН 1.0 сохраняется способность к росту. Среди бактерий принято выделять ацидофилов (растут при рН < 5.0) и гиперацидофилов (растут при рН < 3.0) (Merino et al., 2019).

Микроорганизмы, обитающие в кислых условиях, поддерживают нейтральный внутриклеточный рН за счет использования водородных помп, откачивающих ионы водорода из цитоплазмы (Coker, 2019). Грибы имеют систему регуляции внутриклеточного рН, включающую АТФазы вакуолярного типа (V-АТФаза) и протонный насос Р-типа Pma1, действующий совместно с большим количеством других транспортеров (Kane, 2016). Археи имеют отличительные структурные и функциональные характеристики, включая обратный мембранный потенциал, высокую непроницаемость клеточных мембран и преобладание вторичных транспортеров. Непроницаемость мембран архей связывают с присутствием специфических тетраэфирных липидов с простыми эфирными связями, в отличие от бактерий и эукариот, для которых характерны сложноэфирные связи, менее устойчивые к кислотному гидролизу (Baker-Austin, Dopson, 2007).

Известно, что психрофилы, галофилы, ксерофилы используют для адаптации к экстремальным условиям осмолиты и изменяют состав мембранных липидов (Inouye, Phadtare, 2014; Nazareth, Gonsalves, 2014; Gunde-Cimerman et al., 2018). Нами впервые было показано ключевое значение осмолита трегалозы и фосфатидных кислот в составе мембранных липидов для термофилии (Yanutsevich et al., 2014; Ianutsevich et al., 2016, 2020) и алкалофилии грибов (Bondarenko et al., 2017; Kozlova et al., 2019). Однако для ацидофилов таких литературных данных не обнаружено. Мы предполагаем, что при адаптации к низким значениям рН защита цитоплазматической мембраны, контактирующей с агрессивной внешней средой, может осуществляться как изменением состава мембранных липидов, так и с помощью протекторных соединений углеводной природы – осмолитов.

Цель настоящего исследования – физиологическая характеристика и изучение состава осмолитов и мембранных липидов у ацидофильного гриба *Sistotrema brinkmannii* в динамике роста в оптимальных условиях и при различных значениях рН.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования – базидиомицетный гриб *Sistotrema brinkmannii* (Bres.) J. Erikss. (*Hydnaceae*, *Cantharellales*, *Incertae sedis*, *Agaricomycetes*, *Agaricomycotina*, *Basidiomycota*, *Fungi*); был выделен с очага сфагнового мха олиготрофного болота аапатипа, идентифицирован по ITS региону рДНК и депонирован в ГенБанк с присвоением номера JQ780614 О.А. Грум-Гржимайло – научным сотрудником Беломорской биологической станции им. Н.А. Перцова биологического факультета МГУ (Grum-Grzhimaylo et al., 2016).

Условия культивирования. Гриб поддерживали на стандартной агаризованной среде на основе солодового экстракта, 17 г/л (“Condalab”), с цитратно-фосфатным буфером (рН 4.0) при оптимальной температуре 24–25°C. Оптимум роста гриба определяли по скорости линейного роста на чашках Петри. Готовили агаризованные среды на основе солодового экстракта, 17 г/л; различные значения рН среды (2.6, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.6) достигали с использованием цитратно-фосфатного буфера (0.1 М). Посевной материал выращивали на агаризованной среде на чашках Петри в течение 4 сут (рН 4.0, 24–25°C). Для посева на чашки использовали фрагменты мицелия 1 × 1 мм, взятые с активно растущего края колонии. Диаметр колоний измеряли в двух перпендикулярных направлениях каждые 3–4 сут до момента, когда в одном из вариантов колония достигала краев чашки. Скорость роста определяли в мм/сут в период линейного роста. Температурный оптимум определяли, измеряя скорость роста гриба при опти-

мальном значении рН 4.0 в диапазоне температур 17, 20, 22, 25, 27, 30°C. Зависимость скорости роста от концентрации NaCl в среде (0, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0 М) определяли аналогично при оптимальном значении рН и температуры (рН 4.0, 24–25°C).

Для биохимических исследований посевной материал выращивали на агаризованной среде на чашках Петри, покрытых целлофаном, в течение 4 сут при оптимальной температуре 24–25°C. Для посева на чашки использовали фрагменты мицелия 1 × 1 мм, взятые с активно растущего края колонии посевной чашки. Гриб выращивали в течение 6, 12 и 18 сут в оптимальных условиях (рН 4.0, 24–25°C). Для исследования воздействия различных значений рН гриб культивировали в течение 18 сут при рН 2.6, 4.0 и 6.0. Выросший мицелий отделяли скальпелем, навески замораживали и хранили при –21°C.

Анализ липидов и жирных кислот. Для анализа липидного состава гриба навеску сырой биомассы гомогенизировали в изопропанол, после чего экстракцию липидов продолжали в течение 30 мин при 70°C и декантировали надосадочную жидкость (Nichols, 1963). Далее остаток двукратно экстрагировали смесью изопропанол–хлороформ (1 : 1) и один раз в соотношении 1 : 2 в тех же условиях. Объединенный экстракт упаривали на роторном испарителе, остаток растворяли в 9 мл смеси хлороформ–метанол (1 : 1), к которой добавляли 12 мл 2.5% раствора хлорида натрия для удаления водорастворимых веществ. После разделения смеси хлороформный слой отбирали и сушили, пропуская через безводный сульфат натрия, упаривали на роторном испарителе и сушили до постоянной массы в вакууме. Полученный остаток растворяли в смеси хлороформ–метанол (2 : 1) и хранили при –21°C.

Разделение полярных липидов проводили с помощью двумерной тонкослойной хроматографии (ТСХ) на стеклянных пластинках с силикагелем 60 (10 × 10 см) (“Merck”, Германия) в системе растворителей хлороформ–метанол–вода (65 : 25 : 4) в первом направлении; хлороформ–уксусная кислота–метанол–вода (40 : 7.5 : 6 : 2) во втором направлении (Minnikin et al., 1984). На пластину наносили 75–100 мкг липидов. Хроматограммы проявляли опрыскиванием 5% серной кислотой в этаноле с последующим нагреванием при 180°C.

Для идентификации липидов использовали реакции с универсальным реагентом Васьковского (Vaskovsky et al., 1975) (на фосфолипиды), нингидрином (на липиды, содержащие аминокетильную группу), α-нафтолом (на гликолипиды) и реактивом Драгендорфа (на холин) (Kates, 1972). Присутствие сфинголипидов подтверждали с помощью щелочного гидролиза глицеролипидов (Kates, 1972).

Состав нейтральных липидов (НЛ) анализировали методом одномерной восходящей ТСХ на стеклянных пластинках с силикагелем 60 (10 × 10 см) (“Merck”, Германия). Для разделения НЛ использовали модифицированную систему растворителей гексан–серный эфир–уксусная кислота (77 : 23 : 1) (Kates, 1972). На пластину наносили 75 мкг липидов.

В качестве количественных стандартов для нейтральных липидов использовали эргостерин и триацилглицерин (“Acros Organics”), для фосфолипидов – фосфатидилхолин (“Sigma-Aldrich”), для сфинголипидов – смесь гликоцерамидов (“Larodan”). Количественный анализ липидов проводили методом денситометрии с использованием компьютерной программы Dens (“Ленхром”, Россия) в режиме линейной аппроксимации по калибровочным кривым на основе стандартных растворов.

Для анализа состава жирных кислот выделяли фракцию полярных липидов, используя ТСХ для нейтральных липидов. Оставшиеся на старте пятна полярных липидов выскребали, элюировали смесью хлороформ–метанол (1 : 1) в течение ночи, раствор декантировали и упаривали на роторном испарителе, добавляли 2 мл толуола и 4 мл 2.5% H₂SO₄ в метаноле, выдерживали при 70°C в течение 2 ч (Agnew et al., 2019). Полученные метиловые эфиры жирных кислот анализировали на газожидкостном хроматографе Кристалл 5000.1 (ЗАО “Хроматэк”, Россия) на капиллярной колонке Optima-240, 60 м × 0.25 мкм × 0.25 мм (“Macherey-Nagel GmbH&Co”, Германия). Для хроматографирования применяли температурную программу от 130 до 240°C. Идентификацию проводили с использованием смеси метчиков индивидуальных метиловых эфиров жирных кислот Supelco 37 Component FAME Mix (“Supelco”, США). Степень ненасыщенности фосфолипидов (СН) определялась по формуле (Weete, 1974):

$$СН = 1.0 \frac{\% \text{ моноеновых ЖК}}{100} + 2.0 \frac{\% \text{ диеновых ЖК}}{100} + 3.0 \frac{\% \text{ триеновых ЖК}}{100}.$$

Анализ углеводов. Экстракцию растворимых углеводов мицелия проводили кипящей водой в течение 20 мин четырехкратно. Из полученного экстракта удаляли белки (Somogyi, 1945). Дальнейшую очистку экстракта от заряженных соеди-

нений проводили, используя комбинированную колонку с ионообменными смолами Dowex-1 (ацетатная форма) и Dowex 50W (H⁺). Состав углеводов и полиолов определяли методом ГЖХ, получая из лиофильно высушенного экстракта триме-

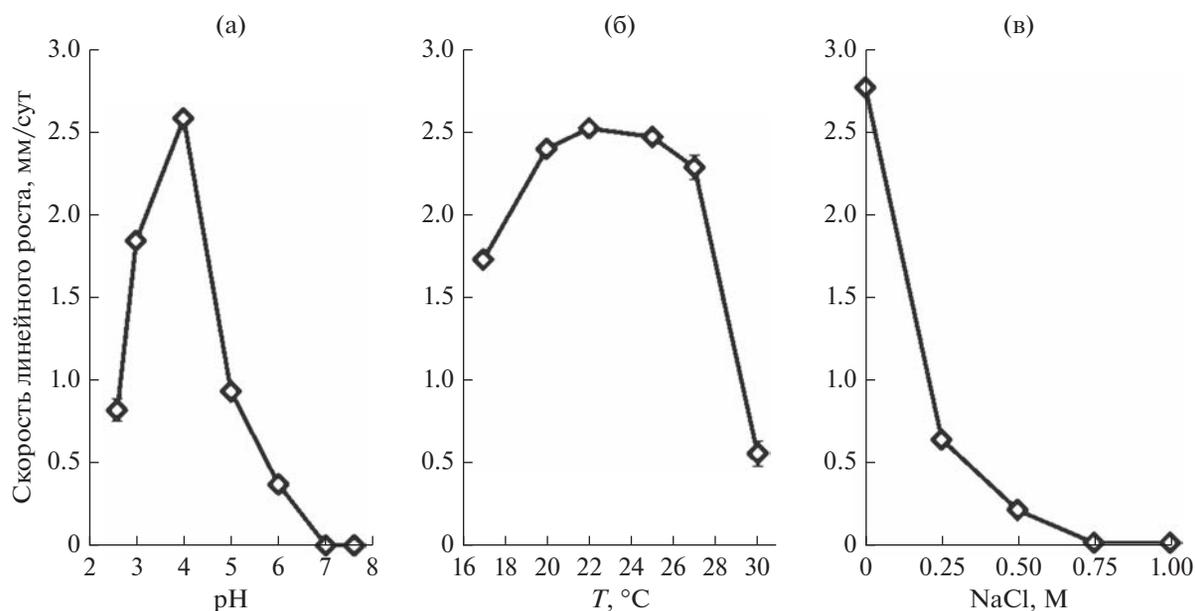


Рис. 1. Влияние pH среды (а), температуры (б), концентрации NaCl (в) на скорость роста *S. brinkmannii*.

тилсилильные производные сахаров (Brobst, 1972). В качестве внутреннего стандарта использовали α -метил-D-маннозид (“Merck”, Германия). Хроматографирование проводили на газожидкостном хроматографе Кристалл 5000.1 (ЗАО “Хроматэк”, Россия) на капиллярной колонке ZB-5 30 м \times 0.32 мм \times 0.25 мкм (“Phenomenex”, США) с применением температурной программы от 130 до 270°C со скоростью 5–6°C/мин. В качестве метчиков использовали глицерин, эритрит, арабит, глюкозу, маннит, инозит, трегалозу (“Sigma”, США).

Статистическая обработка. Опыты проводили в трехкратной повторности, $n = 3$. Post hoc тест Даннета использовали для попарного сравнения между контрольным вариантом (18 сут, pH 4.0) и вариантами 18 сут, pH 2.6 и 18 сут, pH 6.0. На графиках символ (*) обозначает статистически значимое отличие ($P \leq 0.05$); отображены средние значения \pm SEM.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Физиологическая характеристика *S. brinkmannii*.

При поверхностном культивировании на суловом агаре при оптимальном pH 4.0 грибок образует

колонии бежевого цвета, правильной формы, круглые, гладкие, с ровным краем.

Исследование скорости роста гриба при различных значениях pH (рис. 1а) показало, что он относится к облигатным ацидофилам, так как оптимум его роста соответствует pH 3.0–4.0, а при pH 7.0 грибок не растет. По отношению к температуре (рис. 1б) грибок показал широкий оптимум роста при 20–27°C, поэтому его можно отнести к мезофилам. Грибок чувствителен к присутствию NaCl в среде и лучше всего растет на бессолевой среде (рис. 1в).

Состав мембранных и запасных липидов в оптимальных условиях в динамике роста *S. brinkmannii* и при различных значениях pH. Особенностью данного гриба является, во-первых, большое количество мембранных липидов, во-вторых, преобладание содержания мембранных липидов над запасными на всех стадиях роста. В динамике роста гриба при оптимальных условиях количество мембранных и запасных липидов снижается (табл. 1).

Мембранные липиды гриба в стадии начальной трофофазы (6 сут) представлены, в основном, сфинголипидами (СЛ) (60% от суммы), фосфолипидами (32%) и стеринами (8%) (рис. 2). Для ис-

Таблица 1. Количество мембранных и запасных липидов ацидофильного микромицета *S. brinkmannii* в зависимости от различных значений pH среды и в динамике роста при оптимальных условиях

Липиды, % от СБ	6 сут, pH 4.0	12 сут, pH 4.0	18 сут, pH 4.0	18 сут, pH 2.6	18 сут, pH 6.0
Мембранные липиды	9.53 \pm 1.9	7.18 \pm 1.42	5.32 \pm 0.88	5.66 \pm 0.95	11.5 \pm 0.38
Запасные липиды	6.06 \pm 0.42	5.63 \pm 1.03	5.33 \pm 1.34	4.47 \pm 0.13	2.29 \pm 0.24

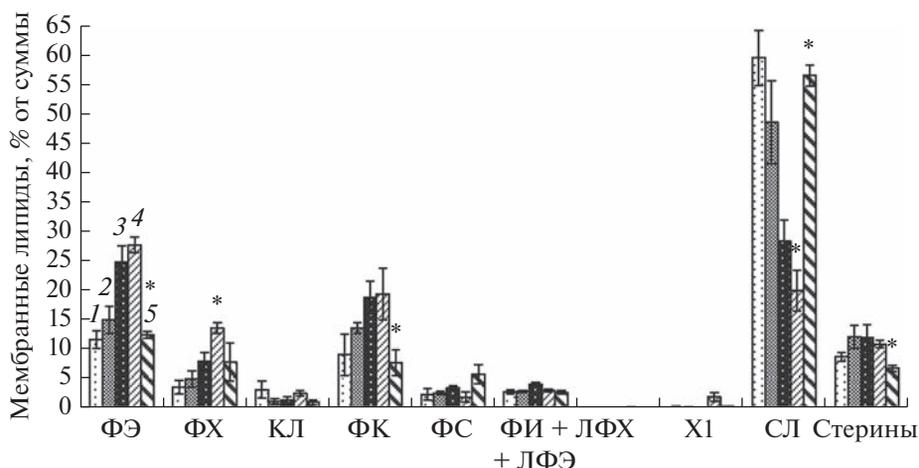


Рис. 2. Профиль мембранных липидов *S. brinkmannii* в динамике роста и при различных значениях pH: ФЭ – фосфатидилэтанолламины, ФХ – фосфатидилхолины, КЛ – кардиолипиды, ФК – фосфатидные кислоты, ФС – фосфатидилсерины, ФИ – фосфатидилинозиты, ЛФЭ – лизофосфатидилэтанолламины, ЛФХ – лизофосфатидилхолины, Х1 – неидентифицированный липид, СЛ – сфинголипиды. 1 – 6 сут, pH 4.0; 2 – 12 сут, pH 4.0; 3 – 18 сут, pH 4.0; 4 – 18 сут, pH 2.6; 5 – 18 сут, pH 6.0.

следуемого гриба характерно доминирование СЛ на всех стадиях роста. Кроме них основными являлись фосфатидилэтанолламины (ФЭ), фосфатидные кислоты (ФК) и стерины. В меньших количествах содержались фосфатидилхолины (ФХ), фосфатидилсерины (ФС), кардиолипиды (КЛ), фосфатидилинозиты (ФИ) и лизофосфатидилэтанолламины (ЛФЭ). В динамике роста гриба наблюдалось увеличение вдвое долей ФЭ, ФК и ФХ на фоне двукратного снижения доли СЛ и при постоянстве относительного содержания стеринов.

При выращивании гриба на средах с различными значениями pH количество и состав мембранных и запасных липидов значительно изменялись. Количество мембранных липидов в околонейтральных условиях (pH 6.0) увеличивалось по сравнению с кислыми (pH 2.6), тогда как коли-

чество запасных липидов снижалось (табл. 1). Увеличение кислотности среды до pH 2.6 приводило к повышению доли ФХ и снижению доли СЛ. Напротив, при pH 6.0 наблюдалось значительное увеличение доли СЛ (до 57%) на фоне снижения ФЭ, ФК и стеринов.

Особенностью жирнокислотного состава фосфолипидов гриба было доминирование линолевой кислоты $C_{18:2n6c}$ (около 75% от суммы кислот) (табл. 2), что приводило к высокой СН (1.4–1.6). Второй по относительному содержанию была пальмитиновая кислота (около 20%), остальные кислоты присутствовали в следовом количестве. При различных значениях pH степень ненасыщенности мембранных липидов оставалась практически постоянной, тогда как в динамике роста наблюдалось ее слабое повышение.

Таблица 2. Состав жирных кислот и степень ненасыщенности (СН) мембранных липидов ацидофильного микровида *S. brinkmannii* в динамике роста при оптимальных условиях, а также при различных значениях pH среды

ЖК	6 сут, pH 4.0	12 сут, pH 4.0	18 сут, pH 4.0	18 сут, pH 2.6	18 сут, pH 6.0
$C_{14:0}$	0.12 ± 0.12	0.07 ± 0.07	0.05 ± 0.05	0.44 ± 0.26	0.22 ± 0.22
$C_{15:0}$	0.41 ± 0.22	0.19 ± 0.11	0.06 ± 0.06	0.97 ± 0.55	0.55 ± 0.34
$C_{16:0}$	22.91 ± 2.05	15.32 ± 2.66	21.41 ± 0.31	18.81 ± 0.51	20.15 ± 0.69
$C_{17:0}$	2.12 ± 0.95	1.30 ± 0.82	0.67 ± 0.34	0.72 ± 0.46	1.20 ± 0.67
$C_{17:1}$	1.05 ± 0.36	0.41 ± 0.27	0.35 ± 0.18	0.19 ± 0.19	0.68 ± 0.34
$C_{18:0}$	2.16 ± 0.16	1.14 ± 0.18	0.47 ± 0.23	1.19 ± 0.16	0.95 ± 0.48
$C_{18:1n9c}$	3.37 ± 0.38	1.79 ± 0.5	2.00 ± 0.2	2.65 ± 0.43	2.75 ± 0.29
$C_{18:2n6c}$	67.87 ± 3.71	79.77 ± 2.44	75.00 ± 0.94	75.03 ± 1.74	73.50 ± 2.77
СН	1.40 ± 0.07	1.62 ± 0.05	1.52 ± 0.02	1.53 ± 0.03	1.50 ± 0.05

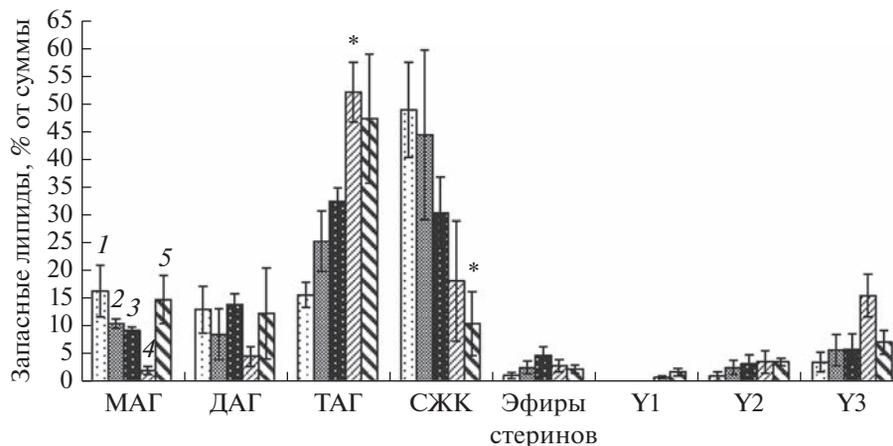


Рис. 3. Профиль запасных липидов *S. brinkmannii* в динамике роста и при различных значениях pH: МАГ – моноацилглицерины, ДАГ – диацилглицерины, ТАГ – триацилглицерины, СЖК – свободные жирные кислоты, Y1, Y2, Y3 – неидентифицированные липиды. 1 – 6 сут, pH 4.0; 2 – 12 сут, pH 4.0; 3 – 18 сут, pH 4.0; 4 – 18 сут, pH 2.6; 5 – 18 сут, pH 6.0.

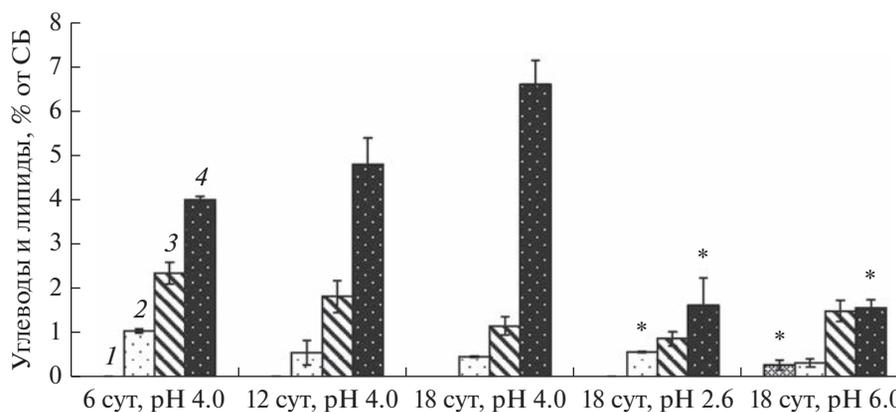


Рис. 4. Углеводы и полиолы *S. brinkmannii* в динамике роста и при различных значениях pH. 1 – арабит; 2 – глюкоза; 3 – маннит; 4 – трегалоза.

Среди запасных липидов доминирующими на стадии начальной трофофазы (6 сут) являлись свободные жирные кислоты (СЖК) (49% от суммы) (рис. 3). В меньших долях присутствовали триацилглицерины (ТАГ), диацилглицерины (ДАГ), моноацилглицерины (МАГ). Эфиры стерина и несколько неидентифицированных липидов (Y1, Y2, Y3) были минорными компонентами. В динамике роста гриба происходило увеличение долей ТАГ, тогда как доли МАГ и СЖК снижались. В стадии идиофазы доминирующими становились ТАГ и СЖК.

Наименьшее количество запасных липидов (2.3% от сухой биомассы) наблюдалось при нейтральном pH (табл. 1), причем при всех значениях pH доминирующими являлись ТАГ (рис. 3). Доля ТАГ повышалась в кислых условиях (52% при pH 2.6) по сравнению с оптимальными (32% при pH 4.0). Относительное содержание СЖК умень-

шалось до 10% в околонеutralных условиях (при pH 6.0) по сравнению с 30% при pH 4.0.

Состав углеводов и полиолов цитозоля в оптимальных условиях в динамике роста гриба и при различных pH. Суммарное количество растворимых углеводов и полиолов цитозоля в динамике роста гриба при оптимальных условиях изменялось незначительно (от 7.5 до 8.2% от сухой массы) (рис. 4). Основными осмолитами в 6-сут культуре гриба являлись трегалоза, маннит и глюкоза. На всех стадиях роста доминировала трегалоза. В динамике роста гриба наблюдалось увеличение количества трегалозы (с 4.0 до 6.6% от сухой массы) на фоне двукратного снижения уровней маннита и глюкозы. В следовом количестве присутствовал арабит, который исчезал на стадии идиофазы.

Количество растворимых углеводов и полиолов цитозоля гриба *S. brinkmannii* достигало 8.2%

от сухой биомассы в оптимальных условиях и уменьшалось в 2.5 раза при pH 2.6 и 6.0 за счет снижения уровня трегалозы (рис. 4). В оптимальных условиях количество трегалозы достигало 6.5% от сухой биомассы, а при pH 2.6 и 6.0 уровень трегалозы снижался до 1.5%. При этом уровень маннита возрастал при pH 6.0, и он становился одним из основных компонентов, наряду с трегалозой. Количество глюкозы с повышением значения pH снижалось в два раза (с 0.6 до 0.3% от сухой массы), что, однако, почти не влияло на общую картину. В околонейтральных условиях появлялось небольшое количество арабита (0.3%), который обычно присутствовал в следовом количестве. Обнаружены также следы инозита и глицерина (на рисунке не показаны).

ОБСУЖДЕНИЕ

По своим физиологическим характеристикам исследуемый гриб относился к облигатным ацидофилам (оптимум pH 3.0–4.0, отсутствие роста при pH 7.0).

Для исследования механизмов адаптации гриба к кислой среде мы изучили состав осмолитов и мембранных липидов во взаимосвязи, т.к. известно, что осмолит трегалоза способен защищать не только макромолекулы клетки, но и ее мембраны (Elbein et al., 2003; Iturriaga et al., 2009; Tapia, Koshland, 2014; Mattoon et al., 2021). Осмолиты — это низкомолекулярные органические соединения, защищающие клетки от воздействия неблагоприятных факторов. Осмолиты представляют собой не только совместимые соединения (compatible solutes) (Brown, Simpson, 1972), но и обладают нейтрализующим и цитотопротекторным действием, защищая как макромолекулы, так и мембраны клетки (Yancey, 2005; Yancey, Siebenaller, 2015). У грибов осмолиты представлены рядом полиолов и трегалозой, иногда также аминокислотой пролином (Jennings, 1985). Все осмолиты являются многофункциональными соединениями. Дисахарид трегалоза выполняет протекторную, резервную, антиоксидантную, регуляторную, шаперонную функции (Elbein et al., 2003; Iturriaga et al., 2009; Tapia, Koshland, 2014; Mattoon et al., 2021). Полиолы обладают осмопротекторными и антиоксидантными свойствами, регулируют редокс-баланс клетки (Jennings, 1985; Koide et al., 2000; Costenoble et al., 2000). Ранее нами было высказано предположение о тесной взаимосвязи осмолитной и мембранной систем клеток грибов, и было показано на примере галоалкалотолерантного гриба *Emericellopsis alkalina*, что ключевую роль в адаптации к фактору pH и высокой концентрации NaCl играет осмолитная система, при этом изменения в составе мембранных липидов незначительны (Danilova et al., 2020). При сравнительном исследовании трегалозодефицитных и

диких штаммов дрожжей *Schizosaccharomyces pombe*, было обнаружено, что при тепловом шоке в отсутствие трегалозы в составе мембранных липидов происходят значительно более масштабные перестройки (Péter et al., 2021), чем у диких штаммов, что также подтверждает наше предположение.

Нами было показано, что в динамике роста ацидофильного базидиомицетного гриба *S. brinkmannii* основными осмолитами являлись трегалоза, маннит и глюкоза, причем общее количество углеводов и полиолов в процессе роста мало изменялось и составляло около 8% от сухой биомассы. При этом уровень трегалозы с возрастом увеличивался с 4.0 до 6.6% от сухой массы, тогда как неэкстремофильные грибы, как правило, содержат следовое количество трегалозы. Эти данные указывают на использование осмолитов для адаптации к кислым условиям среды, что подтверждает наше предположение. Выращивание гриба на границах диапазона роста (pH 2.6 и 6.0), где скорость роста снижается в 3 раза, показало, что количество углеводов и полиолов в этих условиях уменьшается в 2.5 раза по сравнению с оптимальными условиями pH 4.0, хотя трегалоза и маннит остаются основными компонентами. График зависимости скорости роста от pH показывает, что гриб имеет узкий пик оптимального роста при pH 3.0–4.0, что в совокупности с данными о количестве осмолитов показывает низкую способность исследуемого гриба адаптироваться как к нейтральным, так и сильноокислым условиям среды. Участие трегалозы в адаптации ацидофилов было установлено впервые, что расширяет наши знания о функциях этого осмолита. Можно предположить, учитывая нейтральный внутриклеточный pH, что трегалоза требуется для защиты цитоплазматической мембраны, контактирующей с агрессивной кислой средой.

Ранее в наших исследованиях было впервые показано существенное изменение состава мембранных липидов, а именно значительный рост доли небислоиных ФК под действием теплового шока у трех мезофильных грибов (Терёшина и соавт., 2011), а также высокое относительное содержание этих фосфолипидов в составе мембранных липидов у термофильных грибов (Ianutsevich et al., 2016) и у алкалофилов (Bondarenko et al., 2017; Kozlova et al., 2019). Уникальность ФК обусловлена тем, что в зависимости от физиологических условий они могут обладать свойствами как бислоиных, так и небислоиных липидов (McMahon, Gallop, 2005). Так, при нейтральном pH и в отсутствие дивалентных ионов ФК проявляют свойства бислоиных липидов, но в слабнокислых условиях и в присутствии ионов, например, в аппарате Гольджи, они образуют мицеллы II типа. Полагают, что способность фосфатидных кислот к агрегации приводит к образованию микродоменов, участвующих в формировании изгибов мембран,

что является первой стадией образования везикул, которые могут участвовать в транспорте из аппарата Гольджи и ЭПР, эндо- и экзоцитозе.

В настоящей работе показано, что состав мембран ацидофильного гриба отличался от такового у всех изученных нами экстремофилов (термофилов, галофилов, алкалофилов, ксерофилов) тем, что основными компонентами являлись СЛ, ФЭ и ФК, тогда как у других экстремофилов СЛ относились, как правило, к минорным компонентом мембран. Нужно подчеркнуть, что характерные для большинства грибов ФХ у исследуемого гриба являлись минорным компонентом. Присутствие ФК в качестве одного из основных фосфолипидов подтверждает важную роль этого фосфолипида в экстремофилии. В молодой 6-суточной культуре ацидофила доля СЛ в составе мембранных липидов достигала 60% от суммы, а в 18-суточной культуре снижалась вдвое на фоне увеличения долей ФЭ и ФК, которые являются небислойными липидами. Учитывая тот факт, что доля СЛ с возрастом вдвое снижается, а количество трегалозы между этими компонентами в защите мембран. Кроме того, нами установлено значительное повышение доли СЛ при pH 6.0 по сравнению с оптимальным pH 4.0, что указывает на их адаптивное значение и согласуется с литературными данными о том, что гликолипиды, имея в составе гликозильную группу, могут, аналогично трегалозе, стабилизировать мембраны (Yu et al., 1986). Остается неясным, является ли доминирование СЛ характерной чертой мембран ацидофильных грибов, или это связано с систематическим положением конкретного гриба. Для этого потребуются дальнейшие исследования с различными по систематическому положению ацидофилами.

Таким образом, на примере ацидофильного гриба *S. brinkmannii* впервые показано, что ацидофилы используют осмолитную систему, а именно осмолит трегалозу, для адаптации к кислым условиям среды. Кроме того, выявлен особый состав мембранных липидов, обогащенных сфинголипидами, которые по литературным данным обладают способностью стабилизировать мембраны, аналогично трегалозе. С возрастом доля сфинголипидов в мембранах снижается, при этом количество трегалозы возрастает. Такая динамика указывает на взаимосвязь этих соединений в защите мембран.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-74-00040 (<https://rscf.ru/project/22-74-00040/>).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Терёшина В.М., Меморская А.С., Котлова Е.Р.* Влияние различных тепловых воздействий на состав мембранных липидов и углеводов цитозоля у мицелиальных грибов // *Микробиология*. 2011. Т. 80. С. 447–453.
- Tereshina V.M., Memorskaya A.S., Kotlova E.R.* The effect of different heat influences on composition of membrane lipids and cytosol carbohydrates in mycelial fungi // *Microbiology (Moscow)*. 2011. V. 80. P. 455–460. <https://doi.org/10.1134/S0026261711040199>
- Agnew M.P., Craigie C.R., Weralupitiya G., Reis M.M., Johnson P.L., Reis M.G.* Comprehensive evaluation of parameters affecting one-step method for quantitative analysis of fatty acids in meat // *Metabolites*. 2019. V. 9. Art. 189. P. 1–15. <https://doi.org/10.3390/metabo9090189>
- Aguilera A., González-Toril E.* Eukaryotic life in extreme environments: Acidophilic fungi // *Fungi in Extreme Environments: Ecological Role and Biotechnological Significance*. Cham: Springer Int. Publishing, 2019. P. 21–38. https://doi.org/10.1007/978-3-030-19030-9_2
- Amaral-Zettler L.A.* Eukaryotic diversity at pH extremes // *Front. Microbiol.* 2012. V. 3. Art. 00441. P. 1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00441>
- Baker-Austin C., Dopson M.* Life in acid: pH homeostasis in acidophiles // *Trends Microbiol.* 2007. V. 15. P. 165–171. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.02.005>
- Baker B.J., Tyson G.W., Goosherst L., Banfield J.F.* Insights into the diversity of eukaryotes in acid mine drainage biofilm communities // *Appl. Environ. Microbiol.* 2009. V. 75. P. 2192–2199. <https://doi.org/10.1128/AEM.02500-08>
- Bondarenko S.A., Ianutsevich E.A., Danilova O.A., Grum-Grzhimaylo A.A., Kotlova E.R., Kamzolkina O.V., Bilanenko E.N., Tereshina V.M.* Membrane lipids and soluble sugars dynamics of the alkaliphilic fungus *Sodiomyces tronii* in response to ambient pH // *Extremophiles*. 2017. V. 21. P. 743–754. <https://doi.org/10.1007/s00792-017-0940-4>
- Brobst K.M.* Gas-liquid chromatography of trimethylsilyl derivatives: Analysis of corn syrup // *General Carbohydrate Method* / Eds. Whistler R.L., BeMiller J.N. N.Y. and London: Academic Press, 1972. P. 3–8.
- Brown A.D., Simpson J.R.* Water relations of sugar-tolerant yeasts: the role of intracellular polyols // *J. Gen. Microbiol.* 1972. V. 72. P. 589–591. <https://doi.org/10.1099/00221287-72-3-589>
- Coker J.A.* Recent advances in understanding extremophiles // *F1000Research*. 2019. V. 8. P. 1917. <https://doi.org/10.12688/f1000research.20765.1>

- Coleine C., Stajich J.E., Selbmann L.* Fungi are key players in extreme ecosystems // *Trends Ecol. Evol.* 2022. V. 37. P. 517–528.
<https://doi.org/10.1016/j.tree.2022.02.002>
- Costenoble R., Valadi H., Gustafsson L., Niklasson C., Johan Franzen C.* Microaerobic glycerol formation in *Saccharomyces cerevisiae* // *Yeast*. 2000. V. 16. P. 1483–1495.
[https://doi.org/10.1002/1097-0061\(200012\)16:16<1483::AID-YEA642>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/1097-0061(200012)16:16<1483::AID-YEA642>3.0.CO;2-K)
- Danilova O.A., Ianutsevich E.A., Bondarenko S.A., Georgieva M.L., Vikhizhanina D.A., Groza N.V., Bilanenko E.N., Tereshina V.M.* Osmolytes and membrane lipids in the adaptation of micromycete *Emericellopsis alkalina* to ambient pH and sodium chloride // *Fungal Biol.* 2020. V. 124. P. 884–891.
<https://doi.org/10.1016/j.funbio.2020.07.004>
- Elbein A.D., Pan Y.T., Pastuszak I., Carroll D.* New insights on trehalose: a multifunctional molecule // *Glycobiology*. 2003. V. 13. № 4. P. 17R–27R.
<https://doi.org/10.1093/glycob/cwg047>
- Gonçalves V.N., Vaz A.B.M., Rosa C.A., Rosa L.H.* Diversity and distribution of fungal communities in lakes of Antarctica // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2012. V. 82. P. 459–471.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01424.x>
- Gross S., Robbins E.I.* Acidophilic and acid-tolerant fungi and yeasts // *Hydrobiologia*. 2000. V. 433. P. 91–109.
<https://doi.org/10.1023/A:1004014603333>
- Grum-Grzhimaylo O.A., Debets A.J.M., Bilanenko E.N.* The diversity of microfungi in peatlands originated from the White Sea // *Mycologia*. 2016. V. 108. P. 233–254.
<https://doi.org/10.3852/14-346>
- Gunde-Cimerman N., Plemenitaš A., Oren A.* Strategies of adaptation of microorganisms of the three domains of life to high salt concentrations // *FEMS Microbiol. Rev.* 2018. V. 42. P. 353–375.
<https://doi.org/10.1093/femsre/fuy009>
- Hallsworth J.E., Mancinelli R.L., Conley C.A., Dallas T.D., Rinaldi T., Davila A.F., Benison K.C., Rapoport A., Cavalazzi B., Selbmann L., Changela H., Westall F., Yakimov M.M., Amils R., Madigan M.T.* Astrobiology of life on Earth // *Environ. Microbiol.* 2021. V. 23. P. 3335–3344.
<https://doi.org/10.1111/1462-2920.15499>
- Ianutsevich E.A., Danilova O.A., Groza N.V., Kotlova E.R., Tereshina V.M.* Heat shock response of thermophilic fungi: membrane lipids and soluble carbohydrates under elevated temperatures // *Microbiology (SGM)*. 2016. V. 162. P. 989–999.
<https://doi.org/10.1099/mic.0.000279>
- Ianutsevich E.A., Danilova O.A., Kurilov D.V., Zavarzin I.V., Tereshina V.M.* Osmolytes and membrane lipids in adaptive response of thermophilic fungus *Rhizomucor miehei* to cold, osmotic and oxidative shocks // *Extremophiles*. 2020. V. 24. P. 391–401.
<https://doi.org/10.1007/s00792-020-01163-3>
- Inouye M., Phadtare S.* Cold-shock response and adaptation to near-freezing temperature in cold-adapted yeasts // *Cold-Adapted Yeasts: Biodiversity, Adaptation Strategies and Biotechnological Significance* / Eds. Buzzini P., Margesin R. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2014. P. 243–257.
<https://doi.org/10.1007/978-3-642-39681-6>
- Iturriaga G., Suárez R., Nova-Franco B.* Trehalose metabolism: From osmoprotection to signaling // *Int. J. Mol. Sci.* 2009. V. 10. P. 3793–3810.
<https://doi.org/10.3390/ijms10093793>
- Jennings D.H.* Polyol metabolism in fungi // *Advances in Microbial Physiology* / Eds. Rose A.H., Tempest D.W. London: Academic Press, 1985. P. 149–193.
[https://doi.org/10.1016/S0065-2911\(08\)60292-1](https://doi.org/10.1016/S0065-2911(08)60292-1)
- Kane P.M.* Proton transport and pH control in fungi // *Yeast Membrane Transport Advances in Experimental Medicine and Biology* / Eds. Ramos J., Sychrová H., Kschischo M. Cham: Springer, 2016. P. 33–68.
[https://doi.org/10.1016/S0065-2911\(08\)60292-1](https://doi.org/10.1016/S0065-2911(08)60292-1)
- Kates M.* Techniques of lipidology: isolation, analysis and identification of lipids // *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology* / Eds. Work T.S., Work E. Amsterdam: North-Holland Publishing Company, 1972. P. 267–610.
[https://doi.org/10.1016/S0075-7535\(08\)70544-8](https://doi.org/10.1016/S0075-7535(08)70544-8)
- Koide R.T., Shumway D.L., Stevens C.M.* Soluble carbohydrates of red pine (*Pinus resinosa*) mycorrhizas and mycorrhizal fungi // *Mycol. Res.* 2000. V. 104. P. 834–840.
<https://doi.org/10.1017/S0953756299002166>
- Kozlova M.V., Ianutsevich E.A., Danilova O.A., Kamzolkina O.V., Tereshina V.M.* Lipids and soluble carbohydrates in the mycelium and ascomata of alkaliphilic fungus *Sodiomyces alkalinus* // *Extremophiles*. 2019. V. 23. P. 487–494.
<https://doi.org/10.1007/s00792-019-01100-z>
- Mattoon E.R., Casadevall A., Cordero R.J.* Beat the heat: correlates, compounds, and mechanisms involved in fungal thermotolerance // *Fungal Biol. Rev.* 2021. V. 36. P. 60–75.
<https://doi.org/10.1016/j.fbr.2021.03.002>
- McMahon H.T., Gallop J.L.* Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodelling // *Nature*. 2005. V. 438. P. 590–596.
<https://doi.org/10.1038/nature04396>
- Merino N., Aronson H.S., Bojanova D.P., Feyhl-Buska J., Wong M.L., Zhang S., Giovannelli D.* Living at the extremes: extremophiles and the limits of life in a planetary context // *Front. Microbiol.* 2019. V. 10. Art. 780.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00780>
- Minnikin D.E., O'Donnell A.G., Goodfellow M., Alderson G., Athalye M., Schaal A., Parlett J.H.* An integrated procedure for the extraction of bacterial isoprenoid quinones and polar lipids // *J. Microbiol. Methods*. 1984. V. 2. P. 233–241.
[https://doi.org/10.1016/0167-7012\(84\)90018-6](https://doi.org/10.1016/0167-7012(84)90018-6)
- Nazareth S., Gonsalves V.* *Aspergillus penicillioides* – a true halophile existing in hypersaline and polyhaline eoniches // *Ann. Microbiol.* 2014. V. 64. P. 397–402.
<https://doi.org/10.1007/s13213-013-0646-5>
- Nichols B.W.* Separation of the lipids of photosynthetic tissues: improvements in analysis by thin-layer chromatography // *Biochim. Biophys. Acta – Spec. Sect. Lipids Relat. Subj.* 1963. V. 70. P. 417–422.
[https://doi.org/10.1016/0926-6542\(63\)90060-X](https://doi.org/10.1016/0926-6542(63)90060-X)
- Péter M., Gudmann P., Kóta Z., Török Z., Vigh L., Glatz A., Balogh G.* Lipids and trehalose actively cooperate in heat stress management of *Schizosaccharomyces pombe* // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. Art. 13272.
<https://doi.org/10.3390/ijms222413272>

- Rothschild L.J., Mancinelli R.L. Life in extreme environments // *Nature*. 2001. V. 409. P. 1092–1101. <https://doi.org/10.1038/35059215>
- Rousk J., Brookes P.C., Bååth E. Contrasting soil pH effects on fungal and bacterial growth suggest functional redundancy in carbon mineralization // *Appl. Environ. Microbiol.* 2009. V. 75. P. 1589–1596. <https://doi.org/10.1128/AEM.02775-08>
- Somogyi M. Determination of blood sugar // *J. Biol. Chem.* 1945. V. 160. P. 69–73. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)43098-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)43098-0)
- Tapia H., Koshland D.E. Trehalose is a versatile and long-lived chaperone for desiccation tolerance // *Curr. Biol.* 2014. V. 24. P. 2758–2766. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.10.005>
- Vaskovsky V.E., Kostetsky E.Y., Vasendin I.M. A universal reagent for phospholipid analysis // *J. Chromatogr. A.* 1975. V. 114. P. 129–141. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)85249-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)85249-8)
- Weete J.D. Introduction to fungal lipids // *Fungal Lipid Biochemistry* / Ed. Kritchevsky D. Boston, MA: Springer US, 1974. V. 1. P. 3–36. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-2829-2_1
- Yancey P.H. Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses // *J. Exp. Biol.* 2005. V. 208. P. 2819–2830. <https://doi.org/10.1242/jeb.01730>
- Yancey P.H., Siebenaller J.F. Co-evolution of proteins and solutions: protein adaptation versus cytoprotective molecules and their roles in marine organisms // *J. Exp. Biol.* 2015. V. 218. P. 1880–1896. <https://doi.org/10.1242/jeb.114355>
- Yanutsevich E.A., Memorskaya A.S., Groza N.V., Kochkina G.A., Tereshina V.M. Heat shock response in the thermophilic fungus *Rhizomucor miehei* // *Microbiology (Moscow)*. 2014. V. 83. P. 498–504. <https://doi.org/10.1134/S0026261714050282>
- Yu R.K., Koerner T.A.W., Neel Scarsdale J., Prestegard J.H., Scarsdale J.N., Prestegard J.H. Elucidation of glycolipid structure by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy // *Chem. Phys. Lipids*. 1986. V. 42. P. 27–48. [https://doi.org/10.1016/0009-3084\(86\)90041-1](https://doi.org/10.1016/0009-3084(86)90041-1)

Adaptation of the Acidophilic Fungus *Sistotrema brinkmannii* to the pH Factor

E. A. Ianutsevich^{1, *}, O. A. Danilova¹, O. A. Grum-Grzhimailo^{2, 3}, N. V. Groza⁴, and V. M. Tereshina¹

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

²Pertsov White Sea Biological Station, Faculty of Biology, Moscow State University, Moscow, 119234 Russia

³Laboratory of Genetics, Plant Sciences Group, Wageningen University, Droevendaalsesteeg 1, Wageningen, 6708PB The Netherlands

⁴Preobrazhensky Department of Chemistry and Technology of Biologically Active Compounds, Medical and Organic Chemistry, MIREA – Russian Technological University, Moscow, 119571 Russia

*e-mail: e.a.ianutsevich@gmail.com

Received December 26, 2022; revised January 17, 2023; accepted January 17, 2023

Abstract—Investigation of the growth rate of *Sistotrema brinkmannii* at different values of pH values, temperature, and NaCl concentration showed that this fungus was a mesophile, preferred a salt-free medium, and was an obligate acidophile, since it had a pronounced growth optimum at pH 3.0–4.0 and did not grow at pH 7.0. To reveal the protective mechanisms allowing this fungus to develop under acidic conditions, the composition of its osmolytes and lipids was studied. This is the first report on occurrence of a large amount of trehalose (4.0–6.6% of dry weight) in the mycelium of the fungus during its growth under optimal conditions, confirming the use of osmolytes by acidophiles for adaptation. At the same time, at the borders of the growth range (pH 2.6 and 6.0), the amount of trehalose in the mycelium of the fungus decreased by 2.5 times, which was in agreement with a narrow growth optimum of the fungus in its natural environments (pH 3.0–4.0). The composition of membrane lipids of the fungus was characterized by a high proportion of sphingolipids (up to 60% of the total), which decreased twofold in the course of growth under optimal conditions. The main membrane lipids, apart from sphingolipids, were phosphatidic acids, phosphatidylethanolamines, and sterols; the proportion of these lipids increased with time. The composition of membrane lipids of the fungus at pH 2.6 did not differ much from the optimal conditions, while in the near-neutral region there was a twofold increase in the proportion of sphingolipids, indicating their adaptive value. The simultaneous decrease in the proportion of sphingolipids and the increase in the level of trehalose in the growth dynamics suggest association of these compounds in the protection of cell membranes.

Keywords: filamentous fungi, acidophilia, osmolytes, trehalose, membrane lipids, phosphatidic acids

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИ

**ВЛИЯНИЕ ГЕНА AZOBR_p60123, КОДИРУЮЩЕГО БЕЛОК Wzt,
НА СИНТЕЗ ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ И ФОРМИРОВАНИЕ
БИОПЛЕНОК У БАКТЕРИЙ *AZOSPIRILLUM BALDANIORUM* Sp245**

© 2023 г. Л. П. Петрова^а, *, С. С. Евстигнеева^а, Ю. А. Филипьева^а, И. В. Волохина^а,
Г. Л. Бурыгин^а, Л. Ю. Матора^а, А. В. Шелудько^а, **

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

*e-mail: petrova_lp@mail.ru

**e-mail: shel71@yandex.ru

Поступила в редакцию 06.12.2022 г.

После доработки 27.01.2023 г.

Принята к публикации 30.01.2023 г.

Инактивация одного из генов (CDS AZOBR_p60123) АТФ-связывающего белка Wzt ABC-транспортера у r60123::aphAI мутанта *Azospirillum baldaniorum* Sp245, введение в родительский или мутантный штаммы дополнительной копии этого гена оказывали влияние на гетерогенность длин цепей О-специфических полисахаридов (ОПС) липополисахаридов (ЛПС), их иммунохимические характеристики, свойства штаммов, связанные с продукцией полисахаридов (строительство биопленок). Биопленки r60123::aphAI мутанта Sp245.4-1-1 накапливали в два раза меньше биомассы, чем Sp245. Введение rRK415-r60123 в клетки Sp245.4-1-1 или Sp245 приводило у полученных производных, соответственно, к повышению или снижению способности накапливать биомассу в биопленках, по сравнению с исходными штаммами.

Ключевые слова: *Azospirillum baldaniorum*, липополисахариды, ген *wzt*, ABC-транспортеры, биопленки

DOI: 10.31857/S002636562260081X, **EDN:** FWBWKР

Бактерии, принадлежащие к роду *Azospirillum*, являются свободноживущими микробами, способствующими росту растений (РГРВ). Сообщалось о 29 видах *Azospirillum*, выделенных из разных ниш в разнообразных климатических поясах. Большинство этих видов было выделено из корневой дикорастущих растений, из водной среды и загрязненных территорий. Они влияют на рост и урожайность многочисленных видов растений, многие из которых имеют агрономическое и экологическое значение, широко используются в качестве биоудобрений (Hendriksen, 2022). Основные поверхностные гликополимеры – липополисахариды (ЛПС), капсульные полисахариды (КПС) и экзополисахариды (ЭПС) – поддерживают структурную и функциональную целостность клеток азоспирилл, необходимы для формирования биопленок и роения, обеспечивают взаимодействие бактерий с другими организмами (Шелудько и соавт., 2008, 2018; Zdrovenko et al., 2015; Petrova et al., 2020). У ряда штаммов *Azospirillum baldaniorum* и *Azospirillum brasilense* ЭПС и КПС могут содержать О-полисахариды ЛПС (Матора, Щеголев, 2002; Евстигнеева и соавт., 2016).

Факультативный эндофит пшеницы *A. baldaniorum* Sp245 (ранее *A. brasilense*) (Dos Santos Ferreira et al., 2020) – один из наиболее активно исследуемых штаммов азоспирилл. Его ЛПС состоит из LpsI и LpsII с тонкими различиями в структуре и заряде ОПС и/или кора, детектируемыми посредством иммунохимических реакций и ионообменной хроматографии (Katzy et al., 1998; Fedonenko et al., 2002; Федоненко и соавт., 2004; Petrova et al., 2020). Повторяющимся звеном ОПС, входящим в состав LpsI (отрицательно заряжен) и LpsII (не заряжен), является пентасахарид, состоящий из остатков D-рамнозы (Fedonenko et al., 2002; Федоненко и соавт., 2004). Синтез гомополимерного ОПС, характерного для ЛПС *A. baldaniorum* Sp245, предполагает: сборку ОПС на липидном носителе из активированных предшественников, осуществляемую гликозилтрансферазами на цитоплазматической стороне внутренней мембраны; перенос ОПС в периплазму с помощью ABC-транспортера (от англ. АТФ-binding cassette (ABC) transporter); лигирование липида А–корового олигосахарид с ОПС и перенос ЛПС на внешнюю мембрану клетки (Valvano et al., 2011). Известно, что ABC-транс-

портеры, участвующие в экспорте ЛПС, а также КПС и ЭПС, состоят из трансмембранной пермеазы Wzm и АТФ-связывающего белка Wzt (Valvano et al., 2011; Liston et al., 2017). В геноме штамма Sp245 предсказанные CDS (кодирующая последовательность ДНК – от англ. coding DNA sequence; CDS) для ферментов углеводного обмена разбросаны по хромосоме и несколькими крупным плазмидам. Только несколько плазмидных генов *A. baldaniorum* Sp245 и *A. brasilense* Sp7, участвующих в продукции полисахаридов клеточной поверхности, были проанализированы экспериментально (Lerner et al., 2009; Petrova et al., 2020). Плазмида AZOBR_p6 Sp245 насыщена генами, предположительно кодирующими белки биосинтеза полисахаридов, многие из которых, возможно, были получены путем горизонтального переноса от других бактерий (Wisniewski-Dyé et al., 2011). Она содержит не менее двух предполагаемых генов *wzm* (AZOBR_p60016 и AZOBR_p60122) и *wzt* (AZOBR_p60017 и AZOBR_p60123). Ранее показано, что в геномах штаммов *A. brasilense* SR15 и SR75, имеющих гомополимерный ОПС, также присутствуют по два предполагаемых гена *wzm* и *wzt*, обладающих очень высоким сходством с генами AZOBR_p60016/AZOBR_p60017 и AZOBR_p60122/AZOBR_p60123 (Петрова и соавт., 2017). В геноме *A. brasilense* Sp7, в ОПС которого выявлены не менее пяти видов повторяющихся звеньев (для бактерий с гетерополимерными ОПС Wzm/Wzt-зависимый путь биосинтеза ЛПС не характерен), обнаружены только по одному из каждой пары предполагаемых генов ABC-транспортера, идентичные AZOBR_p60017 и AZOBR_p60122 (Петрова и соавт., 2017).

Для подтверждения участия в биосинтезе липополисахаридов одного из предполагаемых генов *wzt* *A. baldaniorum* Sp245 мы инактивировали CDS AZOBR_p60123 и охарактеризовали фенотип полученного мутанта.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использованы: выделенный в Бразилии из корней пшеницы штамм *A. baldaniorum*: Sp245 (IBPPM 219) (Dos Santos Ferreira et al., 2020), полученные в данной работе его производные Sp245(pRK415) и Sp245(pRK415–p60123), мутант Sp245.4-1-1 (содержит вставку *aphAI* (Km^R кассеты) из pUC4K в CDS AZOBR_p60123), Sp245.4-1-1(pRK415) и Sp245.4-1-1(pRK415–p60123). Использованные в работе плазмиды и праймеры представлены в табл. 1. Для поддержания созданных плазмид использован штамм *Escherichia coli* DH5 α (*supE44* Δ *lacU169* (ϕ 80 *lacZ* Δ M15) *hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1* (Sambrook et al., 1989)). Плазмиду pRK2013 поддерживали в *E. coli* K802 (*supE hsdR gal metB* (Sambrook et al., 1989)).

Азоспириллы выращивали на малатно-солевой среде (Döbereiner, Day, 1976) с NH₄Cl (МСС) при 28°C, кишечную палочку – на среде Luria-Bertani (LB) при 37°C (Sambrook et al., 1989). Концентрация Бакто агара в плотных средах составляла 20 г/л; pH питательных сред доводили до 6.8–7.0. Жидкие бактериальные культуры инкубировали на платформе шейкера-инкубатора Excella E24 (“New Brunswick Scientific”, США) при 140 об./мин. При необходимости в среды вносили канамицин (Km) (30 мкг/мл), тетрациклин (Tc) (25 мкг/мл), прижизненный флуоресцентный краситель калькофлуор (Fluorescent Brightener 28; “Sigma-Aldrich”, США) (1 мг/мл).

Для постановки ПЦР использовали геномную ДНК, выделенную из жидких бактериальных культур с использованием набора GeneJET Genomic DNA Purification Kit (“ThermoScientific”, США). Праймеры (табл. 1) и бактериальную ДНК, растворенные в стерильной воде Milli-Q, добавляли в ПЦР-смеси до концентрации 0.5 мкМ и 0.5–1 мкг/50 мкл соответственно. Для амплификации ДНК использовали готовую для употребления смесь экстра-микс для ПЦР HS-Taq PCR (“Диа-эм”) или высокоточную ДНК полимеразу iProof High-Fidelity DNA Polymerase (“Bio-Rad”).

ПЦР ставили в термоциклере T100 (“BioRad Laboratories”, США) не менее чем в трех независимых повторностях. Продукты ПЦР визуализировали с помощью электрофореза в гелях, содержащих 1.2–2% агарозы в стандартных условиях (Sambrook et al., 1989). Ампликоны и плазмиды очищали с использованием наборов GeneJet PCR Purification и GeneJet Plasmid Miniprep Kits (“ThermoScientific”, США) соответственно.

Гидролиз ДНК эндонуклеазами рестрикции, разделение фрагментов ДНК в агарозном геле, лигирование ДНК, клонирование рекомбинантных ДНК в клетках *E. coli* осуществляли общепринятыми методами (Sambrook et al., 1989). Для анализа нуклеотидных последовательностей использовали базы данных и программы, представленные на серверах Национального центра биотехнологической информации США (NCBI).

Для выделения РНК бактериальные клетки из жидкой культуры собирали, отмывали 50 мМ фосфатным буфером (ФБ, pH 7) и суспендировали в нем до ОП₅₉₀ = 1. РНК выделяли из клеток с использованием NucleoZOL (“Macherey-Nagel”, Германия), обрабатывали ДНКазой I (NEB) 30 мин при 37°C, инактивировали 10 мин при 65°C. Концентрацию РНК определяли с помощью набора Qubit RNA BR Assay Kits на флуориметре Qubit 4 (“ThermoFS”, США). кДНК синтезировали из 1 мкг РНК с использованием набора MMLV RT kit (“Евроген”, Россия) с добавлением ингибитора рибонуклеаз Ribolock (“Thermo FS”, США). Чистоту РНК проверяли постановкой ПЦР на об-

разцах РНК и полученной кДНК с использованием специфических праймеров (праймеры *groD-118-rt-F* и *groD-118-rt-R* (табл. 1) для амплификации гена домашнего хозяйства (ген *rpoD*, кодирующий фактор σ^{70} ; Kumar et al., 2012). Наличие *RPOD*-специфического ампликона в случае образцов кДНК и отсутствие какого-либо ампликона в образцах РНК свидетельствовало, что экстрагированная РНК не содержала примесей ДНК (данные не показаны). ПЦР в реальном времени (РВ-ПЦР) проводили в 25 мкл смеси с использованием набора для ПЦР qPCRmix-HS SYBR + HighROX (“Евроген”, Россия) на приборе Applied Biosystems 7300 (“Applied Biosystems”, США). В смесь для ПЦР в реальном времени добавляли 4 мкл кДНК, по 0.5 мкл праймеров (финальная концентрация 50 нМ). Условия включали начальную стадию инкубации 5 мин при 95°C, затем 40 циклов амплификации по 15 с при 95°C, 30 с при 60°C и 30 с при 72°C. Для амплификации генов *wzt* использовали специфические праймеры (табл. 1) (AZOBR_p60123 (праймеры *r60123-rt-F* и *r60123-rt-R*) и AZOBR_p60017 (праймеры *r60017-rt-F* и *r60017-rt-R*)). Ген домашнего хозяйства *rpoD* (праймеры *groD-118-rt-F* и *groD-118-rt-R*; табл. 1) использовали в качестве эндогенного контроля (Kumar et al., 2012). Профили экспрессии генов-мишеней определяли относительно уровня экспрессии гена домашнего хозяйства *rpoD* с использованием метода 2^{- $\Delta\Delta$ CT} (Livak, Schmittgen, 2001).

Процедура получения мутанта состояла из следующих этапов: наработка в ПЦР центрального 556-п.н. сегмента CDS AZOBR_p60123 (использовали праймеры *r6_160686F* и *r6_161241R* (табл. 1); клонирование этого ампликона в векторе pJET1.2/blunt (получение pJET1.2-p60123); клонирование по имеющемуся в ампликоне BamHI сайту рестрикции гена устойчивости к канамицину из pUC4K (*aphAI*) (получение pJET1.2-p60123::*aphAI*); переклонирование полученной конструкции из pJET1.2-p60123::*aphAI* в pEX18Tc (получение pEX18Tc-p60123::*aphAI* и трансформация этой плазмидой *E. coli* DH5a); использование pEX18Tc-p60123::*aphAI* для инактивации и маркирования CDS AZOBR_p60123 штамма Sp245 с отбором предполагаемых двойных рекомбинантов и их проверкой. Для этого скрещивали штаммы *E. coli* DH5a(pEX18Tc-p60123::*aphAI*), *E. coli* K802(pRK2013) и *A. baldaniorum* Sp245. Отбирали устойчивые к канамицину, но чувствительные к тетрациклину клоны азоспирилл (клоны, в которых прошла двойная рекомбинация между плазмидой pEX18Tc-p60123::*aphAI* и целевой ДНК азоспирилл). Для подтверждения вставки гена устойчивости к канамицину в CDS AZOBR_p60123 штамма Sp245, использовали праймеры к Km-кассете pUC4K (Km-F и Km-R) в парах с праймерами к гену AZOBR_p60123 Sp245 (табл. 1), гибридизацию колоний и плазмид азоспирилл с ме-

ченным биотином (Biotin DecaLabel DNA Labeling Kit, “ThermoFS”, США) геном устойчивости к канамицину, а также секвенирование фрагментов ДНК, прилегающих к гену устойчивости к Km.

Для комплементации *wzt::aphAI* мутации в ПЦР был наработан ампликон, содержащий 1224-п.н. CDS AZOBR_p60123 штамма Sp245 (плюс 66 п.н. до и 81 п.н. после этой CDS). Для его получения разработали прямой (p160123-PF) и обратный (p160123-ER) праймеры (табл. 1), содержащие сайты рестрикции *Pst*I (P) или *Eco*RI (E), подходящие для клонирования ампликона в экспрессионном векторе pRK415 под контролем его *lac* промотора (этот промотор является конститутивным у неиспользующих лактозу *A. brasilense* и *A. baldaniorum*; Holguin, Glick, 2001). После клонирования была получена плазида pRK415-p60123, которую трансформировали в *E. coli* DH5a. Корректность всех полученных конструкций проверяли с помощью секвенирования ДНК в компании “Евроген” (г. Москва, Россия). Для мобилизации плазмид pRK415 или pRK415-p60123 из клеток *E. coli* DH5a в клетки азоспирилл использовали трехродительские скрещивания и плазмиду-помощник pRK2013. Трансформантов, приобретших плазмиду pRK415 или pRK415-p60123, отбирали и расщипали на плотной среде LB способом, описанным ранее (Petrova et al., 2020).

Для выделения ЛПС бактерии культивировали 18 ч в жидкой МСС. Затем клетки осаждали и отмывали в фосфатно-солевом буфере (ФСБ; рН 6.8) от капсулы, осаждали центрифугированием и экстрагировали ЛПС в течение 30 мин при комнатной температуре в буфере с рН 8.5, содержащем 0.1 М Трис-НСl, 10 мМ ЭДТА, 0.1 мМ фенолметилсульфонилфторида (ФМСФ) и 1% тритона X-100 (концентрация ЭДТА составляла 0.05 мМ на 1 г влажных клеток). Экстракт освобождали от клеток центрифугированием. Электрофорез ЭДТА-экстрактов клеток, обработанных протеиназой К, проводили в 15% полиакриламидном геле в присутствии SDS (SDS-PAGE), визуализацию углеводов компонентов выполняли окрашиванием гелей серебром (Hitchcock, Brown, 1983). Линейный иммуноэлектрофорез проводили по Оухтерлони и Нильсон (Ouchterlony, Nilsson, 1979) с помощью прибора Multiphor II (“LKB”, Швеция) в 1% агарозных гелях. Окрашивали гели Кумасси бриллиантовым синим R250. Поликлональные кроличьи антитела на ЛПС получали как описано ранее (Матора и соавт., 1998).

Образование биопленок штаммами *A. baldaniorum* исследовали в плоскостных 96-луночных полистироловых планшетах и в стеклянных пробирках. 18-часовые жидкие культуры разводили до ОП₅₉₀ = 0.05–0.10 в LB или МСС. Суспензии вносили по 2 мл в пробирку или по 200 мкл в лунку планшета и инкубировали 6 сут в статических

Таблица 1. Плазмиды и олигонуклеотидные праймеры

Плаزمида или праймер	Характеристика	Источник
Плазмиды: pRK415	Производный от RK2 низкокопийный экспрессионный вектор широкого круга хозяев, 10.7 т.п.н., Mob ⁺ , Tc ^R	(Keen et al., 1980)
pRK2013	Плазмида-помощник узкого круга хозяев, <i>repColE1</i> , Tra ⁺ , 48 т.п.н., Km ^R	(Figurski, Helinski, 1979)
pJET1.2/blunt	Линеаризованный вектор для клонирования 6-п.н.–10-т.п.н. продуктов ПЦР; <i>rep(pMB1)</i> , Ap ^R , 2974 п.н.	CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Scientific, США)
pUC4K	Ap ^R Km ^R , источник гена <i>aphAI</i> (Km ^R кассеты), Km ^R	(Vieira, Messing, 1982)
pEX18Tc	Tc ^R ; <i>oriT⁺ sacB⁺</i> , плазмида для направленного мутагенеза	(Hoang et al., 1998)
pEX18 Tc(p60123:: <i>aphAI</i>)	pEX18Tc, содержащая вставку 556-п.н. ампликона центральной части CDS AZOBR_p60123 Sp245 со вставкой гена <i>aphAI</i> , в ампликон по BamHI-сайту	Данная работа
pRK415-p60123	pRK415, содержащая 1371-п.н. <i>PstI</i> – <i>EcoRI</i> фрагмент ДНК с 1224-п.н. CDS AZOBR_p60123 из Sp245 плюс 66 п.н. до и 81 п.н. после этой CDS; Tc ^R	
Праймеры для амплификации сегментов генов Sp245: p6_160686F p6_161241R p60123-rt-F p60123-rt-R p60017-rt-F p60017-rt-R p60D-118-rt-F p60D-118-rt-R	5'-GCTCTGCGCGGGCGTGTCCSTTTTC-3' 5'-GCAGCAGCCGGCCCTTCTCCA-3' 5'-CTGTGACCCGGGCTATCCTTC-3' 5'-GGTTCGGACATCCACGAGTT-3' 5'-GAGATCGAGCGCAAGATGGA-3' 5'-CATGGTCGAGCCACAGGATT-3' 5'-CGTCACCTATGACGAGCTGA-3' 5'-CTCTTCCGATTCGACGATGT-3'	Данная работа (Kumar et al., 2012)
Праймеры* для амплификации CDS AZOBR_p60123 Sp245: p160123-PF p160123-ER	5'-CGTGCTGCAGCTGTTTTTG-3' 5'-CGCACCGAATTCGATGTAGAA-3'	Данная работа
Праймеры к Km-кассете: Km-F Km-R	5'-CATCGGGCTTCCCATAACA-3' 5'-TGCCATTCTCACCGGATT-3'	Данная работа

* В прямой (F) и обратный (R) праймеры были включены сайты рестрикции *PstI* (P) или *EcoRI* (E) (выделены курсивом), подходящие для клонирования ампликона в векторе pRK415. Праймеры синтезировали в компаниях “Синтол” и “Евроген” (г. Москва, Россия).

условиях. Для оценки относительных количеств биомассы в биопленках их окрашивали 1% водным раствором кристаллического фиолетового и

обрабатывали, как описано в работе (Петрова и соавт., 2017). Оценку биомассы биопленок каждого штамма выполняли не менее шести раз.

Каждый раз окрашивали биопленки, сформированные в пяти стеклянных пробирках или восьми лунках планшетов. Результаты обрабатывали с использованием пакета Microsoft Office Excel 2010; доверительные интервалы определяли для 95% уровня значимости. Для выявления статистически значимых различий между средними значениями использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) при уровне значимости 0.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ влияния CDS AZOBR_p60123 на характеристики поверхностных гликополимеров азоспирилл. В результате проведенного сайт-направленного мутагенеза был получен мутант *A. baldaniorum* Sp245.4-1-1, который содержал вставку гена устойчивости к канамицину в центральной части CDS AZOBR_p60123 предполагаемого гена *wzt* АТР-связывающего белка ABC-транспортера (Л)ПС. Мутант не отличался от родительского штамма скоростью роста на плотных и жидких средах, жгутикованием и подвижностью клеток. Он, как и родительский штамм, синтезировал полисахариды, связывающие прижизненный краситель калькофлуор (Cal⁺ фенотип).

Для подтверждения влияния направленной мутации в гене *wzt* на фенотип *A. baldaniorum* Sp245 была проведена генетическая комплементация *wzt::aphAI* мутанта Sp245.4-1-1 с помощью полученной конструкции pRK415-p60123. С целью выявления возможного влияния повышения дозы исследуемого *wzt* гена на фенотип штамма Sp245, плазида pRK415-p60123 была введена и в его клетки.

На рис. 1а приведены результаты SDS-PAGE препаратов ЛПС Sp245, Sp245(pRK415-p60123), Sp245.4-1-1(pRK415-p60123) и Sp245.4-1-1. По сравнению со штаммом Sp245 (рис 1а, трек 1), у мутанта Sp245.4-1-1 (рис. 1а, трек 4) наблюдается сокращение количества и снижение интенсивности полос в области ОПС2 (зона локализации данного полисахарида штамма Sp245 была определена в работе (Katzu et al., 1998) с использованием соответствующих мутантов по структуре ЛПС). В электрофоретическом профиле препаратов ЛПС комплементированного мутанта Sp245.4-1-1 (pRK415-p60123) (рис. 1а, трек 3), по сравнению с мутантом Sp245.4-1-1, появляются дополнительные полосы по всей длине треков. В верхней части зоны “а” (высокомолекулярная фракция ЛПС) у штамма Sp245.4-1-1(pRK415-p60123) появляются полосы, отсутствующие у Sp245.4-1-1, но присутствующие у Sp245. Введение дополнительной копии гена *wzt* в родительский штамм Sp245 также приводит к изменениям в электрофоретическом профиле препаратов ЛПС полученного производного Sp245(pRK415-p60123) (рис. 1а, трек 2). В частности, в верхней части зо-

ны “а” выявляется большее количество материала по сравнению с диким типом.

Как было отмечено выше, штамм Sp245 синтезирует два высокомолекулярных ЛПС (ОПС1 и ОПС2), содержащие идентичный D-рамнанный O-полисахарид, но имеющие разный заряд и антигенные свойства (Katzu et al., 1998; Fedonenko et al., 2002; Федоненко и соавт., 2004; Petrova et al., 2020). Для подтверждения влияния направленной мутации в AZOBR_p60123 на особенности структуры ЛПС был проведен сравнительный иммунохимический анализ препаратов ЛПС всех исследуемых вариантов методом линейного иммуноэлектрофореза с антителами на ЛПС родительского штамма. На рис. 1б можно видеть, что антитела на Sp245 формируют две линии преципитации с гомологичным ЛПС, соответствующие отрицательно заряженному ОПС1 и нейтральному ОПС2 (рис. 1б, лунка 1), тогда как с ЛПС мутанта Sp245.4-1-1 – только одну полосу преципитации, соответствующую ОПС1 (рис. 1б, лунка 4). При этом у комплементированного мутанта Sp245.4-1-1(pRK415-p60123) восстанавливались антигенные характеристики ЛПС, свойственные родительскому штамму (рис. 1б, лунка 3). Вероятно, инактивация CDS AZOBR_p60123 приводит к дефектам в образовании нейтрального ОПС2, которые устраняются у Sp245.4-1-1(pRK415-p60123) в результате комплементации. Таким образом, использование иммунохимического подхода позволило получить дополнительную информацию, свидетельствующую о синтезе комплементом Sp245.4-1-1(pRK415-p60123) липополисахаридов, гетерогенность которых не отличается от таковой родительского штамма. Стоит отметить, что введение пустого вектора pRK415 в бактерии не влияло на электрофоретический профиль и иммунохимические характеристики препаратов ЛПС Sp245 (Petrova et al., 2020) или Sp245.4-1-1.

Анализ влияния инактивации CDS AZOBR_p60123 на экспрессию CDS AZOBR_p60017. В плазмиде AZOBR_p6 штамма *A. baldaniorum* Sp245 есть еще одна копия гена *wzt* (CDS AZOBR_p60017). Анализ уровня транскриптов второго гена *wzt* (CDS AZOBR_p60017) с помощью ПЦР в реальном времени показал, что в клетках p60123::*aphAI* мутанта Sp245.4-1-1 этот показатель в 2.5 раза превышал значения, характерные для родительского штамма. Введение pRK415-p60123 в Sp245.4-1-1 приводило к значительному снижению транскрипции CDS AZOBR_p60017 в клетках комплементанта Sp245.4-1-1(pRK415-p60123) до значений в 1.7 раз меньше уровня характерного для Sp245 (рис. 2а). В случае производного Sp245 с дополнительной копией гена AZOBR_p60123 (Sp245(pRK415-p60123)) транскрипция CDS AZOBR_p60017 снижается в 2.0 раза (рис. 2а). Таким образом, повышение экспрессии CDS AZOBR_p60017 могло частично компенсировать мутацию CDS AZOBR_p60123

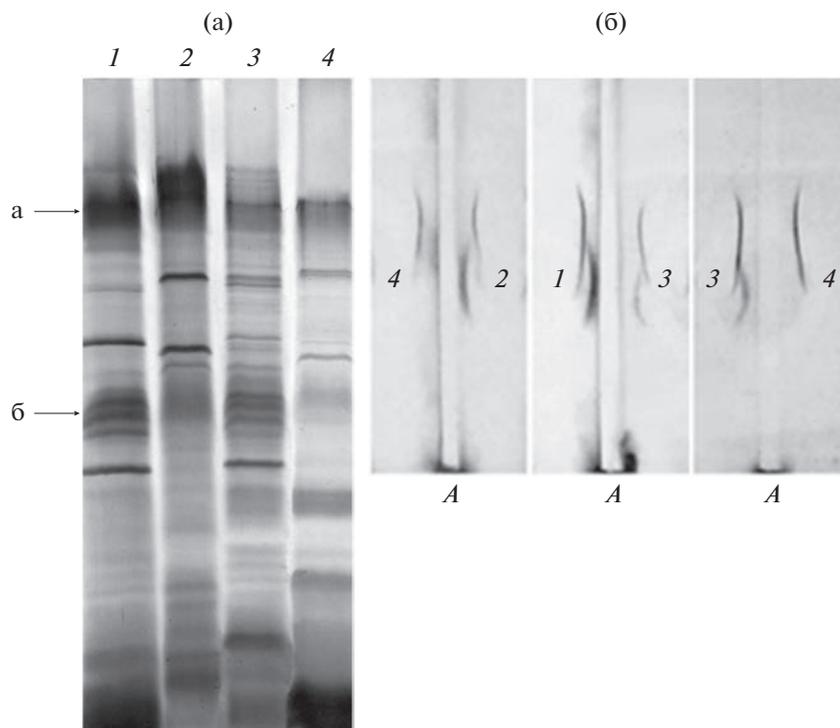


Рис. 1. Характеристика электрофоретических профилей и иммунохимических свойств препаратов ЛПС *A. baldaniorum*: (а) – результаты SDS-PAGE ЛПС штаммов Sp245 (1), Sp245(pRK415–p60123) (2), Sp245.4-1-1(pRK415–p60123) (3), Sp245.4-1-1 (4); (б) – результаты линейного иммуноэлектрофореза экстрактов ЛПС штаммов Sp245 (1), Sp245(pRK415–p60123) (2), Sp245.4-1-1(pRK415–p60123) (3), Sp245.4-1-1 (4) с анти-ЛПС антителами. В центральную траншею (А) вносили поликлональные кроличьи антитела на ЛПС штамма Sp245 (как показано ранее (Dos Santos Ferreira et al., 2020), LpsI и LpsII содержат общие эпитопы).

у p60123::aphAI мутанта Sp245.4-1-1. В то же время введение CDS AZOBR_p60123, клонированной в pRK415 (pRK415–p60123), в клетки этого мутанта или Sp245 приводит к снижению в 1.7–2.0 раза показателей, характеризующих экспрессию CDS AZOBR_p60017 (по сравнению с уровнем экспрессии в клетках родительского штамма) (рис. 2).

Анализ влияния CDS AZOBR_p60123 на накопление азоспириллами биомассы в биопленках. Анализ накопления биомассы в биопленках показал, что все исследованные штаммы не различались в способности формировать биопленки на стекле (рис. 3). На полистироле выявлено статистически значимое снижение относительного количества биомассы в биопленках штамма Sp245.4-1-1 по сравнению со штаммом Sp245. В то же время у комплементанта Sp245.4-1-1(pRK415–p60123) наблюдалось повышение относительного количества биомассы в биопленках по сравнению с мутантом Sp245.4-1-1 (рис. 3). В биопленках штамма Sp245(pRK415–p60123) с искусственно повышенной дозой исследуемого гена *wzI* накапливалось в два раза меньше биомассы, чем в биопленках штамма Sp245 (рис. 3). Введение плазмиды pRK415 в Sp245 и Sp245.4-1-1 не влияло на количественные характеристики биопленок.

ЛПС обладают большим диапазоном длин цепей ОПС, что приводит к характерной лестничной структуре, когда молекулы исследуются с помощью SDS-PAGE (Holguin, Glick, 2001). Характерное для каждой бактерии распределение длин ОПС определяется регуляторными механизмами в путях сборки и, в некоторых случаях, непосредственно транспортерами ABC (Liston et al., 2017). У мутантного штамма Sp245.4-1-1 с инактивированным геном AZOBR_p60123 при SDS-PAGE препаратов ЛПС выявлено сокращение количества и интенсивности полос в области высокомолекулярной фракции, содержащей ОПС2, по сравнению с Sp245. Введение экспрессионной плазмиды pRK415–p60123 в мутантный и родительский штаммы привело к появлению дополнительных полос по всей длине треков в SDS-PAGE профиле препаратов ЛПС. Несмотря на то, что в зоне высокомолекулярной фракции ЛПС у комплементированного мутанта Sp245.4-1-1(pRK415–p60123) нет такой интенсивности полос, как у штамма Sp245, у него появляется большее количество полос в зоне более коротких ОПС (сопоставимое с профилем ЛПС Sp245 в этой зоне). В электрофоретическом профиле ЛПС Sp245(pRK415–p60123) происходит значительное увеличение интенсив-

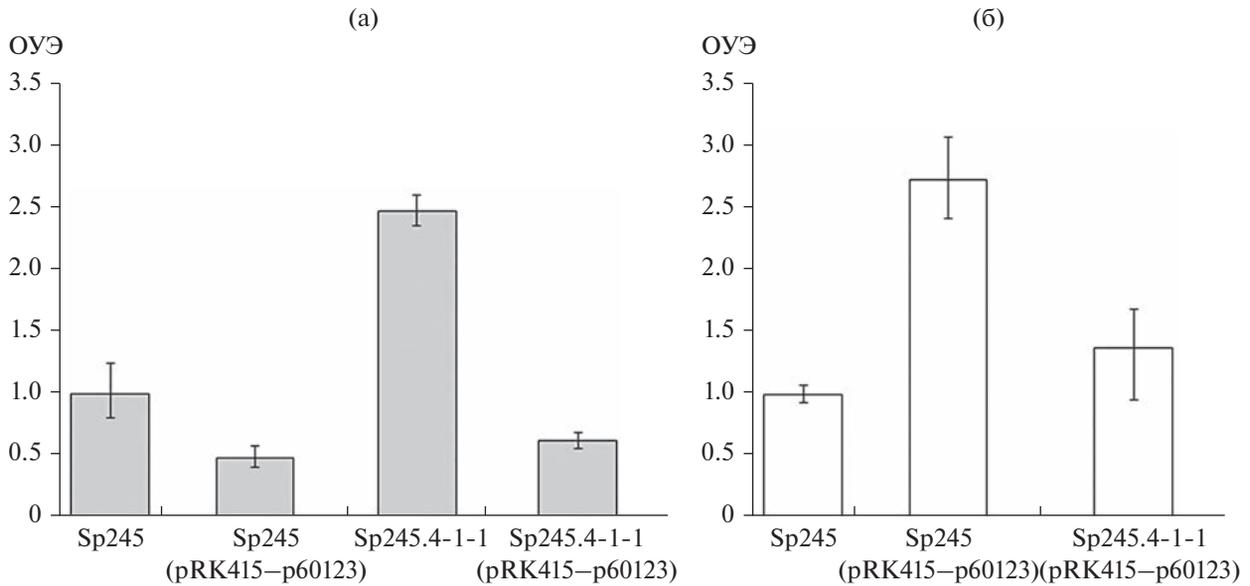


Рис. 2. Результаты анализа экспрессии CDS AZOBR_p60017 (а) и CDS AZOBR_p60123 (б) в клетках *A. baldaniorum*. Относительный уровень экспрессии (ОУЭ) – отношение результатов ПЦР в реальном времени с кДНК AZOBR_p60017 и AZOBR_p60123 штаммов Sp245(pRK415-p60123), Sp245.4-1-1 и Sp245.4-1-1(pRK415-p60123) к аналогичным результатам Sp245.

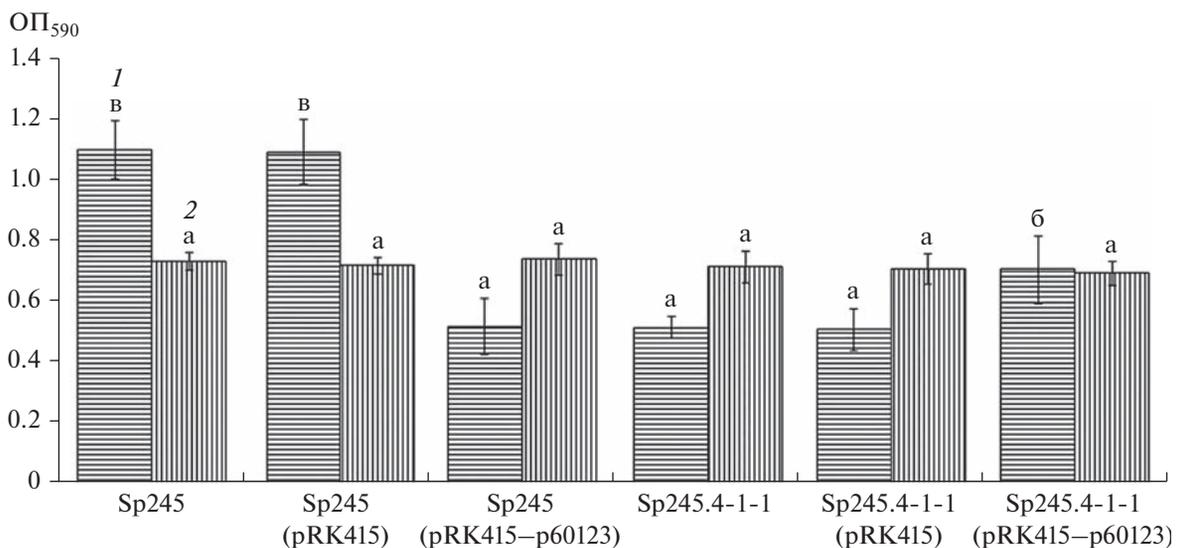


Рис. 3. Относительное количество биомассы в биофлексах азоспирилл, сформированных за 6 сут культивирования на поверхности полистирола (1) или стекла (2) под жидкой средой МСС. ОП₅₉₀ – десорбированного кристаллического фиолетового после окрашивания биопленок.

ности и плотности полос в зоне высокомолекулярной фракции по сравнению с Sp245, что, по всей видимости, вызвано введением дополнительной копии гена *wzt* (AZOBR_p60123).

В работе (Nakao et al., 2006) было показано, что мутация гена *wzt* у бактерии *Porphyromonas gingivalis* не оказывала влияния на профиль ЛПС. Авторы предположили, что, поскольку *P. gingivalis* обладает двумя предполагаемыми генами *wzt*, синтезируется

альтернативный генный продукт, который компенсирует потерю функции мутантного гена. В плазмиде AZOBR_p6 *A. baldaniorum* Sp245 (Wisniewski-Dyé et al., 2011) есть еще одна копия гена *wzt* (CDS AZOBR_p60017), увеличение экспрессии которого мы наблюдали у мутанта, что, очевидно, частично компенсировало мутацию в CDS AZOBR_p60123 у Sp245.4-1-1. Полученные экспериментальные данные свидетельствуют, что

после введения в Sp245.4-1-1 дополнительной копии гена p60123 происходило восстановление синтеза ОПС, но неполное. При этом восстанавливались иммунохимические характеристики ЛПС, свойственные родительскому штамму. Вероятно, низкий уровень экспрессии CDS AZOBR_p60017 по сравнению с Sp245 у Sp245.4-1-1(pRK415-p60123) или Sp245 (pRK415-p60123) на фоне экспрессии CDS AZOBR_p60123 с плазмиды pRK415-p60123 влиял на уровень гетерогенности длин цепей ОПС этих штаммов, определяемых, в том числе, АВС транспортерами (Liston et al., 2017). В случае Sp245(pRK415-p60123) уровень экспрессии CDS AZOBR_p60123 был повышенным, что могло также отразиться на фенотипических характеристиках этого штамма.

Мембранные ЛПС, экскретируемые полисахариды (КПС и ЭПС) бактерий, в том числе, у азоспирилл, фиксируют зрелые биопленки на твердых поверхностях, стабилизируют биомассу биопленок, выполняя каркасную функцию, и необходимы для коллективной подвижности бактерий (Шелудько и соавт., 2018; Petrova et al., 2020). Нарушения в синтезе полисахаридов часто приводят к изменениям в формировании биопленок и подвижности роящихся азоспирилл (Шелудько и соавт., 2007; Petrova et al., 2020). Результаты данного исследования показали, что на гидрофобной поверхности биопленки мутанта Sp245.4-1-1 накапливали в два раза меньше биомассы, чем Sp245, введение pRK415-p60123 в клетки Sp245.4-1-1 или Sp245 приводило у полученных производных, соответственно, к повышению или снижению способности накапливать биомассу в биопленках по сравнению с исходными штаммами. Поскольку все исследованные штаммы не различались по скорости роста в жидких планктонных культурах и на плотных средах, формировали на гидрофильной поверхности биопленки с одинаковым количеством биомассы, можно полагать, что деление клеток не является параметром, лимитирующим накопление биомассы в биопленках.

Сохранение полярного жгутика (Fla) на клетках Sp245, интегрированных в зрелую биопленку, способствует поддержанию ее целостности и повышает ее устойчивость в условиях гидродинамического сдвига (Шелудько и соавт., 2015). Клетки изучаемых штаммов синтезировали полярный жгутик и плавали в жидкой среде с одинаковой скоростью. ЛПС могут способствовать дополнительному включению подвижных бактерий из планктонной культуры в сформированную пленку, однако на гидрофильной поверхности все штаммы создавали одинаковые биопленки, а на гидрофобной пленки у них различались. Таким образом, дополнительное включение бактерий из планктонной культуры в уже образованную биопленку вряд ли играет значимую роль, вероятно, различия начинают проявляться уже на ранних стадиях форми-

рования пленок. На начальных этапах образования биопленок подвижные бактерии формировали тонкие пленки, при микроскопии которых просматривались разрозненные клеточные агрегаты, легко смываемые с поверхности при аспирации суспензий и промывании водой. На данном этапе клетки штаммов Sp245, Sp245(pRK415-p60123), Sp245.4-1-1 и Sp245.4-1-1(pRK415-p60123), различающиеся гетерогенностью ЛПС, могут по-разному взаимодействовать с колонизируемой поверхностью и между собой. Гетерогенность ЛПС, определяемая, в том числе, размером молекулярных масс О-полисахаридов, коррелирует с силами адгезии и прилипания как на уровне отдельной бактерии, так и популяции бактериальных клеток (Jucker et al., 1997; Camesano, Abu-Lail, 2002; Atabek, Camesano, 2007). Длина цепей ОПС опосредует гидрофобность и заряд бактериальных клеток и самих полисахаридов (Atabek, Camesano, 2007). В случае клеток каждого из штаммов эти параметры были, очевидно, индивидуальны. Бактерии по-разному перемещались на разделе жидкая среда/твердая поверхность, взаимодействовали друг с другом или с колонизируемой поверхностью (гидрофобной или гидрофильной), что, вероятно, оказывало влияние на следующие этапы процесса формирования биопленок: процесс прочной адгезии бактерий на поверхности, начало прироста и стабилизации биомассы, характерные для *A. baldaniorum* Sp245 (Шелудько и соавт., 2015).

Можно предположить, что фенотипические различия (иммунохимические характеристики и изменения в формировании биопленок) *A. baldaniorum* Sp245, Sp245(pRK415-p60123), Sp245.4-1-1 и Sp245.4-1-1(pRK415-p60123) обусловлены гетерогенностью ЛПС этих штаммов, опосредованной активностью гена *wzt* (AZOBR_p60123).

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают признательность Центру коллективного пользования научным оборудованием в области физико-химической биологии и нанобиотехнологии “Симбиоз” ИБФРМ РАН (Саратов, Россия).

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

- Евстигнеева С.С., Сигида Е.Н., Федоненко Ю.П., Коннова С.А., Игнатов В.В. Структурные особенности капсульных и О-полисахаридов бактерий *Azospirillum brasilense* Sp245 при изменении условий культивирования // Микробиология. 2016. Т. 85. С. 643–651. <https://doi.org/10.7868/S0026365616060094>
- Yevstigneyeva S.S., Sigida E.N., Fedonenko Y.P., Konnova S.A., Ignatov V.V. Structural properties of capsular and O-specific polysaccharides of *Azospirillum brasilense* Sp245 under varying cultivation conditions // Microbiology (Moscow). 2016. V. 85. P. 664–671. <https://doi.org/10.1134/S0026261716060096>
- Матора Л.Ю., Шварцбург Б.И., Щеголев С.Ю. Иммунохимический анализ О-специфических полисахаридов почвенных азотфиксирующих бактерий *Azospirillum brasilense* // Микробиология. 1998. Т. 67. С. 815–820.
- Matora L.Yu., Shvartsburd B.I., Shchegolev S.Yu. Immunochemical analysis of O-specific polysaccharides from the soil nitrogen-fixing bacteria *Azospirillum brasilense* // Microbiology (Moscow). 1998. V. 67. P. 677–681.
- Матора Л.Ю., Щеголев С.Ю. Антигенная идентичность липополисахаридов, капсулы и экзополисахаридов *Azospirillum brasilense* // Микробиология. 2002. Т. 71. С. 211–214.
- Matora L.Y., Shchegolev S.Y. Antigenic identity of the capsule lipopolysaccharides, exopolysaccharides, and O-specific polysaccharides in *Azospirillum brasilense* // Microbiology (Moscow). 2002. V. 71. P. 178–181. <https://doi.org/10.1023/A:1015146104397>
- Петрова Л.П., Прилипов А.Г., Кацы Е.И. Выявление предполагаемых генов биосинтеза полисахаридов у штаммов *Azospirillum brasilense* из серогрупп I и II // Генетика. 2017. Т. 53. С. 31–42. <https://doi.org/10.7868/S0016675816110102>
- Petrova L.P., Prilipov A.G., Katsy E.I. Detection of putative polysaccharide biosynthesis genes in *Azospirillum brasilense* strains from serogroups I and II // Russ. J. Genet. 2017. V. 53. P. 39–48. <https://doi.org/10.1134/S1022795416110107>
- Шелудько А.В., Кулибякина О.В., Широков А.А., Петрова Л.П., Матора Л.Ю., Кацы Е.И. Влияние мутаций в синтезе липополисахаридов и полисахаридов, связывающих калькофлуор, на формирование биопленок *Azospirillum brasilense* // Микробиология. 2008. Т. 77. С. 358–363.
- Sheludko A.V., Kulibyakina O.V., Shirokov A.A., Petrova L.P., Matora L.Yu., Katsy E.I. The effect of mutations affecting synthesis of lipopolysaccharides and calcofluor-binding polysaccharides on biofilm formation by *Azospirillum brasilense* // Microbiology (Moscow). 2008. V. 77. P. 313–317. <https://doi.org/10.1134/S0026261708030107>
- Шелудько А.В., Филиппьева Ю.А., Телешева Е.М., Буров А.М., Евстигнеева С.С., Бурьгин Г.Л., Петрова Л.П. Характеристика углеводсодержащих компонентов биопленок *Azospirillum brasilense* Sp245 // Микробиология. 2018. Т. 87. С. 483–494. <https://doi.org/10.1134/S0026365618050166>
- Shelud'ko A.V., Filip'echeva Y.A., Telesheva E.M., Burov A.M., Evstigneeva S.S., Burygin G.L., Petrova L.P. Characterization of carbohydrate-containing components of *Azospirillum brasilense* Sp245 biofilms // Microbiology (Moscow). 2018. V. 87. P. 610–620. <https://doi.org/10.1134/S0026261718050156>
- Шелудько А.В., Филиппьева Ю.А., Шумилова Е.М., Хлебцов Б.Н., Буров А.М., Петрова Л.П., Кацы Е.И. Изменения в формировании биопленок у *flhB1* мутанта бактерии *Azospirillum brasilense* Sp245, лишённого жгутиков // Микробиология. 2015. Т. 84. С. 175–183. <https://doi.org/10.7868/s0026365615010127>
- Shelud'ko A.V., Filip'echeva Y.A., Shumilova E.M., Khlebtsov B.N., Burov A.M., Petrova L.P., Katsy E.I. Changes in biofilm formation in the nonflagellated *flhB1* mutant of *Azospirillum brasilense* Sp245 // Microbiology (Moscow). 2015. V. 84. P. 144–151. <https://doi.org/10.1134/S0026261715010129>
- Федоненко Ю.П., Здорovenko Э.Л., Коннова С.А., Игнатов В.В., Шляхтин Г.В. Сравнительная характеристика липополисахаридов и О-специфических полисахаридов *Azospirillum brasilense* Sp245 и его омегон-Км мутантов КМ018 и КМ252 // Микробиология. 2004. Т. 73. С. 180–187.
- Fedonenko Yu.P., Zdrovenko E.L., Konnova S.A., Ignatov V.V., Shlyakhtin G.V. A comparison of the lipopolysaccharides and O-specific polysaccharides of *Azospirillum brasilense* Sp245 and its Omegon-Km mutants КМ018 and КМ252 // Microbiology (Moscow). 2004. V. 73. P. 143–149.
- Atabek A., Camesano T.A. Atomic force microscopy study of the effect of lipopolysaccharides and extracellular polymers on adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* // J. Bacteriol. 2007. V. 18. P. 8503–8509. <https://doi.org/10.1128/JB.00769-07>
- Camesano T.A., Abu-Lail N.I. Heterogeneity in bacterial surface polysaccharides, probed on a single-molecule basis // Biomacromolecules. 2002. V. 3. P. 661–667. <https://doi.org/10.1021/bm015648y>
- Döbereiner J., Day J.M. Associative symbiosis in tropical grass: characterization of microorganisms and dinitrogen fixing sites // Symposium on Nitrogen Fixation / Ed. Newton W.E., Nijmans C.J. Pullman: Washington State University Press, 1976. P. 518–538. <https://doi.org/10.12691/aees-4-4-1>
- Dos Santos Ferreira N., Sant'Anna F.H., Reis V.M., et al. Genome-based reclassification of *Azospirillum brasilense* Sp245 as the type strain of *Azospirillum baldaniorum* sp. nov. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2020. V. 70. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004517>
- Fedonenko Y.P., Zatonsky G.V., Konnova S.A., Zdrovenko E.L., Ignatov V.V. Structure of the O-specific polysaccharide of the lipopolysaccharide of *Azospirillum brasilense* Sp245 // Carbohydr. Res. 2002. V. 337. P. 869–872. [https://doi.org/10.1016/s0008-6215\(02\)00061-7](https://doi.org/10.1016/s0008-6215(02)00061-7)
- Figuerski D.H., Helinski D.R. Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided *in trans* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1979. V. 76. P. 1648–1652. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.4.1648>
- Hendriksen N.B. Microbial biostimulants – the need for clarification in EU regulation // Trends Microbiol. 2022. V. 30. P. 311–313. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2022.01.008>
- Hitchcock P.J., Brown T.M. Morphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolysaccharide chemotypes in sil-

- ver-stained polyacrylamide gels // *J. Bacteriol.* 1983. V. 154. P. 269–277.
<https://doi.org/10.1128/jb.154.1.269-277.1983>
- Hoang T.T., Karkhoff-Schweizer R.R., Kutchma A.J., Schweizer H.P. A broad-host-range Flp-*FRT* recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants // *Gene*. 1998. V. 212. P. 77–86.
[https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(98\)00130-9](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(98)00130-9)
- Holguin G., Glick B.R. Expression of the ACC deaminase gene from *Enterobacter cloacae* UW4 in *Azospirillum brasilense* // *Microb. Ecol.* 2001. V. 41. P. 281–288.
<https://doi.org/10.1007/s002480000040>
- Jucker B.A., Harms H., Hug S.J., Zehnder A.J.B. Adsorption of bacterial surface polysaccharides on mineral oxides is mediated by hydrogen bonds // *Colloids Surf. B Biointerfaces*. 1997. V. 9. P. 331–343.
[https://doi.org/10.1016/S0927-7765\(97\)00038-6](https://doi.org/10.1016/S0927-7765(97)00038-6)
- Katzy E.I., Matora L.Y., Serebrennikova O.B., Scheludko A.V. Involvement of a 120-MDa plasmid of *Azospirillum brasilense* Sp245 in production of lipopolysaccharides // *Plasmid*. 1998. V. 40. P. 73–83.
<https://doi.org/10.1006/plas.1998.1353>
- Keen N.T., Tamaki S., Kobayashi D., Trollinger D. Improved broad-host-range plasmids for DNA cloning in Gram-negative bacteria // *Gene*. 1980. V. 70. P. 191–197.
[https://doi.org/10.1016/0378-1119\(88\)90117-5](https://doi.org/10.1016/0378-1119(88)90117-5)
- Kumar S., Rai A.K., Mishra M.N., Shukla M., Singh P.K., Tripathi A.K. RpoH2 sigma factor controls the photooxidative stress response in a nonphotosynthetic rhizobacterium, *Azospirillum brasilense* Sp7 // *Microbiology (SGM)*. 2012. V. 158. P. 2891–2902.
<https://doi.org/10.1099/mic.0.062380-0>
- Lerner A., Okon Y., Burdman S. The *wzm* gene located on the pRhico plasmid of *Azospirillum brasilense* Sp7 is involved in lipopolysaccharide synthesis // *Microbiology (SGM)*. 2009. V. 155. P. 791–804.
<https://doi.org/10.1099/mic.0.021824-0>
- Liston S.D., Mann E., Whitfield C. Glycolipid substrates for ABC transporters required for the assembly of bacterial cell-envelope and cell-surface glycoconjugates // *Biochim. Biophys. Acta*. 2017. V. 1862. P. 1394–1403.
<https://doi.org/10.1016/j.bbali.2016.10.008>
- Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method // *Methods*. 2001. V. 25. P. 402–408.
<https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Nakao R., Senpuku H., Watanabe H. *Porphyrromonas gingivalis galE* is involved in lipopolysaccharide O-antigen synthesis and biofilm formation // *Infect. Immun.* 2006. V. 74. P. 6145–6153.
<https://doi.org/10.1128/IAI.00261-06>
- Ouchterlony O., Nilsson L.A. Immunodiffusion and immunoelectrophoresis // *Handbook of Experimental Immunology* / Ed. Weiz D.M. Oxford: Alden Press, 1979. V. 1. P. 19–33.
- Petrova L.P., Yevstigneeva S.S., Borisov I.V., Shelud'ko A.V., Burygin G.L., Katsy E.I. Plasmid gene AZOBR_p60126 impacts biosynthesis of lipopolysaccharide II and swarming motility in *Azospirillum brasilense* Sp245 // *J. Basic Microbiol.* 2020. V. 60. P. 613–623.
<https://doi.org/10.1002/jobm.201900635>
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn. N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
- Valvano M.A., Furlong S.E., Patel K.B. Genetics, biosynthesis and assembly of O-antigen // *Bacterial Lipopolysaccharides: Structure, Chemical Synthesis, Biogenesis and Interaction with Host Cells* / Eds. Knirel Y.A., Valvano M.A. Wien: Springer, 2011. P. 275–310.
<https://doi.org/10.1016/j.carres.2003.07.009>
- Vieira J., Messing J. The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers // *Gene*. 1982. V. 19. P. 259–268.
[https://doi.org/10.1016/0378-1119\(82\)90015-4](https://doi.org/10.1016/0378-1119(82)90015-4)
- Wisniewski-Dyé F., Borziak K., Khalsa-Moyers G., et al. *Azospirillum* genomes reveal transition of bacteria from aquatic to terrestrial environments // *PLoS Genet.* 2011. V. 7. P. e1002430.
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002430>
- Zdorovenko E.L., Shashkov A.S., Zhurina M.V., Plakunov V.K., Knirel Y.A. Structure of the O-specific polysaccharides from planktonic and biofilm cultures of *Pseudomonas chlororaphis* 449 // *Carbohydr. Res.* 2015. V. 404. P. 93–97.
<https://doi.org/10.1016/j.carres.2014.10.020>

Effect of the AZOBR_p60123 Plasmid Gene, Encoding the Wzt Protein, on Lipopolysaccharide Synthesis and Biofilm Formation in the Bacterium *Azospirillum baldaniorum* Sp245

L. P. Petrova¹,*, S. S. Evstigneeva¹, Y. A. Filip'echeva¹, I. V. Volokhina¹, G. L. Burygin¹, L. Y. Matora¹, and A. V. Shelud'ko¹,**

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

*e-mail: petrova_lp@mail.ru

**e-mail: shel71@yandex.ru

Received December 6, 2022; revised January 27, 2023; accepted January 30, 2023

Abstract—Inactivation of one of the genes (CDS AZOBR_p60123) of the ABC transporter ATP-binding protein Wzt in the p60123::aphAI mutant of *Azospirillum baldaniorum* Sp245 and the introduction of an addition-

al copy of this gene into the parent or mutant strain affected the chain-length heterogeneity of O polysaccharides (OPSs) and lipopolysaccharides (LPSs), the OPS and LPS immunochemical characteristics, and the strain properties related to polysaccharide production (biofilm construction). Biofilms of the p60123::*aphAI* mutant Sp245.4-1-1 accumulated two times less biomass than those of Sp245. Introduction of pRK415-p60123 into the cells of Sp245.4-1-1 or Sp245 resulted in a respective increase or decrease in the ability of the resulting derivative strains to accumulate biofilm biomass, as compared with the original strains.

Keywords: *Azospirillum baldaniorum*, lipopolysaccharides, *wzt* gene, ABC transporters, biofilms

МИКРОБНЫЕ СООБЩЕСТВА, АССОЦИИРОВАННЫЕ С КРАСНЫМИ ВОДОРОСЛЯМИ БЕЛОГО МОРЯ, КАК ИСТОЧНИК КСИЛАНОЛИТИЧЕСКИХ МИКРООРГАНИЗМОВ

© 2023 г. В. Д. Салова^{а, *}, А. М. Холдина^а, А. Д. Мельник^а, К. С. Заюлина^б, А. Г. Ельченинов^б,
А. А. Клюкина^б, И. В. Кубланов^{а, б}

^аМосковский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, 119234 Россия

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

*e-mail: salovavd@gmail.com

Поступила в редакцию 27.12.2022 г.

После доработки 19.01.2023 г.

Принята к публикации 19.01.2023 г.

Микроорганизмы, ассоциированные с водорослями и обладающие способностью к использованию сложных субстратов (например, растительных гетерополисахаридов), могут являться важными продуцентами гидролитических ферментов. С помощью высокопроизводительного секвенирования переменного участка V4 гена 16S рРНК был проведен анализ микробных сообществ красных водорослей *Corallina* sp. и *Phyllophora* sp., отобранных в акватории Кандалакшского залива Белого моря. В микробиомах обоих образцов преобладали бактерии филумов *Pseudomonadota* и *Bacteroidota* (классификация GTDB, <https://gtdb.ecogenomic.org/>). Для образца *Corallina* sp. было показано доминирование родов *Vibrio*, *Agarivorans* и *Photobacterium*, а для образца *Phyllophora* sp. — *Granulosicoccus* и *Aliivibrio*. Исследуемые красные макроводоросли с ассоциированной с ними микробиотой были использованы в качестве посевного материала для получения накопительных культур, растущих на β-1,4-ксилазе или β-1,3-глюкана (курдлан). Было показано, что во всех накопительных культурах также преобладали филумы *Pseudomonadota* и *Bacteroidota*, однако, в отличие от природных образцов, доминирующими родами в накопительных культурах были *Marinomonas*, *Reinekea*, *Polaribacter* и *Pseudoalteromonas*. Представители последних, наряду с бактериями рода *Vibrio*, были выделены в чистые культуры, для которых была показана ксиланолитическая активность.

Ключевые слова: Белое море, красные водоросли, микробное разнообразие, высокопроизводительное секвенирование, ген 16S рРНК, ксиланолитические микроорганизмы

DOI: 10.31857/S0026365622600882, **EDN:** FXDEOK

Микроорганизмы играют огромную роль в круговороте вещества и энергии как на нашей планете в целом (Заварзин, 1997), так и в Мировом океане в частности (Ducklow, 1983). Являясь единственным внутренним морем бассейна Северного Ледовитого океана, Белое море представляет собой уникальную экосистему с высокими скоростями продукции и деструкции органического вещества, интенсивным перемешиванием воды вследствие приливов и отливов, значительным пресноводным стоком (Саввичев и соавт., 2008), при этом микробные сообщества Белого моря (воды, осадков, обитающих в нем макроорганизмов) практически не исследованы. Ряд предыдущих работ был направлен на оценку численности микроорганизмов (Чикин и соавт., 2003; Кравчишина и соавт., 2008), изучение разнообразия и метаболизма отдельных метаболических групп (Горленко и соавт., 1985), определе-

ние скорости и локализации некоторых микробиологических процессов в Белом море (Саввичев и соавт., 2003, 2008). Относительно недавно появились первые результаты оценки разнообразия прокариот различных экотопов Белого моря, полученные путем анализа последовательностей гена 16S рРНК, например, данные о разнообразии бактерий в толще воды (Pesciaroli et al., 2015; Gorrasi et al., 2019a). При этом микробные сообщества, обитающие в донных осадках или на морских макроорганизмах, до сих пор практически не исследованы. К таким экотопам можно отнести талломы макроводорослей, с которыми должны быть ассоциированы богатые микробные сообщества, способные разлагать полисахариды водорослей.

Наиболее многочисленными макроводорослями Белого моря являются представители бурых

(семейства *Fucaceae* и *Laminariaceae*) и красных (семейства *Palmariaceae* и *Ahnfeltiaceae*) водорослей. Суммарная продукция макрофитов Белого моря составляет около 64 тыс. т $C_{орг.}$, при этом основной вклад в нее вносят роды *Laminaria* (39 тыс. т $C_{орг.}$) и *Fucus* (12 тыс. т $C_{орг.}$) (Романкевич, Ветров, 2001). На сегодняшний день микроорганизмы, ассоциированные с водорослями Белого моря, упоминаются лишь в одном исследовании, посвященном процессу использования углеводородов микроорганизмами, населяющими поверхность бурых водорослей рода *Fucus* (Семенова и соавт., 2009).

Ксиланы – одни из самых распространенных гемицеллюлоз наземных растений, и у высших растений они состоят из остатков ксилозы, соединенных β -(1 → 4)-гликозидными связями, и разнообразных сахаров и/или кислот в боковых цепях (Hsieh, Harris, 2019). Ксиланы водорослей намного хуже исследованы и отличаются тем, что в их основной цепи встречаются β -(1 → 3)-связи, при этом они существуют и как гомополимеры, чьи остатки ксилозы связаны исключительно β -(1 → 3)-связями (Itriki et al., 1960), и как гетерополимеры, в которых чередуются β -(1 → 3)- и β -(1 → 4)-связи (Hsieh, Harris, 2019). Структура ксилана (как и его наличие) коррелирует с таксономическими группами водорослей. Известно, что среди водорослей отдела *Rhodophyta* β -1,3-D-ксилан характерен для клеточных стенок организмов класса *Bangiophyceae* (порядка *Bangiales*), а смесь β -1,3- и 1,4-D-ксиланов – для класса *Nemaliophycidae* (порядков *Nemaliales* и *Palmariales*) (Yoon et al., 2017a). В отделе *Chlorophyta* β -1,3-ксилан представлен в водорослях порядка *Bryopsidales* (Leliaert et al., 2012). Ксилан содержится также в клеточных стенках харовых водорослей (например, в порядках *Charales* и *Zygnematales*), которые относятся к отделу *Streptophyta* и являются пресноводными организмами (Hsieh, Harris, 2019). У разных водорослей доля ксилана в составе их клеточных стенок может варьировать. Например, содержание ксилозы (мономера ксилана) в клеточной стенке красной водоросли *Palmaria palmata* составляет 34.4% (Deniaud et al., 2003), в то время как для зеленых водорослей *Caulerpales* и *Dichotomosiphonales* β -1,3-ксилан может составлять до 50% веса клеточной стенки (Kloareg, Quatrano, 1988).

Гидролиз ксилана осуществляется с помощью ксиланаз, которые достаточно широко распространены среди микромицетов (Shuvaeva, Sysoeva, 2010) и различных прокариот, в подавляющем большинстве представителей бактерий (Mandal, 2015), а также нескольких архей (Gavrilov et al., 2016; Suleiman et al., 2020). Неисследованные микроорганизмы, ассоциированные с морскими водорослями, могут являться потенциальными продуцентами новых ксиланаз. Ожидается, что

ксиланазы микроорганизмов, обитающих в холодных морях, будут активны при температурах, близких к 0°C и могут быть эффективными в достаточно широком диапазоне температур и pH (Qeshmi et al., 2020).

Целью настоящей работы являлось исследование разнообразия микроорганизмов, ассоциированных с содержащими ксилан водорослями Белого моря и способности этих микроорганизмов разлагать ксилан. В ходе нашей работы были изучены микробные сообщества, ассоциированные с красными водорослями, а также были получены накопительные и чистые культуры ксиланолитических бактерий, предположительно, обитающих на этих водорослях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследуемые образцы. Материал для исследования отбирали легководолазным способом в августе 2021 г. в акватории Кандалакшского залива Белого моря вблизи Беломорской биологической станции им. Н.А. Перцова Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

Было отобрано три образца красных водорослей, относящихся к родам *Corallina*, *Phyllophora* и *Porphyra*. Образцы использовали для исследования ассоциированных с ними микробных сообществ с помощью высокопроизводительного секвенирования, а также в качестве посевного материала для культивирования. В первом случае образцы фиксировали в стерильном буфере (100 мМ ЭДТА, 100 мМ Tris-HCl, 150 мМ NaCl; pH 8.0), во втором оставляли интактными в стерильной морской воде до посева на питательную среду. В обоих случаях образцы хранили при 4°C.

Выделение и секвенирование ДНК. Для выделения тотальной ДНК использовали небольшую часть таллома водорослей (0.5–1.0 см), которая была зафиксирована в буфере и хранилась при 4°C. Из накопительных культур клетки микроорганизмов предварительно осаждали центрифугированием (центрифуга 5810 R, “Eppendorf”, Германия) при 7000 g при 4°C в течение 20 мин. Тотальную ДНК из природных образцов и накопительных культур выделяли с помощью набора FastDNA™ Spin Kit for Soil (“MP Biomedicals”, США) в соответствии с инструкциями производителя. Концентрацию выделенной ДНК измеряли с помощью набора QuDye dsDNA HS Assay Kit (“Lumiprobe”, Россия) и флуориметра Qubit 2.0 (“Thermo Fisher Scientific”, США). Препараты ДНК хранили при температуре –20°C. Приготовление библиотек для секвенирования гипервариабельного участка V4 гена 16S рРНК на платформе Illumina проводили, как описано у Vortsepneva et al. (2021). Высокопроизводительное секвенирование проводили на секвенаторе

торе MiSeq (“Illumina”, США) в соответствии с инструкциями производителя.

ДНК из чистых культур выделяли с помощью набора GeneJET Genomic DNA Purification Kit (“Thermo Fisher Scientific”, США). Для амплификации последовательности гена 16S рРНК использовали праймеры 8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCT-CAG) и 1100R (5'-GGGTTGCGCTCGTTG). ПЦР-амплификацию проводили по следующей схеме: первоначальная денатурация при 95°C в течение 5 мин, затем 30 циклов (95°C в течение 30 с, 60°C в течение 1 мин, и 72°C в течение 1 мин) и финальная элонгация при 72°C в течение 20 мин. Очистку ПЦР-продуктов проводили с помощью набора GeneJET Gel Extraction and DNA Cleanup Micro Kit (“Thermo Fisher Scientific”, США). Определение последовательности гена 16S рРНК проводили по Сэнгеру на секвенаторе ABI 3730XL DNA Analyzer (“Applied Biosystems”, США).

Обработка последовательностей и анализ данных. Прочтения V4 региона гена 16S рРНК, полученные в двух повторностях для каждого образца, обрабатывали для дальнейшего анализа так, как это описано в работе Gavrilov et al. (2019). Полученные данные анализировали с использованием сервиса SILVAngs с параметрами по умолчанию (<https://ngs.arb-silva.de/silvangs/>) и базы данных SILVA138.1 SSU. При необходимости, для более точного определения таксономии полученных последовательностей, проводили поиск ближайших родственников в базах данных NCBI с помощью BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Данные о распределении микроорганизмов представлены в виде среднего значения по двум повторностям.

Статистический анализ проводили с помощью ПО QIIME 2 (<https://qiime2.org>) (Bolyen et al., 2019). Для описания степени разнообразия каждого образца (α -разнообразия) были использованы следующие индексы: Шеннона (Shannon, Weaver, 1949), Фишера (Fisher et al., 1943) и Пиелу (Pielou, 1966). Анализ разнообразия между исследуемыми образцами (β -разнообразия) проводили с использованием матрицы расхождения Брея–Кертиса (Sorensen, 1948) и метода ординации PCoA (Principle Coordinates Analysis).

Полученные в ходе секвенирования по Сэнгеру последовательности обрабатывали и собирали с помощью ПО BioEdit. Для определения таксономического положения использовали NCBI BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Постановка накопительных культур. В качестве питательной среды для получения и пересевов накопительных культур использовали профильтрованную через фильтр грубой очистки (100 мкм) морскую воду, к которой добавляли буковый ксилан (1 г л⁻¹; “Megazyme”, Ирландия) или курдлан (1 г л⁻¹; “Megazyme”, Ирландия). Курдлан (β -1,3-

глюкан) выступал в роли аналога β -1,3-ксилана, присутствующего в клеточных стенках водорослей порядка *Bangiales* (Hsieh, Harris, 2019), соответственно, среду с курдланом использовали для культивирования микроорганизмов с поверхности *Porphyra* sp. Культивирование проводили в аэробных условиях во флаконах объемом 100 мл, заполненных 20 мл среды. При дальнейших пересевах накопительные культуры культивировали во флаконах объемом 10 мл с 5 мл среды; в обоих случаях засеянные среды инкубировали при температуре 15°C в течение 10 сут.

Выделение чистых культур ксиланолитических бактерий. Микроорганизмы, доминирующие в накопительных культурах, в которых по результатам фазово-контрастной микроскопии (BX51; “Olympus”, Япония) был отмечен наиболее активный рост микробов, выделяли в чистые культуры с помощью метода предельных разведений с последующим высевом на плотную среду. В качестве среды использовали профильтрованную через фильтр грубой очистки (100 мкм) морскую воду с добавлением букового ксилана (1 г л⁻¹) и агарозы (15 г л⁻¹; “VWR Amresco”, США).

Для поддержания чистых культур использовали плотную среду на основе морской воды, профильтрованной через фильтр грубой очистки (100 мкм), с добавлением букового ксилана (1 г л⁻¹), дрожжевого экстракта (0.1 г л⁻¹) и агарозы (15 г л⁻¹).

Анализ ксиланолитической активности. Ксиланолитическую активность выделенных штаммов анализировали качественно с помощью красителя Конго красного. Для этого исследуемые штаммы культивировали на плотной среде с добавлением букового ксилана (1 г л⁻¹; “Megazyme”, Ирландия) при 15°C в течение 5 сут. Выросшие колонии смывали, а агаризованную среду окрашивали 0.1% раствором Конго красного в течение 15–30 мин, излишки красителя удаляли 1 М раствором NaCl. Активность ксиланаз оценивали по наличию зон просветления в местах образования и вокруг колоний.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Исследование состава микробных сообществ, ассоциированных с красными водорослями. Микробные сообщества, ассоциированные с красными водорослями Кандалакшского залива Белого моря, были исследованы методом высокопроизводительного секвенирования переменных участков V4 генов 16S рРНК присутствующих в них микроорганизмов. Было изучено три образца талломов красных водорослей родов *Corallina*, *Phyllophora* и *Porphyra*, однако определить структуру микробных сообществ, ассоциированных с этими талломами, удалось только для первых двух. Состав микробного сообщества, ассоциированного с во-

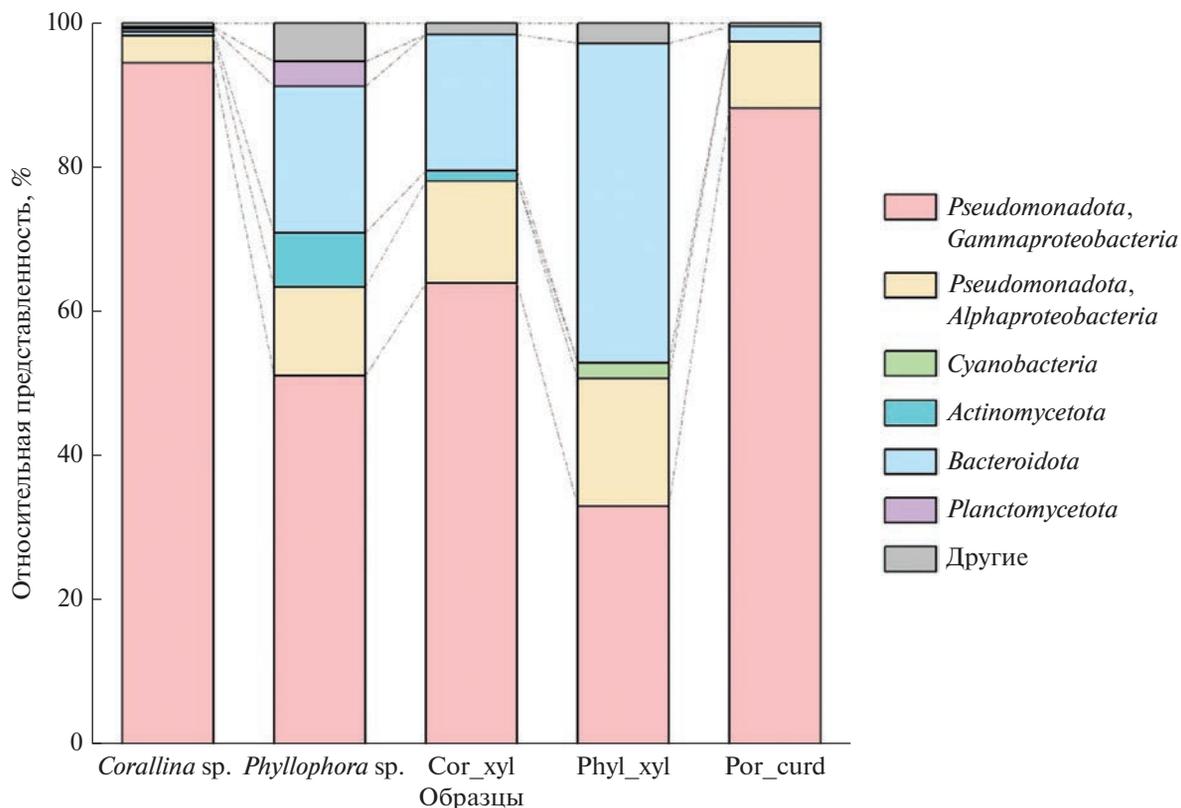


Рис. 1. Микробный состав образцов на уровне филумов. Филумы с относительной представленностью <3% были собраны в группу “Другие”. Cor_xyl – накопительная культура, засеянная талломом *Corallina* sp., с добавлением букового ксилана; Phyl_xyl – накопительная культура, засеянная талломом *Phyllophora* sp., с добавлением букового ксилана; Por_curd – накопительная культура, засеянная талломом *Porphyra* sp., с добавлением курдлана.

дорослями рода *Porphyra* определить не удалось, предположительно, из-за низкого содержания прокариотической ДНК в образце.

Среди микробных ассоциантов таллома красной водоросли *Corallina* sp., были обнаружены представители 5 бактериальных филумов (рис. 1). Филум *Pseudomonadota* был самым многочисленным, его доля в микробиоме составила 97.7% (всех полученных последовательностей здесь и далее), из которой 94.4% относятся к *Gammaproteobacteria*, а 3% – к *Alphaproteobacteria*. Самыми многочисленными семействами являлись *Vibrionaceae* и *Psychromonadaceae*, которые относятся к порядку *Enterobacteriales*, а на уровне рода – к представителям *Vibrio*, *Agarivorans*, *Photobacterium* и *Aliivibrio*.

В образце таллома красной водоросли *Phyllophora* sp. были обнаружены представители 11 филумов, среди которых самым многочисленным также являлся *Pseudomonadota* (63%), и, в частности, классы *Gammaproteobacteria* (51%) и *Alphaproteobacteria* (12%). Следующим по численности был филум *Bacteroidota* (20%), основу которого составил класс *Bacteroidia* (преобладали порядки *Flavobacteriales* (9%) и *Chitinophagalas* (11%)). Так-

же стоит отметить присутствие представителей филумов *Actinomycetota* и *Planctomycetota*, доля которых составила 7.5 и 3% соответственно. Наиболее представленными в классе *Gammaproteobacteria* оказались следующие порядки: *Enterobacteriales* (20%) и *Granulosicoccales*, который был представлен единственным родом *Granulosicoccus* (13%). Большинство представителей *Enterobacteriales* относились к семейству *Vibrionaceae* (12%), а именно к роду *Aliivibrio* (10%). Подавляющую часть *Alphaproteobacteria* составили бактерии порядков *Rhodobacteriales* (5.5%) и *Caulobacteriales* (4%). Филум *Actinomycetota* был представлен одним порядком – *Microtrichales* (7.5%), большую часть составила некультивируемая клада Sva0996 marine group (6%).

Получение накопительных культур, гидролизующих ксилан. Образцы талломов красных водорослей Кандалакшского залива использовали для инокуляции жидких аэробных сред с ксиланом и курдланом с последующей инкубацией при 15°C. На основании оценки роста с помощью фазово-контрастной микроскопии для дальнейших пересевов были отобраны три накопительные культуры: две культуры, использующие ксилан, где инокуля-

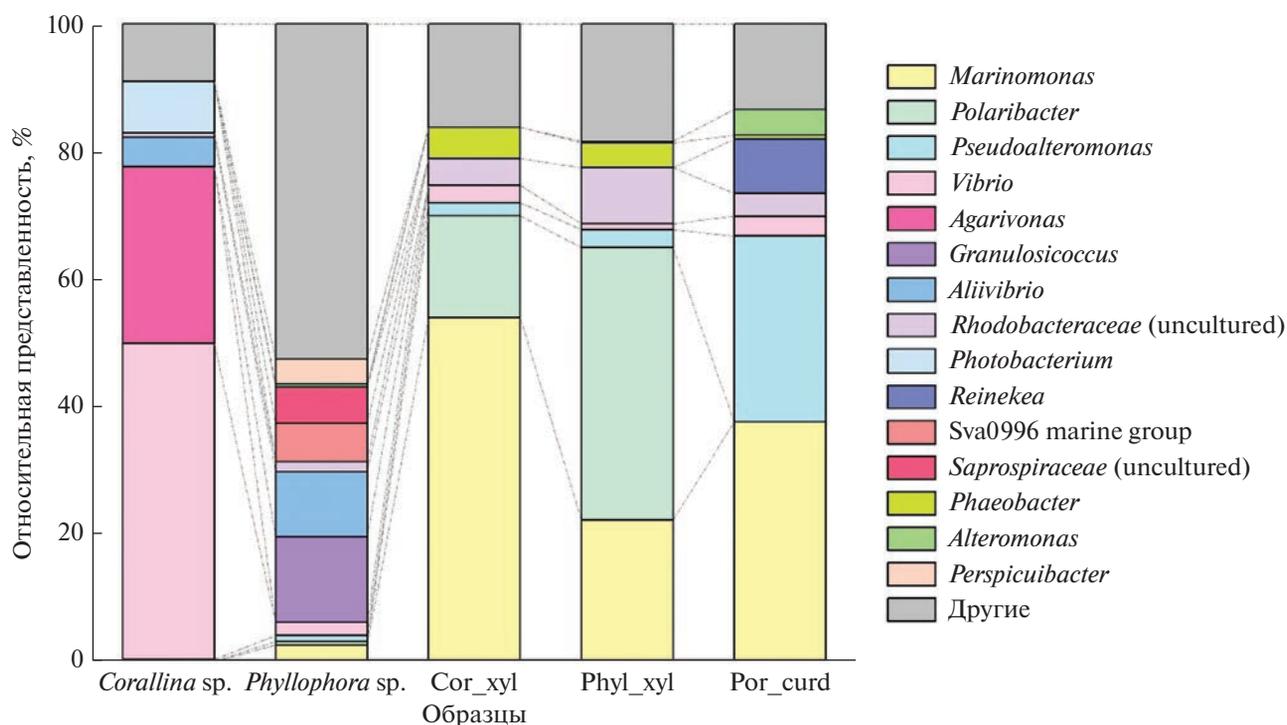


Рис. 2. Микробный состав образцов на уровне рода. Рода с относительной представленностью <3% были собраны в группу “Другие”. Cor_xyl – накопительная культура, засеянная талломом *Corallina* sp., с добавлением букового ксилана, Phyl_xyl – накопительная культура, засеянная талломом *Phyllophora* sp., с добавлением букового ксилана, Por_curd – накопительная культура, засеянная талломом *Porphyra* sp., с добавлением курдлана.

том служили талломы *Corallina* sp. и *Phyllophora* sp. (Cor_xyl и Phyl_xyl соответственно), и одна культура, растущая на курдлане, где инокулятом являлся таллом *Porphyra* sp. (Por_curd).

Анализ состава накопительных культур, использующих ксилан в качестве субстрата. Для высокопроизводительного секвенирования варибельного участка V4 гена 16S рРНК были выбраны накопительные культуры после одного (Cor_xyl и Phyl_xyl) или двух (Por_curd) последовательных пересевов и инкубации в течение 10 сут при 15°C.

В накопительной культуре Cor_xyl доминировали представители филума *Pseudomonadota* (78% всех полученных последовательностей) – роды *Marinomonas* (54%), *Vibrio* (3%), *Pseudoalteromonas* (2%) и *Pseudomonas* (1%) (рис. 2). Также в значительном количестве присутствовали бактерии филума *Bacteroidota* (19%), в основном род *Polaribacter* (16%).

Для накопительной культуры Phyl_xyl также были характерны филумы *Pseudomonadota* (51%) и *Bacteroidota* (44%), в значительно меньшем количестве присутствовали филумы *Cyanobacteria* (2%) и *Bdellovibrionota* (1%). Как и в накопительной культуре Cor_xyl, преобладали роды *Marinomonas* (22%) и *Polaribacter* (41%).

Наконец, в накопительной культуре Por_curd было обнаружено абсолютное доминирование филума *Pseudomonadota*, представители которого

составили около 97% микробного сообщества. Большую долю составили роды *Marinomonas* (38%), *Pseudoalteromonas* (29%) и *Reinekea* (8%). Также во всех накопительных культурах значительную долю составили представители семейства *Rhodobacteraceae* (9–20%) класса *Alphaproteobacteria*.

Анализ α -разнообразия и β -разнообразия. Анализ α -разнообразия показал, что в природном образце *Corallina* sp. биоразнообразие было ниже, чем в образце *Phyllophora* sp. Разнообразию в накопительных культурах сравнимом с природным образцом *Corallina* sp. (табл. 1). Анализ β -разнообразия показал, что микробиомы природных образцов составляют свои отдельные кластеры, тогда как сообщества всех накопительных культур кластеризуются в одну группу (рис. 3).

Выделение чистых культур. Всего из накопительных культур, растущих на среде с ксиланом и курдланом, было выделено 14 изолятов: 6 – из накопительной культуры Cor_xyl, 4 – из Phyl_xyl и 4 – из Por_curd. Определение ксиланолитической активности с помощью Конго красного показало, что к гидролизу ксилана способны три штамма, обозначенные как Cor_xyl_2, Phyl_xyl_7 и Por_curd_11. На основе филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК штаммы Cor_xyl_2, Phyl_xyl_7 и Por_curd_11

Таблица 1. Индексы α -разнообразия для исследуемых образцов

Образец	Наблюдаемое разнообразие	Индекс Шеннона*	Индекс Фишера**	Индекс выравненности Пielou***
<i>Corallina</i> sp.	32	2.52	4.15	0.52
<i>Phyllophora</i> sp.	132	6.05	24.19	0.86
Cor_xyl	39	3.49	4.94	0.69
Phyl_xyl	31	3.48	4.87	0.70
Por_curd	19	3.13	2.84	0.72

* Shannon, Weaver, 1949.

** Fisher et al., 1943.

*** Pielou, 1966.

Примечание. Cor_xyl – накопительная культура, засеянная талломом *Corallina* sp., с добавлением букового ксилана; Phyl_xyl – накопительная культура, засеянная талломом *Phyllophora* sp., с добавлением букового ксилана; Por_curd – накопительная культура, засеянная талломом *Porphyra* sp., с добавлением курдлана.

были идентифицированы как представители родов *Pseudoalteromonas* и *Vibrio* (табл. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ

Основу микробных сообществ на поверхности морских макроводорослей обычно составляют представители *Pseudomonadota*, *Bacteroidota*, *Bacillota* и *Actinomycetota*, при этом более половины сообщества представлено первым филумом (Hollants et al., 2013; Gaitan-Espitia, Schmid, 2020). Представители филумов *Pseudomonadota* (классы

Gammaproteobacteria и *Alphaproteobacteria*) и *Bacteroidota* (порядок *Flavobacteriales*) также преобладают в бактериальном сообществе прибрежной воды Белого моря по данным Gorrasi et al. (2019a, 2019b). В исследованных нами образцах талломов водорослей Белого моря наблюдалась схожая картина: преобладали филумы *Pseudomonadota*, *Bacteroidota* и *Actinomycetota*, при этом в образце *Corallina* sp. разнообразие на уровне филумов было представлено одной кладой (*Pseudomonadota*, 98%). В обзорной работе Hollants et al. (2013) для красных и бурых водорослей было показано большее разнообразие видов, относящихся к *Bacillota*, *Actinomycetota* и *Planctomycetota*. В нашем исследовании эти группы присутствовали в значительном количестве только в микробиоме *Phyllophora* sp. В работе Brodie et al. (2016) было описано более разнообразное микробное сообщество, ассоциированное с *Corallina officinalis*, отобранной в Бристольском заливе: было обнаружено 35 бактериальных филумов, среди которых многочисленными являлись *Pseudomonadota*, *Cyanobacteria*, *Bacteroidota*, *Actinomycetota*. В меньшей степени были представлены *Planctomycetota*, *Acidobacteriota*, *Verrucomicrobiota*, *Bacillota*, *Chloroflexota* и *Nitrospirota*. Внутри филума *Pseudomonadota* классы *Gammaproteobacteria* и *Alphaproteobacteria* составляли примерно равные доли. Такое различие микробного разнообразия можно объяснить методическими особенностями. Так, Brodie et al. (2016) для описания разнообразия использовали область V6 гена 16S рРНК. При анализе микробиома *C. officinalis* в другой работе преобладали *Bacteroidota* и *Gammaproteobacteria* (Huggett et al., 2006). Однако в нашем образце было выявлено явное доминирование класса *Gammaproteobacteria* (рис. 1). На данный момент нет работ, посвященных описанию микробиома красной водоросли рода *Phyllophora*. Тем не менее, для *Phyllophora crispa* было показано наличие аммоний-окисляющих бактерий, а именно *Nitrosospira* spp. и *Nitrosomonas euro-*

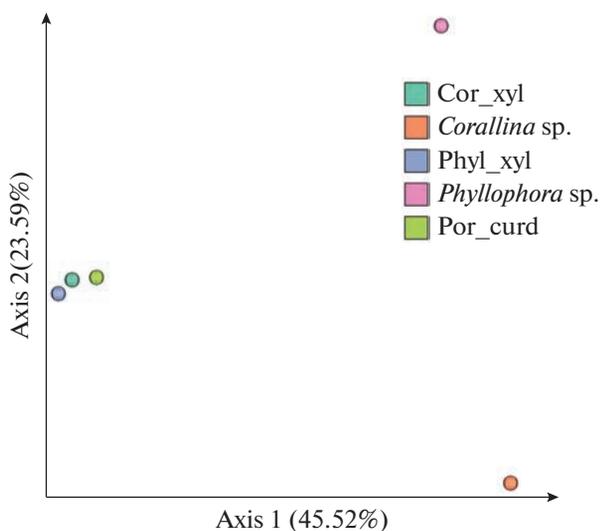


Рис. 3. Анализ β -разнообразия микробных сообществ исследуемых образцов, проведенный с использованием матрицы расхождения Брея–Кертиса и метода ординации PCoA (Principle Coordinates Analysis). Cor_xyl – накопительная культура, засеянная талломом *Corallina* sp., с добавлением букового ксилана; Phyl_xyl – накопительная культура, засеянная талломом *Phyllophora* sp., с добавлением букового ксилана; Por_curd – накопительная культура, засеянная талломом *Porphyra* sp., с добавлением курдлана.

Таблица 2. Результаты анализа последовательностей гена 16S рНК

Штамм	Исходный природный образец	Субстрат	Ближайшие родственные виды	Сходство с типовым штаммом, %
Cor_xyl_2	<i>Corallina</i> sp.	Ксилан	<i>Pseudoalteromonas nigrifaciens</i> / <i>P. marina</i> / <i>P. paragorgicola</i> / <i>P. elyakovii</i> / <i>P. arctica</i>	99.48
Phyl_xyl_7	<i>Phyllophora</i> sp.	Ксилан	<i>Vibrio lentus</i> / <i>V. atlanticus</i> / <i>V. cyclitrophicus</i> / <i>V. gigantis</i> / <i>V. kanaloe</i> / <i>V. tasmaniensis</i> / <i>V. splendidus</i> / <i>V. gallaecicus</i> / <i>V. pomeroyi</i> / <i>V. chagasii</i> / <i>V. crassostreae</i>	99.65
Por_curd_11	<i>Porphyra</i> sp.	Курдлан	<i>Pseudoalteromonas hodoensis</i> / <i>P. atlantica</i>	100.00

paea (Trias et al., 2012). Однако для нашего образца присутствие этих организмов показано не было.

На более низких таксономических уровнях среди микробных сообществ красных водорослей чаще, чем среди зеленых и бурых, встречаются роды *Vibrio*, *Alteromonas*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Rhodospirellula*, *Roseobacter* и *Photobacterium* (Hollants et al., 2013). В работе Huggett et al. (2006) с поверхности *C. officinalis* были выделены штаммы родов *Pseudoalteromonas*, *Vibrio*, *Shewanella*, *Photobacterium* и *Pseudomonas*, при этом в нашем образце *Vibrio* и *Photobacterium* были одними из самых многочисленных (рис. 2).

В нашей работе микробное разнообразие в образце *Phyllophora* sp. было больше, чем в образце *Corallina* sp., что подтверждается индексами α -разнообразия ($p < 0.05$, тест Стьюдента) (табл. 1). Кроме того, стоит отметить, что в образце *Phyllophora* sp. не наблюдалось доминирование определенных групп, когда для *Corallina* sp. основную долю составили представители родов *Vibrio*, *Agarivorans*, *Photobacterium* и *Aliivibrio*. Поскольку многочисленными родами бактерий среди различных прибрежных образцов Белого моря являются *Psychrobacter*, *Pseudoalteromonas*, *Marinomonas*, *Vibrio* и *Halomonas* (Gorrasi et al., 2019a, 2019b). В работе Singh, Reddy (2014) сделано заключение, что на представителях разных видов красных макроводорослей, произрастающих в одной и той же экологической нише, образуются специфические для каждого вида бактериальные сообщества.

Для микробных сообществ накопительных культур единственным источником углерода и энергии были ксилан (Cor_xyl и Phyl_xyl) и курдлан (Por_curd). В двух накопительных культурах Cor_xyl и Phyl_xyl преобладали и достоверно увеличили свою долю в сообществе представители *Polaribacter* ($p < 0.05$, тест Стьюдента) и *Marinomonas* ($p < 0.01$, тест Стьюдента). Эти доминирующие роды входили в минорную группу соответствующих природных образцов. Известно, что род *Polaribacter* способен к гидролизу различных морских полисахаридов, входящих в состав клеточной стенки водорослей (Xing et al., 2015; Avci

et al., 2020). Анализ полных геномов показал наличие у этих микроорганизмов генов, кодирующих около 85 ферментов, участвующих в деградации полисахаридов (Yoon et al., 2017b). В ряде исследований у бактерий рода *Polaribacter* были обнаружены гены, кодирующие ферменты, предположительно способные расщеплять ксилан, например, эндо- β -1,4-ксилаза (Kim et al., 2019), и было показано наличие специальных симпортеров для ксилозы (Xing et al., 2015). Стоит отметить, что по сравнению с другими обнаруженными родами род *Polaribacter* входил в состав минорной группы морской воды Белого моря (Gorrasi et al., 2019a, 2019b). Для рода *Marinomonas* в единичных работах были показаны альгиная (Martin et al., 2015), агаразная (Yu et al., 2020) и слабая ксиланазная активности (Johnson et al., 2017).

В накопительной культуре Por_curd, в которой курдлан (β -1,3-глюкан) был единственным источником энергии и углерода, доминирующими микроорганизмами оказались представители *Marinomonas*, *Pseudoalteromonas* и *Reinekea* (рис. 2). Эти таксоны, по всей видимости, не случайны, так как известно, что род *Pseudoalteromonas* способен к гидролизу ламинарина, в состав которого входит β -1,3-глюкан (Gobet et al., 2018). Для представителей этого рода была показана ферментативная активность по отношению к разнообразным гemicеллюлозам, включая ксиланы (Ray et al., 2019). Некоторые представители рода *Reinekea* обладают ферментами для разложения маннана и α -глюканов (Avci et al., 2017), но данных о способности к гидролизу ксилана на данный момент нет.

Несмотря на все различия, микробные сообщества накопительных культур кластеризуются в одну группу, что показали результаты анализа β -разнообразия (рис. 3). В связи с этим мы можем предположить, что, несмотря на то, что они являются представителями широко распространенных в воде Белого моря родов, на исследованных нами субстратах накапливаются именно ксиланолитические микроорганизмы. Кроме того, исходя из литературных данных, можно предположить, что во всех накопительных культурах род

Marinomonas, а в *Por_curd* род *Reinekea* являются диссипотрофами, использующими продукты гидролиза исследуемых полисахаридов, получаемых в результате действия гидролитических ферментов *Polaribacter* и *Pseudoalteromonas*.

Выделенные из накопительных культур *Cor_xyl* и *Phyl_xyl* штаммы, способные гидролизовать ксилан, относились к родам *Pseudoalteromonas* и *Vibrio* соответственно. Эти рода не являлись доминирующими в составе всех исследованных микробных сообществ, их доли не превышали 2%. На курдлане в чистую культуру был выделен представитель рода *Pseudoalteromonas*, который доминировал в накопительной культуре *Por_curd*. Известно, что представители рода *Vibrio* обладают возможностью продуцировать различные гидролитические ферменты, в том числе и β -1,3-ксилазы (Araki et al., 1999). Кроме того, было показано наличие D-ксилоизомераз (Umemoto et al., 2012), что также свидетельствует о способности к гидролизу ксиланов.

Выделять ксиланолитические микроорганизмы можно не только с поверхности высших растений, но также и с макроводорослей, в клеточных стенках которых содержится ксилан. Красные макроводоросли из арктических морей могут являться объектом для поиска психроактивных микроорганизмов, обладающих ксиланолитической активностью при пониженных температурах. В нашей работе были исследованы микробиомы беломорских макроводорослей *Corallina* sp. и *Phyllophora* sp., для которой это было сделано впервые. Были оценены изменения относительной представленности таксонов микроорганизмов с поверхности красных водорослей при культивировании на ксилане и курдлане и выделены накопительные и чистые культуры на этих субстратах, обладающие ксиланазной активностью.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность к. б. н., с. н. с. Е.Н. Виноградовой (МГУ им. М.В. Ломоносова) за помощь в определении водорослей и пробоподготовке для секвенирования чистых культур, к. б. н., с. н. с. А.Ю. Меркелю (ФИЦ Биотехнологии РАН) за помощь в статистической обработке данных, директору ББС им. Н.А. Перцова д. б. н., проф. А.Б. Цетлину и всему коллективу биостанции за предоставление возможности выполнения работы на ее базе.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа поддержана Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение 075-15-2021-1396).

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

- Горленко В.М., Пучкова Н.Н., Демчев В.В. Фотосинтезирующие микроорганизмы супралиторали Белого моря // Биологические науки. 1985. Т. 5. С. 66–72.
- Заварзин Г.А. Становление биосферы // Микробиология. 1997. Т. 66. С. 725–734.
- Zavarzin G.A. The rise of the biosphere // Microbiology (Moscow). 1997. V. 66. P. 603–611.
- Кравчишина М.Д., Мицкевич И.Н., Веслополова Е.Ф., Шевченко В.П., Лисицын А.П. Взаимосвязь взвеси и микроорганизмов в водах Белого моря // Океанология. 2008. Т. 48. С. 900–917.
- Kravchishina M.D., Mitzkevich I.N., Veslopolova E.F., Shevchenko V.P., Lisitzin A.P. Relationship between the suspended particulate matter and microorganisms in the White Sea waters // Oceanology. 2008. V. 48. P. 837–854.
- Романкевич Е.А., Ветров А.А. Цикл углерода в арктических морях России. М.: Наука, 2001. 300 с.
- Саввичев А.С., Русанов И.И., Захарова Е.Е., Веслополова Е.Ф., Мицкевич И.Н., Кравчишина М.Д., Леин А.Ю., Иванов М.В. Микробные процессы циклов углерода и серы в Белом море // Микробиология. 2008. Т. 77. С. 823–838.
- Savvichev A.S., Rusanov I.I., Zakharova E.E., Veslopolova E.F., Mitzkevich I.N., Kravchishina M.D., Lein A.Yu., Ivanov M.V. Microbial processes of the carbon and sulfur cycles in the White Sea // Microbiology (Moscow) 2008. V. 77. P. 734–750.
- Саввичев А.С., Русанов И.И., Юсупов С.К., Байрамов И.Т., Пименов Н.В., Леин А.Ю., Иванов М.В. Процесс микробной сульфатредукции в осадках прибрежной зоны и литорали Кандалакшского залива Белого моря // Микробиология. 2003. Т. 72. С. 535–546.
- Savvichev A.S., Rusanov I.I., Yusupov S.K., Bairamov I.T., Pimenov N.V., Lein A.Y., Ivanov M.V. The process of microbial sulfate reduction in sediments of the coastal zone and littoral of the Kandalaksha Bay of the White Sea // Microbiology (Moscow). 2003. V. 72. P. 478–489.
- Семенова Е.В., Шлыкова Д.С., Семенов А.М., Иванов М.Н., Шеляков О.В., Нетрусов А.И. Бактерии-эпифиты бурных водорослей в утилизации нефти в экосистемах северных морей // Вестник Моск. ун-та. Сер. 16. Биология. 2009. № 3. С. 18–22.
- Чикин С.М., Тарасова Н.А., Саралов А.И., Банникова О.М. Особенности распространения бактерио- и мезозоопланктона в прибрежных водах Белого и Баренцева морей // Микробиология. 2003. Т. 72. С. 250–258.
- Chikin S.M., Tarasova N.A., Saralov A.I., Bannikova O.M. The distribution of bacterio- and mesozooplankton in the coastal waters of the White and Barents seas // Microbiology (Moscow). 2003. V. 72. P. 213–220.

- Araki T., Tani S., Maeda K., Hashikawa S., Nakagawa H., Morishita T. Purification and characterization of β -1,3-xylanase from a marine bacterium, *Vibrio* sp. XY-214 // Biosci. Biotechnol. Biochem. 1999. V. 63. P. 2017–2019.
- Avcı B., Hahnke R.L., Chafee M., Fischer T., Gruber-Vodicka H., Tegetmeyer H.E., Harder J., Fuchs B.M., Amann R.I., Teeling H. Genomic and physiological analyses of 'Reinkea forsetii' reveal a versatile opportunistic lifestyle during spring algae blooms // Environ. Microbiol. 2017. V. 19. P. 1209–1221.
- Avcı B., Krüger K., Fuchs B.M., Teeling H., Amann R.I. Polysaccharide niche partitioning of distinct *Polaribacter* clades during North Sea spring algal blooms // ISME J. 2020. V. 14. № 6. P. 1369–1383.
- Bolyen E., Rideout J.R., Dillon M.R., Bokulich N.A., Abnet C.C., Al-Ghalith G.A., Alexander H., Alm E.J., Arumugam M., Asnicar F. et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2 // Nat. Biotechnol. 2019. V. 37. P. 852–857.
- Brodie J., Williamson C., Barker G.L., Walker R.H., Briscoe A., Yallop M. Characterising the microbiome of *Corallina officinalis*, a dominant calcified intertidal red alga // FEMS Microbiol. Ecol. 2016. V. 92. P. fiw110.
- Deniaud E., Quemener B., Fleurence J., Lahaye M. Structural studies of the mix-linked β -(1 \rightarrow 3)/ β -(1 \rightarrow 4)-D-xylans from the cell wall of *Palmaria palmata* (Rhodophyta) // Int. J. Biol. Macromol. 2003. V. 33. P. 9–18.
- Ducklow H.W. Production and fate of bacteria in the oceans // Bioscience. 1983. V. 33. P. 494–501.
- Fisher R.A., Corbet A.S., Williams C.B. The relation between the number of species and the number of individuals in a random sample of an animal population // J. Anim. Ecol. 1943. V. 12. P. 42–58.
- Gaitan-Espitia J.D., Schmid M. Diversity and functioning of Antarctic seaweed microbiomes // Antarctic Seaweeds: Diversity, Adaptation and Ecosystem Services / Eds. Gómez I., Huovinen P. Cham: Springer, 2020. P. 279–291.
- Gavrilov S.N., Korzhenkov A.A., Kublanov I.V., Bargiela R., Zamana L.V., Popova A.A., Peter S.V., Golyshin N., Golyshina O.V. Microbial communities of polymetallic deposits' acidic ecosystems of continental climatic zone with high temperature contrasts // Front. Microbiol. 2019. Art. 1573.
- Gavrilov S.N., Stracke C., Jensen K., Menzel P., Kallnik V., Slesarev A., Sokolova T., Zayulina K., Brasen K., Bonch-Osmolovskaya E.A., Peng X., Kublanov I., Siebers B. Isolation and characterization of the first xylanolytic hyperthermophilic euryarchaeon *Thermococcus* sp. strain 2319X1 and its unusual multidomain glycosidase // Front. Microbiol. 2016. V. 7. Art. 552.
- Gobet A., Barbeyron T., Matard-Mann M., Magdelenat G., Vallenet D., Duchaud E., Michel G. Evolutionary evidence of algal polysaccharide degradation acquisition by *Pseudoalteromonas carrageenovora* 9T to adapt to macroalgal niches // Front. Microbiol. 2018. V. 9. Art. 2740.
- Gorrasi S., Pesciaroli C., Barghini P., Pasqualetti M., Fenice M. Structure and diversity of the bacterial community of an Arctic estuarine system (Kandalaksha Bay) subject to intense tidal currents // J. Mar. Syst. 2019a. V. 196. P. 77–85.
- Gorrasi S., Pesciaroli C., Barghini P., Pasqualetti M., Giovannini V., Massimiliano F. Metagenetic profiling of the bacterial communities of an intertidal pool in Kandalaksha Bay (White Sea, Russia) // J. Environ. Prot. Ecol. 2019b. V. 20. P. 1317–1324.
- Hollants J., Leliaert F., De Clerck O., Willems A. What we can learn from sushi: a review on seaweed–bacterial associations // FEMS Microbiol. Ecol. 2013. V. 83. P. 1–16.
- Hsieh Y.S.Y., Harris P.J. Xylans of red and green algae: what is known about their structures and how they are synthesised? // Polymers. 2019. V. 11. Art. 354.
- Huggett M.J., Williamson J.E., De Nys R., Kjelleberg S., Steinberg P.D. Larval settlement of the common Australian sea urchin *Heliocidaris erythrogramma* in response to bacteria from the surface of coralline algae // Oecologia. 2006. V. 149. P. 604–619.
- Iriki Y., Suzuki T., Nisizawa K., Miwa T. Xylan of siphonaceous green algae // Nature. 1960. V. 87. P. 82–83.
- Johnson J., Sudheer P.D., Yang Y.H., Kim Y.G., Choi K.Y. Hydrolytic activities of hydrolase enzymes from halophilic microorganisms // Biotechnol. Bioproc. Eng. 2017. V. 22. P. 450–461.
- Kim S.J., Kim J.G., Lee S.H., Park S.J., Gwak J.H., Jung M.Y., Chung W.H., Yang E.J., Park J., Jung J., Hahn Y., Cho J.C., Madsen E.L., Rodriguez-Valera F., Hyun J.H., Rhee S.K. Genomic and metatranscriptomic analyses of carbon remineralization in an Antarctic polynya // Microbiome. 2019. V. 7. P. 1–15.
- Kloreg B., Quatrano R.S. Structure of the cell walls of marine algae and ecophysiological functions of the matrix polysaccharides // Oceanography and Marine Biology: an Annual Review. 1988. V. 26. P. 259–315.
- Leliaert F., Smith D.R., Moreau H., Herron M.D., Verbruggen H., Delwiche C.F., Clerck O.D. Phylogeny and molecular evolution of the green algae // Crit. Rev. Plant Sci. 2012. V. 31. P. 1–46.
- Mandal A. Review on microbial xylanases and their applications // Int. J. Life Sci. 2015. V. 4. P. 178–187.
- Martin M., Barbeyron T., Martin R., Portetelle D., Michel G., Vandenbol M. The cultivable surface microbiota of the brown alga *Ascophyllum nodosum* is enriched in macroalgal-polysaccharide-degrading bacteria // Front. Microbiol. 2015. V. 6. Art. 1487.
- Pesciaroli C., Rodelas B., Juárez-Jiménez B., Barghini P., Fenice M. Bacterial community structure of a coastal area in Kandalaksha Bay, White Sea, Russia: possible relation to tidal hydrodynamics // Ann. Microbiol. 2015. V. 65. P. 443–453.
- Pielou E.C. The measurement of diversity in different types of biological collections // J. Theor. Biol. 1966. V. 13. P. 131–144.
- Qeshmi F.I., Homaei A., Fernandes P., Hemmati R., Dijkstra B.W., Khajeh K. Xylanases from marine microorganisms: a brief overview on scope, sources, features and potential applications // Biochim. Biophys. Acta – Proteins Proteom. 2020. V. 1868. P. 140312.
- Ray S., Vigouroux J., Boudier A., Allami M.F., Geairon A., Fanuel M., Ropartz D., Helbert W., Lahaye M., Bonnin E. Functional exploration of *Pseudoalteromonas atlantica* as a source of hemicellulose-active enzymes: evidence for a GH8 xylanase with unusual mode of action // Enzyme Microb. Technol. 2019. V. 127. P. 6–16.
- Shannon C.E., Weaver W. The Mathematical Theory of Communication. University of Illinois. Urbana, 1949. V. 117.

- Shuvaeva G.P., Sysoeva M.G.* Xylanase of the micromycete *Rhizopus* var. *microsporus* 595: preparation, structural and functional characteristics, and application // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2010. V. 46. P. 641–647.
- Singh R.P., Reddy C.R.K.* Seaweed–microbial interactions: key functions of seaweed-associated bacteria // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2014. V. 88. P. 213–230.
- Sorensen T.A.* A method of establishing groups of equal amplitude in plant sociology based on similarity of species content and its application to analyses of the vegetation on Danish commons // *Biol. Skar.* 1948. V. 5. P. 1–34.
- Suleiman M., Krüger A., Antranikian G.* Biomass-degrading glycoside hydrolases of archaeal origin // *Biotechnol. Biofuels.* 2020. V. 13. P. 1–14.
- Trias R., García-Lledó A., Sánchez N., López-Jurado J.L., Hallin S., Bañeras L.* Abundance and composition of epiphytic bacterial and archaeal ammonia oxidizers of marine red and brown macroalgae // *Appl. Environ. Microbiol.* 2012. V. 78. P. 318–325.
- Umamoto Y., Shibata T., Araki T.* D-xylose isomerase from a marine bacterium, *Vibrio* sp. strain XY-214, and D-xylulose production from β -1,3-xylan // *Mar. Biotechnol.* 2012. V. 14. P. 10–20.
- Vortsepneva E., Chevaldonné P., Klyukina A., Naduvaeva E., Todt C., Zhadan A., Tzetlin A., Kublanov I.* Microbial associations of shallow-water Mediterranean marine cave *Solenogastres* (Mollusca) // *PeerJ.* 2021. V. 9. P. e12655.
- Xing P., Hahnke R.L., Unfried F., Markert S., Huang S., Barbeyron T., Harder J., Becher D., Schweder T., Glöckner F.O., Amann R.I., Teeling H.* Niches of two polysaccharide-degrading *Polaribacter* isolates from the North Sea during a spring diatom bloom // *ISME J.* 2015. V. 9. P. 1410–1422.
- Yoon H.S., Nelson W., Lindtrom S.C., Boo S.M., Poeschel C., Qiu H., Bhattacharya D.* *Rhodophyta* // *Handbook of the Protists* / Eds. Archibald J.M., Simpson A.G.B., Slamovits C.H. Cham: Springer, 2017a. P. 89–133.
- Yoon K., Song J.Y., Kwak M.J., Kwon S.K., Kim J.F.* Genome characteristics of the proteorhodopsin-containing marine flavobacterium *Polaribacter dokdonensis* DSW-5 // *J. Microbiol.* 2017b. V. 55. P. 561–567.
- Yu W.N., Du Z.Z., Chang Y.Q., Mu D.S., Du Z.J.* *Marinomonas agarivorans* sp. nov., an agar-degrading marine bacterium isolated from red algae // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2020. V. 70. P. 100–104.

Microbial Communities Associated with the White Sea Red Algae as a Source of Xylanolytic Microorganisms

V. D. Salova¹*, A. M. Kholdina¹, A. D. Mel'nik¹, K. S. Zayulina², A. G. El'cheninov²,
A. A. Klyukina², and I. V. Kublanov^{1, 2}

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

²Winogradsky Institute of Microbiology, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

*e-mail: salovavd@gmail.com

Received December 27, 2022; revised January 19, 2023; accepted January 19, 2023

Abstract—Microorganisms associated with algae and able to utilize complex substrates (e.g., plant heteropolysaccharides) may be important producers of hydrolytic enzymes. The microbial communities of the red algae *Corallina* sp. and *Phyllophora* sp. sampled in the Kandalaksha Gulf basin of the White Sea were analyzed using high-throughput sequencing of the V4-variable region of the 16S rRNA gene. The dominant phyla in microbiomes of both samples were *Pseudomonadota* and *Bacteroidota* (GTDB classification, <https://gtdb.ecogenomic.org/>). For the *Corallina* sp. sample, dominance of the *Vibrio*, *Agarivorans*, and *Photobacterium* genera was shown, while *Granulosicoccus* and *Aliivibrio* dominated in the *Phyllophora* sp. sample. The analyzed red macroalgae with associated microbiota were used as an inocula to obtain microbial enrichment cultures growing on β -1,4-xylan or β -1,3-glucan (curdlan). It was shown that, similar to environmental samples *Pseudomonadota* and *Bacteroidota* phyla representatives were prevalent in all enrichment cultures. However, unlike the environmental samples, in the enrichment cultures the dominant genera were *Marinomonas*, *Reinekea*, *Polaribacter*, and *Pseudoalteromonas*. The latter, as well as the representatives of *Vibrio* sp., were isolated in pure cultures for which the xylanolytic activity was shown.

Keywords: White Sea, red algae, microbial diversity, high-throughput sequencing, 16S rRNA gene, xylanolytic microorganisms

БИОДЕСТРУКЦИЯ ЭФИРОВ ФТАЛЕВОЙ КИСЛОТЫ ГРИБОМ БЕЛОЙ ГНИЛИ *PENIOPHORA LUCII*

© 2023 г. О. С. Савинова^а, А. В. Шабаев^а, Т. В. Федорова^а, *

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

*e-mail: fedorova_tv@mail.ru

Поступила в редакцию 15.12.2022 г.

После доработки 17.01.2023 г.

Принята к публикации 19.01.2023 г.

Впервые изучена способность гриба белой гнили *Peniophora lycii* LE-BIN 2142 к деструкции эфиров фталевой кислоты (ЭФК), таких как диэтилфталат (ДЭФ), дибутилфталат (ДБФ), ди(2-этилгексил)фталат (ДЭГФ), диизобутилфталат (ДиБФ) и бутилбензилфталат (ББФ). Показано, что ДЭГФ наиболее эффективно подвергался биодеструкции грибом (более 98% на 6 сут культивирования). Остаточное содержание ДБФ и ДиБФ в культуральной жидкости на 10 сут составляло 17–18%. ББФ оказался наиболее трудно деградируемым соединением – его остаточное содержание на 10 сут культивирования *P. lycii* составляло около 40%. ДЭФ был устойчив к биодеструкции и в концентрации 1.5 г/л оказывал токсическое действие: скорость радиального роста гриба на агаризованной среде снижалась в 3 раза по сравнению с контролем, а количество грибной биомассы при жидкофазном глубинном культивировании – примерно в 1.5 раза. В процессе культивирования *P. lycii* на средах с ЭФК было показано увеличение примерно в 2 раза эстеразной и значительное снижение (в 2–4 раза) оксидазной активностей по сравнению с контрольной средой без фталатов.

Ключевые слова: биодеструкция, грибы белой гнили, эфиры фталевой кислоты, *Peniophora lycii*

DOI: 10.31857/S0026365622600857, **EDN:** FWTPAT

Эфиры фталевой кислоты (ЭФК, фталаты) – токсичные соединения, широко используемые для производства различных полимеров, резин, пластмасс, красок, изделий медицинского назначения, а также продукции для личной гигиены (Weaver et al., 2020; Tran et al., 2022). Попадая в окружающую среду, они оказывают негативное влияние на микробные сообщества почвы, круговорот питательных веществ, а также наносят вред здоровью животных и человека, в частности, приводят к нарушению работы эндокринной системы (т.н. “эндокринные разрушители”) (de Souza Machado et al., 2019; Iqbal et al., 2020). Неблагоприятными последствиями этого может являться изменения фертильности сперматозоидов, нарушения работы половых органов, эндометриоз, раннее половое созревание, дисфункции нервной системы, ослабление иммунитета, аллергии, респираторные и сердечно-сосудистые заболевания и многое другое (Tran et al., 2022). Широкое распространение токсичных эндокринных разрушителей в окружающей среде повышает актуальность исследований, направленных на разработку эффективных способов их удаления из загрязненных объектов. Для удаления фталатов из окружающей среды предложены различные физико-химические (абио-

тические) способы, например, фотохимическое разрушение, фотокаталитическое озонирование, сонолитическое разрушение (под воздействием ультразвука), химическая минерализация и ряд других методов (Das et al., 2021). Однако разрушение фталатов микроорганизмами считается наиболее эффективным, экологически безопасным и экономичным процессом, чем вышеупомянутые абиотические подходы (Boll et al., 2020). При этом биоремедиация ЭФК с использованием грибов (микоремедиация), в т.ч. базидиомицетов, имеет ряд преимуществ перед бактериальной деструкцией фталатов, в первую очередь, из-за большего разнообразия протекающих ферментативных процессов и, как следствие, более выраженной способности грибов к разрушению фталатов (Akerman-Sanchez et al., 2021). Помимо ферментативных процессов значительный вклад в эффективность микоремедиации вносит биосорбция фталатов на поверхности грибного мицелия. Так, ранее сообщалось о высоких скоростях биотрансформации ЭФК, проявляющих сильную сорбцию на поверхности грибных клеток (Hofmann, Schlosser, 2016; Carstens et al., 2020).

В последнее время активно изучаются процессы биодеструкции ЭФК с использованием грибов

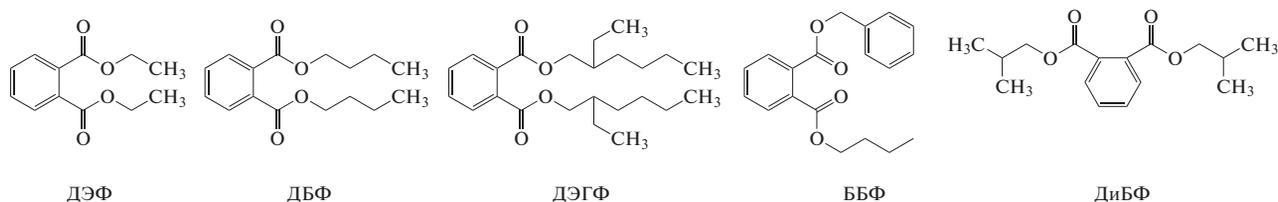


Рис. 1. Структуры соединений эфиров фталевой кислоты (ЭФК).

белой гнили, принадлежащих к различным видам, таких как *Phanerochaete chrysosporium*, *Polyporus brumalis*, *Pleurotus eryngii*, *P. djamor*, *P. ostreatus*, *Auricularia polytricha*, *Trametes versicolor* и др. (Naveen et al., 2022). Показано, что способность грибов к биодеградации ЭФК зависит от штамма, при этом за деградацию фталатов ответственны как внеклеточные, так и внутриклеточные ферменты. Комплекс секретируемых ферментов грибов белой гнили включает гидролитические и неспецифические окислительные ферменты, которые образуют так называемую лигнинолитическую ферментативную систему грибов. Данная система преимущественно представлена марганец пероксидазами, лигнин пероксидазами и лакказами, обладающими широкой субстратной специфичностью и способностью разрушать соединения со сложной химической структурой (Chang et al., 2021). Одними из таких грибов-деструкторов являются представители рода *Trametes* sp., способные разрушать различные токсичные соединения (Moiseenko et al., 2019). Однако известны и другие виды грибов белой гнили, в составе лигнинолитической ферментативной системы которых пероксидазы не обнаружены, например, представители рода *Peniophora* sp. (Brenelli et al., 2019; Ma et al., 2021; Shabaev et al., 2022). В связи с этим оценка эффективности биодеградации ЭФК грибами рода *Peniophora* представляется интересной.

Следует отметить, что внутриклеточная ферментативная система грибов включает белки семейства цитохромов P450 (гемсодержащие монооксигеназы), которые также могут играть важную роль в механизме детоксикации ЭФК (Naveen et al., 2022).

Ранее нами были исследованы несколько видов грибов белой гнили из разных экофизиологических групп и показано, что базидиомицет *Trametes hirsuta* LE-BIN 072 (первичный дереворазрушающий сапротроф) является одним из перспективных штаммом для биоремедиации ЭФК (Савинова и соавт., 2022). Основными секретируемыми белками данного гриба являются различные пероксидазы и лакказы (Shabaev et al., 2022). Также нами было обнаружено, что лигнинолитическая ферментативная система другого гриба белой гнили, *Peniophora lycii* LE-BIN 2142, характеризуется полным отсутствием пероксидаз, но при этом

включает не описанный ранее белок (FAD-binding domain-containing protein) и лакказу.

Целью исследования было оценить способность гриба белой гнили *P. lycii* LE-BIN 2142 осуществлять процесс биодеградации ЭФК и провести сравнение эффективности данного процесса для *P. lycii* LE-BIN 2142 и *T. hirsuta* LE-BIN 072. В исследовании применялись наиболее опасные соединения из класса фталатов, такие как диэтилфталат (ДЭФ), дибутилфталат (ДБФ), ди(2-этилгексил)фталат (ДЭГФ), диизобутилфталат (ДиБФ) и бензилбутилфталат (ББФ) (рис. 1), широко используемые в различных отраслях промышленности (Dutta et al., 2020).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Реактивы. В работе использовали ДЭФ, ДБФ, ДЭГФ, ДиБФ и ББФ фирмы “Sigma-Aldrich” (США). Другие материалы и растворители квалификации “х. ч.” и “ч. д. а.” были приобретены у российских производителей.

Условия культивирования. Штамм базидиомицета *P. lycii* LE-BIN 2142 получен из Коллекции культур Ботанического института им. В.Л. Комарова (Санкт-Петербург, Россия).

Для оценки роста в присутствии ЭФК и определения общей оксидазной активности грибную культуру выращивали на твердой среде следующего состава (г/л): неохмеленный солодовый экстракт Maltax 10 (“OY Maltax AB”, Финляндия) – 50; агар-агар – 20; pH 6.0. В стерильную охлажденную до 40–50°C среду вносили ЭФК в концентрациях: 0.5, 1.0 и 1.5 г/л. Среды с внесенными ЭФК обрабатывали в ультразвуковой бане при 50°C в течение 5 мин. На подготовленные чашки Петри засевали мицелиальные блоки ($d = 8$ мм) гриба и инкубировали в термостате при температуре 25°C, измеряя в процессе роста диаметр мицелиального мата.

Инокулят гриба выращивали стационарно в конических колбах объемом 750 мл с фарфоровыми бусами в глюкозо-пептонной среде следующего состава (г/л): пептон – 3.0, глюкоза – 10, KH_2PO_4 – 0.6, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ – 0.4, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.5, CaCl_2 – 0.5, $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0.05, ZnSO_4 – 0.001, FeSO_4 – 0.0005, при температуре 25°C в течение

10–14 сут в зависимости от скорости роста гриба. Посевной материал измельчали с помощью бус (20 мин, 180 об./мин) до получения однородной суспензии, которую затем в объеме 10% стерильно вносили в колбы для культивирования.

Грибную культуру выращивали глубинным способом в глюкозо-пептонной среде на роторной качалке при 180 об./мин и температуре 27°C. Вырощенные грибные пеллеты отделяли фильтрованием и промывали 0.02%-м стерильным водным раствором Твин 80, после чего 10 г грибной биомассы стерильно переносили в конические колбы объемом 250 мл со 100 мл жидкой минеральной среды следующего состава (г/л): KH_2PO_4 – 0.6, K_2HPO_4 – 0.4, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.5, CaCl_2 – 0.05, MnSO_4 – 0.05, ZnSO_4 – 0.001, FeSO_4 – 0.0005, NaNO_3 – 3.0, глюкоза – 10.0, Твин 80 – 0.2. Перед внесением грибной биомассы в колбы стерильно добавляли растворы ЭФК в концентрации 1.0 г/л, инкубировали на роторной качалке при 100 об./мин и температуре 25°C. Образцы культуральной жидкости отбирали на 1, 2, 3, 6 и 10 сут инкубации и хранили при –73°C до проведения эксперимента. Грибную биомассу отделяли фильтрованием и высушивали при температуре $100 \pm 5^\circ\text{C}$ до постоянной массы.

Скорость радиального роста (u_r) рассчитывали по графику зависимости диаметра колонии от времени роста с анализом линейной регрессии. Диаметр колоний измеряли с помощью линейки с первых суток инкубации до полного покрытия поверхности чашки Петри мицелиальным матом (Suárez-Segundo et al., 2013).

Общая эстеразная активность. Оценку эстеразной активности проводили при культивировании грибов в жидкой минеральной среде, содержащей 1.0 г/л фталатов. Активность определяли с использованием спектрофотометра PerkinElmer Lambda 35 (“PerkinElmer”, США), используя *n*-нитрофенил бутират (“Sigma-Aldrich”, США) в качестве субстрата, согласно руководству (Синицын и соавт., 1995). Реакцию проводили в натрий-ацетатном буфере pH 4.5 при температуре 40°C в течение 10 мин. Для остановки реакции использовали натрий-фосфатный буфер (pH 7.3), значение оптической плотности определяли при длине волны 400 нм. Расчет эстеразной активности проводили по формуле:

$$A_{(\text{усл. ед./мл})} = 0.13\Delta A_{400}R_E,$$

где R_E – предварительное разбавление образца перед внесением в раствор субстрата;

$$\Delta A_{400} = A_{400} - A_{400(S)} - A_{400(E)},$$

$A_{400(S)}$ – контроль, в котором вместо образца использовали воду (~0.05–0.3 опт. ед.);

$A_{400(E)}$ – контроль без внесения в реакционную смесь субстрата.

Определение общей оксидазной активности.

Грибную культуру выращивали в жидкой минеральной среде, содержащей 1.0 г/л фталатов. Оксидазную активность определяли с помощью спектрофотометра Lambda 35 (“Perkin Elmer”, США) при длине волны 436 нм в 0.1 М натрий-ацетатном буфере (pH 4.5), как описано в работе (Савинова и соавт., 2022) с использованием раствора 2,2'-азино-бис-(3-этилбензтиозолин-6-сульфокислоты) диаммониевой соли (АБТС) в качестве хромогенного субстрата. За 1 условную единицу активности принимали увеличение оптической плотности в 1 мл реакционной смеси за 1 мин.

Газовая хроматография с масс-спектрометрической детекцией (ГХ-МС). Оценку скорости биодеструкции ЭФК в процессе культивирования грибной культуры проводили с использованием метода ГХ-МС, как описано ранее (Савинова и соавт., 2022). Для этого получали гексановые экстракты образцов культуральной жидкости (1 : 1; об./об.), которые анализировали методом газо-жидкостной хроматографии в двух режимах: регистрация ионных масс в полном спектре (ТИС, диапазон масс m/z 45–400) и регистрация по характерному для ЭФК основному иону (МИС, m/z = 149 – протонированный фталевый ангидрид).

Анализ проводили с использованием газового хроматографа GC-MS QP 2010 Ultra EI (“Shimadzu”, Япония), снабженного автоматическим устройством ввода пробы и квадрупольным масс-спектрометрическим детектором. Сбор данных и обработку хроматограмм проводили с помощью программного обеспечения LabSolutions GCMS-solution (“Shimadzu”, Япония). Использовали колонку MDN-5 30 м × 250 мкм × 0.25 мкм (“Supelco”, США), подвижная фаза – гелий, скорость потока элюента 1 см³/мин, деление потока 1 : 5. Объем вводимой пробы 1 мкл, температура термостата 120°C, температура инжектора 200°C. Температурный градиент: 120°C, выдержка 1 мин; с 120 до 280°C со скоростью 10°C/мин, изотерма 3 мин.

Все измерения проводили в 3-х независимых повторностях. Результаты представлены в виде среднего значения ± стандартное отклонение. При статистической обработке данных использовали метод дисперсионного анализа. При обнаружении достоверного значения ($p < 0.05$) F-статистики, различия между индивидуальными средними оценивали с использованием теста множественного сравнения Тьюки ($p \leq 0.05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние различных концентраций ЭФК в агаризованной среде на рост *P. luscii*. Известно, что исходная концентрация ЭФК в окружающей среде влияет на способность микроорганизмов к биодegradации фталатов (Suárez-Segundo et al., 2013; González-

Таблица 1. Скорость радиального роста (u_r , мм/сут) гриба белой гнили *P. lycii* на агаризованной среде с разным содержанием ЭФК

Концентрация ЭФК, г/л	ДЭФ	ДБФ	ДЭГФ	ДиБФ	ББФ
0 (контроль)	5.85 ± 0.25	5.85 ± 0.25	5.85 ± 0.25	5.85 ± 0.25	5.85 ± 0.25
0.5	5.92 ± 0.23	4.68 ± 0.19	4.46 ± 0.29	3.97 ± 0.32	4.16 ± 0.27
1.0	2.88 ± 0.12	4.50 ± 0.18	6.01 ± 0.33	3.82 ± 0.36	4.42 ± 0.24
1.5	1.46 ± 0.06	4.33 ± 0.19	6.29 ± 0.31	3.80 ± 0.28	3.95 ± 0.21

Márquez et al., 2015). Экстремальные концентрации загрязняющих веществ трудно поддаются деструкции большинством организмов, поэтому было проведено исследование влияния разных концентраций фталатов на ростовые характеристики штамма *P. lycii* LE-BIN 2142. В табл. 1 представлены скорости радиального роста грибной культуры на средах с ДЭФ, ДБФ, ДЭГФ, ДиБФ и ББФ в диапазоне концентраций от 0.5 до 1.5 г/л.

Показано, что с увеличением концентраций большинства ЭФК в среде культивирования наблюдалось замедление скорости роста *P. lycii*. Наибольшее ингибирование роста гриба отмечено на среде с ДЭФ: при концентрации 1.5 г/л скорость роста *P. lycii* снижалась в 4 раза по сравнению с контролем (табл. 1), тогда как увеличение содержания в ростовой среде ДБФ, ДиБФ и ББФ до 1.5 г/л приводило к незначительному снижению скорости роста. Иная картина наблюдалась при росте *P. lycii* на среде с ДЭГФ: скорость роста гриба в присутствии 0.5 г/л ЭФК несколько снижалась по сравнению с ростом на среде без ЭФК. При дальнейшем увеличении концентрации ДЭГФ до 1.0 и 1.5 г/л, напротив, показано увеличение радиальной скорости роста гриба по отношению к контрольной среде. Увеличение скорости роста при повышении содержания ДЭГФ в средах было также отмечено для других видов грибов белой гнили, таких как *Agrocybe praecox*, *Trametes hirsuta*, *Pleurotus pulmonarius*, *P. ostreatus* и *Lentinula edodes* (Suárez-Segundo et al., 2013; González-Márquez et al., 2015; Савинова и соавт., 2022). Выдвинуто предположение, что грибы могут использовать фталаты в качестве источника углерода и энергии для своего роста и развития.

Влияние ЭФК на рост *P. lycii* при жидкофазном глубинном культивировании в минеральной среде с глюкозой. На следующем этапе исследовали способность гриба *P. lycii* к биодеструкции фталатов в жидких средах с глюкозой в присутствии фталатов в концентрации 1 г/л. Как было показано выше, данная концентрация не приводила к значительному ингибированию роста гриба. Увеличение биомассы *P. lycii* наблюдалось в течение 10 сут культивирования как на контрольной среде, так и на средах с ЭФК, однако динамика накопления биомассы различалась (рис. 2). Наименьший прирост биомас-

сы был отмечен на среде с ДЭФ: количество биомассы в конце культивирования было в 1.4 раза ниже максимального количества на контрольной среде. На средах с ДБФ, ДЭГФ, ДиБФ и ББФ количество биомассы на 10 сут культивирования составляло около 0.6 г, что соответствовало максимальному значению на контрольной среде на 6 сут роста гриба. Таким образом, в присутствии всех ЭФК наблюдалось замедление прироста биомассы *P. lycii*, по сравнению с контрольной средой. Причем на среде с ДЭФ биомасса увеличивалась к 3 сут, далее практически не менялась, что согласуется с результатами по ингибированию роста гриба на агаризованной среде с ДЭФ. В присутствии других ЭФК рост биомассы *P. lycii* продолжался в течение всего периода культивирования, и на 10 сут количество биомассы достигало максимальных контрольных значений на 6 сут. Причем в конце культивирования (на 10 сут) на контрольной среде наблюдался лизис грибной культуры.

Ранее мы показали, что у гриба *T. hirsuta* в присутствии 1 г/л ДЭФ в аналогичной ростовой среде прирост биомассы не наблюдался в течение всего периода культивирования (10 сут) (Савинова и соавт., 2022), в отличие от гриба *P. lycii*, у которого на 3 сут биомасса увеличивалась в 2 раза и далее до конца культивирования не менялась. В присутствии ДБФ в такой же концентрации биомасса *T. hirsuta* увеличивалась примерно в 1.5 раза к концу периода культивирования, а биомасса *P. lycii* – в 2.3 раза. Аналогичная тенденция наблюдалась и для ДиБФ – прирост биомассы выше у *P. lycii* (увеличивался в 2.5 раза) по сравнению с *T. hirsuta* (в 1.8 раз). Что касается ДЭГФ и ББФ, то здесь у обоих грибов биомасса увеличивалась одинаково (примерно вдвое) к концу культивирования на 10 сут.

Влияние ЭФК на pH и активность секретируемых ферментов при глубинном жидкофазном культивировании *P. lycii* в минеральной среде с глюкозой. Известно, что на начальной стадии ключевыми ферментами, участвующими в деградации ЭФК, являются эстеразы (Chang et al., 2021). Они осуществляют гидролитическое расщепление сложноэфирной связи между боковыми алкильными цепями и ароматическим кольцом ЭФК с образо-

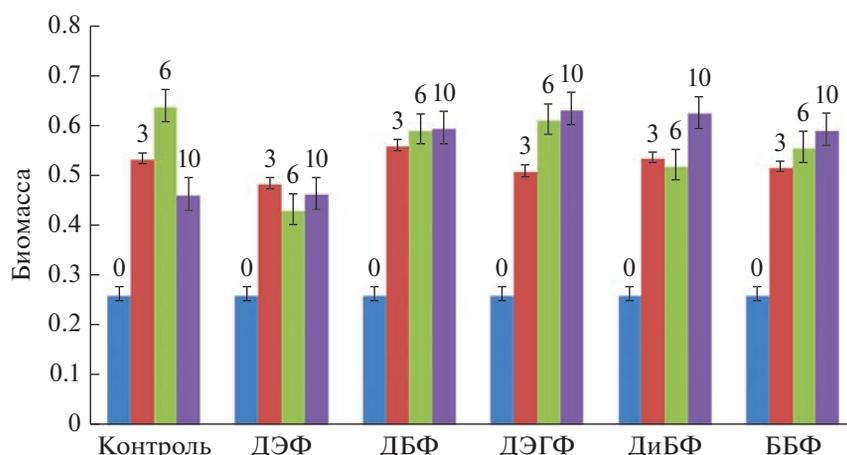


Рис. 2. Диаграмма накопления биомассы по весу абсолютно сухой биомассы (г АСВ/л) при росте гриба *Peniophora lycii* в средах с ЭФК (1 г/л): К – контрольная среда без добавления ЭФК; 0 – количество внесенной грибной биомассы в расчете на АСВ мицелия в начале культивирования; 3, 6 и 10 – грибная биомасса на 3, 6 и 10 сут культивирования соответственно.

ванием спиртов и моноэфиров. Затем происходит гидролиз последних до фталевой кислоты, после чего бензольное кольцо фталевой кислоты может расщепляться с образованием различных метаболитов. На данной стадии в биодеструкцию могут быть вовлечены такие ферменты, как декарбоксилазы, оксигеназы, оксидазы/дегидрогеназы и др. (Gao, Wen, 2016; Ahmadi et al., 2017; Tang et al., 2017; Ahuactzin-Perez et al., 2018).

В ходе жидкофазного культивирования гриба *P. lycii* в средах с ЭФК, за исключением ДЭФ, наблюдалось постепенное снижение pH (рис. 3а). Наибольшее закисление среды отмечено в среде с ДЭГФ (pH в конце культивирования около 3.5), в средах с ДБФ, ДиБФ и ББФ – pH около 4.0 (рис. 3а). При этом в среде с ДЭФ значение pH культуральной жидкости в первые 3 сут культивирования несколько повышалось (с 5.0 до 5.5); на 6 сут снова снижалось (до 5.0) и далее до конца культивирования не менялось. При этом оксидазная активность в образцах с ДЭФ практически не детектировалась, в то время как эстеразная активность в первые сутки культивирования вырастала до значения 0.1 ед./мл и до конца культивирования оставалась на данном уровне, что превышало контрольные значения эстеразной активности в 2.5 раза (рис. 3б). Самая высокая эстеразная активность детектировалась в средах с ДиБФ и ДЭГФ, пик активности которых приходился на 2 и 3 сут культивирования соответственно, достигая значения около 0.12 ед./мл, после чего активность снижалась. Аналогичная динамика изменения эстеразной активности была в средах с ББФ и ДБФ, с пиками активности на 1 и 3 сут (рис. 3б). Следует отметить, что в целом эстеразная активность штамма возрастала в средах с ЭФК (особен-

но в начале культивирования), а оксидазная активность, наоборот, снижалась (рис. 3в).

Таким образом, для гриба *P. lycii* во всех средах (за исключением ДЭФ) сохранялась общая тенденция к снижению значений pH в процессе культивирования до 3.5–4.0. Этот результат коррелирует с существенным падением эстеразной активности к 10 сут культивирования. Известно, что гидролиз ЭФК в щелочной среде проходит более интенсивно, чем в кислой. Ранее мы показали (Савинова и соавт., 2022), что гриб белой гнили *T. hirsuta* в динамике роста в средах с ЭФК закисляет среду до значений pH 4.3–4.5; при этом отмечается сильная (в 7–8 раз) индукция оксидазной активности по сравнению с контролем (за исключением среды с ДЭГФ), в отличие от *P. lycii*, чья окислительная активность в присутствии фталатов падает. Такое различие в профилях ферментативных активностей говорит о реализации разных механизмов деструкции ЭФК у двух грибов белой гнили *P. lycii* и *T. hirsuta*.

Эффективность биодеструкции ЭФК грибом *P. lycii* при жидкофазном глубинном культивировании в минеральной среде с глюкозой. Анализ экстрактов культуральной жидкости *P. lycii* методом ГХ-МС показал, что ДЭФ в концентрации 1 г/л практически не подвергался биодеструкции грибом – остаточное количество данного фталата на 10 сут культивирования составляло ~92–95%. Полученные данные коррелируют со значительным снижением скорости роста *P. lycii* на агаризованной среде и накоплением биомассы в жидкой среде с ДЭФ в концентрации 1 г/л. Существенного убывания ДЭФ во времени не было зафиксировано и при культивировании гриба *T. hirsuta* (Савинова и соавт., 2022). Похожие результаты были получены в работе (Hwang et al., 2008), в которой грибы

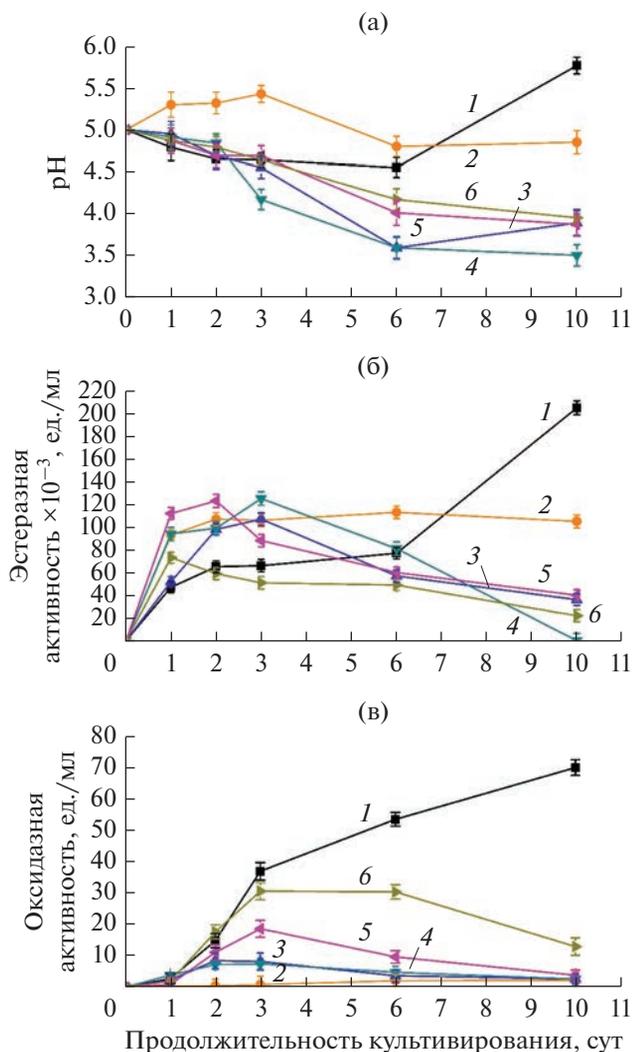


Рис. 3. Динамика pH (а), оксидазной (б) и эстеразной (в) активностей в процессе жидкофазного культивирования гриба белой гнили *Peniophora lycii* в контрольной среде и средах с добавлением ЭФК (1 г/л). 1 – контрольная среда; 2 – среда с ДЭФ; 3 – с ДБФ; 4 – с ДЭГФ; 5 – с ДиБФ; 6 – с ББФ.

белой гнили *P. ostreatus* и *T. versicolor* менее эффективно деградировали ДЭФ, по сравнению с диметилфталатом и ББФ. Наиболее трудно деградируемым и токсичным для грибов белой гнили, очевидно, является ДЭФ, что подтверждается известными значениями токсичности использованных ЭФК: токсичность убывает в ряду ДЭФ > ДБФ > ДЭГФ (Шкаева и соавт., 2019).

Динамика деструкции ДБФ, ДЭГФ, ДиБФ и ББФ грибом *P. lycii* представлена в табл. 2. Показано, что наиболее эффективно гриб *P. lycii* разрушает ДЭФГ (более 99% на 10 сут), а наименее эффективно – ББФ (около 60% на 10 сут). Эффективность биодеструкции ДБФ и ДиБФ была сопоставима и составляла около 80% на 10 сут

культивирования. Как показали наши предыдущие исследования, эффективность деструкции данных ЭФК грибом *T. hirsuta* была выше, чем при использовании *P. lycii*, особенно в отношении ББФ (табл. 2). При этом скорости деструкции ДБФ и ДЭГФ этими двумя грибами сопоставимы. Показано, что в процессе деструкции ЭФК грибом *P. lycii* участвуют преимущественно гидролитические ферменты (эстеразы, липазы), а грибом *T. hirsuta* – окислительные ферменты (марганец пероксидазы, лигнин пероксидаза и лакказы) (Savinova et al., 2022). Очевидно, что профиль метаболитов у разных грибов должен различаться. Примечательно, что при примерно равной скорости деструкции ДБФ прирост биомассы на 10 сут культивирования у гриба *P. lycii* был выше, чем у *T. hirsuta* (биомасса увеличивается в 2.3 и 1.5 раза соответственно). Схожая картина наблюдалась в присутствии ДиБФ и ББФ. Прирост биомассы у *P. lycii* был выше в присутствии ДиБФ и ББФ по сравнению с *T. hirsuta*, а скорость деструкции фталатов грибами *P. lycii* и *T. hirsuta* ниже – 80 и 95% на 10 сут в среде с ДиБФ, около 60 и почти 100% в среде с ББФ соответственно (табл. 2).

По нашим данным, деструкция ЭФК при участии окислительных лигнолитических ферментов протекает более эффективно, чем при наличии ферментов преимущественно гидролитического действия. Однако образующиеся в результате окислительных реакций метаболиты могут оказаться более токсичными как для окружающей среды, так и для самих грибов. Например, в культуральной жидкости гриба *T. hirsuta*, выращенного в присутствии ДБФ и ДЭГФ, обнаружен 2,6-дитретбутил-4-метилфенол (ионол), отсутствующий в контрольных образцах (Савинова и соавт., 2022). Ионол часто встречается в качестве вторичного метаболита, продуцируемого различными группами организмов, в частности, грибами, однако является аутоксичным (Zhao et al., 2020). Предположительно, индукция биосинтеза ионола грибами является своеобразной защитной реакцией от свободных радикалов, образующихся в результате ферментативного окисления ЭФК. Однако, ввиду своей аутоксичности, накопление ионола в ходе биотрансформации фталатов *T. hirsuta* может приводить к торможению роста гриба.

Таким образом, эффективность биодеструкции ЭФК с помощью грибов разных экофизиологических групп может сильно варьировать, что обусловлено существенными различиями в составе и композиции их секреторируемых и внутриклеточных мультиферментных комплексов. Полученные результаты могут быть использованы для установления механизмов биоразложения ЭФК различными грибами белой гнили. Также результаты могут быть приняты во внимание при отборе

Таблица 2. Динамика биодеградации ЭФК (1 г/л) грибами белой гнили *Peniophora lycii* (Pl) и *Trametes hirsuta* (Th) в процессе жидкофазного глубинного культивирования

Время, сут	Остаточное количество ЭФК*, %							
	ДБФ		ДЭГФ		ББФ		ДиБФ	
	Pl	Th**	Pl	Th**	Pl	Th**	Pl	Th**
3	53.3 ± 1.8	34.0 ± 2.0	22.3 ± 1.5	60.8 ± 1.9	89.2 ± 2.3	1.3 ± 0.3	60.0 ± 1.8	19.0 ± 1.2
6	19.8 ± 1.3	21.7 ± 0.6	2.0 ± 0.6	7.4 ± 0.2	65.5 ± 1.7	0.2 ± 0.05	38.8 ± 1.5	8.0 ± 0.6
10	17.8 ± 0.9	11.8 ± 1.2	1.0 ± 0.5	0.8 ± 0.5	40.5 ± 1.2	0.15 ± 0.05	19.3 ± 0.8	4.8 ± 0.3

* За 100% принято содержание ЭФК в культуральной жидкости в момент внесения 10 г биомассы сырого грибного мицелия.
** Савинова и соавт., 2022; Savinova et al., 2022.

конкретных штаммов базидиальных грибов для использования с целью биоремедиации.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант РНФ № 21-14-00306.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Савинова О.С., Шабаяев А.В., Глазунова О.А., Еремин С.А., Федорова Т.В. Биодеструкция эфиров фталевой кислоты грибами белой гнили // Прикл. биохимия и микробиология. 2022. Т. 58. С. 484–499.
- Savinova O.S., Shabaev A.V., Glazunova O.A., Eremin S.A., Fedorova T.V. Biodestruction of phthalic acid esters by white rot fungi // Appl. Biochem. Microbiol. 2022. V. 58. P. 598–612.
<https://doi.org/10.31857/S0555109922050142>
- Синицын А.П., Гусаков А.В., Черноглазов В.М. Биоконверсия лигноцеллюлозных материалов. М.: Изд-во МГУ, 1995. 224 с.
- Шкаева И.Е., Солнцева С.А., Никулина О.С., Николаев А.И., Дулов С.А., Земляной А.В. Токсичность и опасность фталатов // Токсикологический вестник. 2019. Т. 159. № 6. С. 3–9.
- Ahmadi E., Yousefzadeh S., Ansari M., Ghaffari H.R., Azari A., Miri M., Nabizadeh A.M.R., Kakavandi B., Ahmadi P., Badi M.Y., Gholami M., Sharafi K., Karimaei M., Ghoochani M., Brahmmand M.B., Mohseni S.M., Sarkhosh M., Rezaei S., Asghar-nia H., Dehghanifard E., Jafari B., Mortezapour A., Moghaddam V.K., Mahmoudi M.M., Taghipour N. Performance, kinetic, and biodegradation pathway evaluation of anaerobic fixed film fixed bed reactor in removing phthalic acid esters from wastewater // Sci. Rep. 2017. V. 7. 41020.
<https://doi.org/10.1038/srep41020>

- Ahuactzin-Perez M., Tlecuil-Beristain S., García-Davila J., Santacruz-Juárez E., González-Pérez M., Gutiérrez-Ruiz M.C., Sánchez C. Mineralization of high concentrations of the endocrine disruptor dibutyl phthalate by *Fusarium culmorum* // 3 Biotech. 2018. V. 8. № 42. P. 1–10.
<https://doi.org/10.1007/s13205-017-1065-2>
- Akerman-Sanchez G., Rojas-Jimenez K. Fungi for the bioremediation of pharmaceutical-derived pollutants: A bioengineering approach to water treatment // Environ. Adv. 2021. V. 4. 100071.
<https://doi.org/10.1016/j.envadv.2021.100071>
- Boll M., Geiger R., Junghare M., Schink B. Microbial degradation of phthalates: biochemistry and environmental implications // Environ. Microbiol. Rep. 2020. V. 12. P. 3–15.
<https://doi.org/10.1111/1758-2229.12787>
- Brenelli L.B., Persinoti G.F., Franco Cairo J.P.L., Liberato M.V., Gonçalves T.A., Otero I.V.R., Mainardi P.H., Felby C., Sette L.D., Squina F.M. Novel redox-active enzymes for ligninolytic applications revealed from multiomics analyses of *Peniophora* sp. CBMAI 1063, a laccase hyper-producer strain // Sci. Rep. 2019. V. 9. 17564.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-53608-1>
- Carstens L., Cowan A.R., Seiwert B., Schlosser D. Biotransformation of phthalate plasticizers and bisphenol A by marine-derived, freshwater, and terrestrial fungi // Front. Microbiol. 2020. V. 11. 317.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00317>
- Chang B.V., Yang C.P., Yang C.W. Application of fungus enzymes in spent mushroom composts from edible mushroom cultivation for phthalate removal // Microorganisms. 2021. V. 9. 1989.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms9091989>
- Das M.T., Kumar S.S., Ghosh P., Shah G., Malyan S.K., Bajjar S., Thakur I.S., Singh L. Remediation strategies for mitigation of phthalate pollution: challenges and future perspectives // J. Hazard. Mater. 2021. V. 409. 124496.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124496>
- de Souza Machado A.A., Lau C.W., Kloas W., Bergmann J., Bachelier B.J., Faltin E., Becker R., Görlich A.S., Rillig M.C. Microplastics can change soil properties and affect plant performance // Environ. Sci. Technol. 2019. V. 53. P. 6044–6052.
<https://doi.org/10.1021/acs.est.9b01339>
- Dutta S., Haggerty D.K., Rappolee D.A., Ruden D.M. Phthalate exposure and long-term epigenomic consequences: a review // Front. Genet. 2020. V. 11. 405.
<https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00405>
- Gao D., Wen Z. Phthalate esters in the environment: a critical review of their occurrence, biodegradation, and removal

- during wastewater treatment processes // *Sci. Total Environ.* 2016. V. 541. P. 986–1001.
- González-Márquez A., Ahuactzin-Pérez M., Sánchez C. *Lentinula edodes* grown on di(2-ethylhexyl)phthalate-containing media: mycelial growth and enzyme activities // *BioResources*. 2015. V. 10. P. 7898–7906. <https://doi.org/10.15376/biores.10.4.7898-7906>
- Hofmann U., Schlosser D. Biochemical and physicochemical processes contributing to the removal of endocrine-disrupting chemicals and pharmaceuticals by the aquatic ascomycete *Phoma* sp. UHH 5-1-03 // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2016. V. 100. P. 2381–2399. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7113-0>
- Hwang S., Choi H.T., Song H. Biodegradation of endocrine-disrupting phthalates by *Pleurotus ostreatus* // *J. Microbiol. Biotechnol.* 2008. V. 18. P. 767–772.
- Li H., Dai Q., Yang M., Li F., Liu X., Zhou M., Qian X. Unraveling consequences of soil micro- and nano-plastic pollution on soil-plant system: implications for nitrogen (N) cycling and soil microbial activity // *Chemosphere*. 2020. V. 260. 127578. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127578>
- Ma J., Yue H., Li H., Zhang J., Zhang Y., Wang X., Gong S., Liu G. Selective delignification of poplar wood with a newly isolated white-rot basidiomycete *Peniophora incarnata* T-7 by submerged fermentation to enhance saccharification // *Biotechnol. Biofuels*. 2021. V. 14. P. 135. <https://doi.org/10.1186/s13068-021-01986-y>
- Moiseenko K.V., Glazunova O.A., Shakhova N.V., Savinova O.S., Vasina D.V., Tyazhelova T.V., Psurtseva N.V., Fedorova T.V. Fungal adaptation to the advanced stages of wood decomposition: insights from the *Steccherinum ochraceum* // *Microorganisms*. 2019. V. 7. 527. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7110527>
- Naveen K.V., Saravanakumar K., Zhang X. Anbazhagan K., Wang M. Impact of environmental phthalate on human health and their bioremediation strategies using fungal cell factory – a review // *Environ. Res.* 2022. V. 214. 113781. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.113781>
- Savinova O.S., Shabaev A.V., Glazunova O.A. et al. Benzyl butyl phthalate and diisobutyl phthalate biodegradation by white-rot fungus *Trametes hirsuta* // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2022. V. 58. Suppl. 1. P. S113–S125. <https://doi.org/10.1134/S0003683822100118>
- Shabaev A.V., Moiseenko K.V., Glazunova O.A. Savinova O.S., Fedorova T.V. Comparative analysis of *Peniophora lycii* and *Trametes hirsuta* exoproteomes demonstrates “Shades of Gray” in the concept of white-rotting fungi // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. 10322. <https://doi.org/10.3390/ijms231810322>
- Suárez-Segundo J.L., Vazquez-Lopez D., Torres-García J.L., Ahuactzin-Pérez M., Montiel-Martínez N., Tlecuil-Beristain S., Sánchez C. Growth of colonies and hyphal ultrastructure of filamentous fungi grown on dibutyl phthalate and di(2-ethylhexyl)phthalate // *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 2013. V. 12. P. 499–504.
- Tang Y., Zhang Y., Jiang L., Yang C., Rittmann B.E. Enhanced dimethyl phthalate biodegradation by accelerating phthalic acid di-oxygenation // *Biodegradation*. 2017. V. 28. P. 413–421. <https://doi.org/10.1007/s10532-017-9805-x>
- Tran H.T., Lin C., Bui H.-T., Nguyen M.K., Cao N.D.T., Mukhtar H., Hoang H.G., Varjani S., Ngo H.H., Nghiem L.D. Phthalates in the environment: characteristics, fate and transport, and advanced wastewater treatment technologies // *Bioresour. Technol.* 2022. V. 344. 126249. <https://doi.org/10.1128/jcm.02479>
- Weaver J.A., Beverly B.E.J., Keshava N. Mudipalli A., Arzuaga X., Cai C., Hoichkiss A.K., Makris S.L., Yost E.E. Hazards of diethyl phthalate (DEP) exposure: a systematic review of animal toxicology studies // *Environ. Int.* 2020. V. 145. 105848. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105848>
- Zhao F., Wang P., Lucardi R.D., Su Z., Li S. Natural sources and bioactivities of 2,4-di-tert-butylphenol and its analogs // *Toxins*. 2020. V. 12. 35. <https://doi.org/10.3390/toxins12010035>

Biodegradation of Phthalic Acid Esters by the White Rot Fungus *Peniophora lycii*

O. S. Savinova¹, A. V. Shabaev¹, and T. V. Fedorova¹ *

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

*e-mail: fedorova_tv@mail.ru

Received December 15, 2022; revised December 17, 2023; accepted December 19, 2023

Abstract—The ability of the white rot fungus *Peniophora lycii* to degrade such phthalic acid esters (PAEs) as diethyl phthalate (DEP), dibutyl phthalate (DBP), di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP), diisobutyl phthalate (DiBP), and *n*-butylbenzyl phthalate (BBP) was studied. It was shown that DEHP was most efficiently biodegraded by the fungus (over 98% on day 6 of cultivation). The residual content of DBP and DiBP in the culture liquid of the fungus at the end of cultivation (10 days) was ~17–18%. BBP turned out to be the most difficult-to-degrade compound: its residual content on day 10 of *P. lycii* cultivation was ~40%. DEP was resistant to fungal biodegradation, and exhibited a toxic effect at 1.5 g/L: the rate of radial growth of the fungus on agar decreased threefold compared to the control, and the amount of fungal biomass during liquid-phase deep cultivation decreased by about 1.5 times. During the cultivation of *P. lycii* on media with PAEs, an increase in esterase activity by about 2 times and a significant decrease (by 2–4 times) in oxidase activity was shown compared to the control medium without phthalates.

Keywords: phthalic acid esters, biodegradation, white rot fungi, *Peniophora lycii*

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИ

**БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ И СОСТАВ МЕТАБОЛИТОВ ШТАММА
STREPTOMYCES CARPATICUS K-11 RCAM04697 (SCPM-O-B-9993),
ПЕРСПЕКТИВНОГО ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В РАСТЕНИЕВОДСТВЕ**

© 2023 г. Ю. В. Батаева^а, *, Л. Н. Григорян^а, А. Г. Богун^б, А. А. Кисличкина^б, М. Е. Платонов^б,
Е. А. Курашов^с, Ю. В. Крылова^д, А. Г. Федоренко^е, М. П. Андреева^а

^аАстраханский государственный университет им В.Н. Татищева, Астрахань, 414056 Россия

^бГосударственный научный центр прикладной микробиологии
и биотехнологии Роспотребнадзора, Оболensk, 142279 Россия

^сИнститут озераведения Российской академии наук, обособленное подразделение СПб ФИЦ РАН,
Санкт-Петербург, 196105 Россия

^дСанкт-Петербургский филиал ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства
и океанографии» (ГосНИОРХ им. Л.С. Берга), Санкт-Петербург, 199004 Россия

^еЮжный федеральный университет, Ростов-на-Дону, 344006 Россия

*e-mail: aveatab@mail.ru

Поступила в редакцию 02.11.2022 г.

После доработки 28.11.2022 г.

Принята к публикации 10.01.2023 г.

Из бурой полупустынной почвы Астраханской области с очень сильной степенью засоления выделен штамм K-11, который на основании анализа последовательности гена 16S рРНК отнесен к виду *Streptomyces carpaticus* K-11 RCAM04697 (SCPM-O-B-9993). Проведено полногеномное секвенирование штамма. Изучена фитотоксичность, противовирусная, антиоксидантная, антифунгальная, инсектицидная активности штамма. Все экстракты и суспензия штамма *S. carpaticus* RCAM04697 обладали фитостимулирующей активностью. Противовирусные свойства проявлялись в сдерживании развития и распространения вирусных возбудителей в лабораторных условиях: вируса мозаики томата (ВМТо) (*Tomato mosaic virus, ToMV*) – 26.3%, вируса мозаики огурца (ВОМ) (*Cucumber mosaic virus, CMV*) – 33.8%, Y-вируса картофеля (YBK) (*Potato Ypotyvirus, PVY*) – 51.3%, X-вируса картофеля (ХВК) (*Potato Xpotyvirus, PVX*) – 41.3%. Наибольшую антиоксидантную активность проявили суспензия – 88.8% и водно-спиртовой экстракт (20 : 80) – 76.0% штамма *S. carpaticus* RCAM04697. Штамм в различной степени ингибировал рост фитопатогена *Fusarium sporotrichioides*. Инсектицидная активность в отношении *Aphis fabae* через 6 ч обработки составила 100% в вариантах с обработкой суспензией, водно-спиртовым (80 : 20, 50 : 50), метанольным и гексановым экстрактами. В составе метаболитов штамма *S. carpaticus* RCAM04697 обнаружены флавоноиды, алкалоиды, гликозиды, органические кислоты (изолимонная, уксусная, фумаровая, молочная, пировиноградная, яблочная), спирты, альдегиды, углеводороды, эфиры, серосодержащие соединения и другие группы низкомолекулярных органических соединений.

Ключевые слова: стрептомицеты, *Streptomyces*, актинобактерии, антиоксидантная активность, антифунгальная активность, противовирусная активность, метаболиты, экстракт, масс-спектрометрия

DOI: 10.31857/S0026365622600730, **EDN:** FVXVYA

Вследствие применения химических удобрений и средств защиты растений, агроценозы аридной зоны испытывают большой стресс по сравнению с природными экосистемами, что сопровождается обеднением состава биоценоза почвы, выпадением из нее ценных видов, деградацией почвенных экосистем, ухудшением качества сельскохозяйственной продукции. Поэтому в настоящее время все большее применение находят биологические удобрения и средства защиты растений на основе почвенных микроорганизмов, которые являются

экологически безопасными стимуляторами роста растений и защищают их от болезней.

Стрептомицеты широко распространены в природе и составляют основную часть актинобактерий, населяющих почву. Разнообразие стрептомицетов, их место среди прочих почвенных микроорганизмов, высокий уровень выживаемости обусловлены конкурентоспособностью и широким спектром продуцируемых метаболитов (Korkmaz et al., 2015; Grigoryan et al., 2020). Стрептомицеты продуцируют в окружающую среду вторичные экзометаболиты,

представляющие собой многокомпонентные комплексы различных по химическому строению природных соединений – антибиотиков, литических ферментов, аминокислот, терпеноидов, алкалоидов и других полезных веществ (Rezanka et al., 2004; Егорова и соавт., 2019). Такие соединения обуславливают полезные свойства стрептомицетов: фитостимулирующие (Бурцева и соавт., 2014), противовирусные (патент № 2226214), антифунгальные (Домрачева и соавт., 2022), антиоксидантные, инсектицидные (Анисимова, 2008). В подавляющем большинстве случаев многие виды стрептомицетов способны синтезировать не один, а несколько вторичных метаболитов (Cho, 2012).

Среди актинобактерий известен ряд штаммов, являющихся перспективной основой для разработки высокоэффективных биопестицидов: *S. avermitilis* ССМ 4697 – продуцент авермектинов, оказывающих токсическое действие на клещей (патент № 2156301); *S. chrysomallus* P-21 действует против грибных и вирусных фитопатогенов (патент № 2226214); *S. hygrosopicus* ssp. ЦКМ В-4561 обладает фунгицидными, бактерицидными и инсектицидными свойствами (патент № 2243259).

Основой микробиологических средств защиты растений являются высокопроизводительные штаммы, в связи с чем необходимо знание эколого-биологических особенностей и биотехнологических возможностей данных продуцентов (Поляк, Сухаревич, 2017). Кроме того, активность штаммов часто обоснована синтезом первичных и вторичных метаболитов, изучение состава которых дает основу понимания механизмов их влияния на объекты.

Цель работы – изучение физиолого-биохимических свойств, таксономического положения, молекулярно-генетических особенностей, спектра биологической активности и полезных для растений экзометаболитов штамма *Streptomyces carpaticus* K-11 RCAM04697.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования – штамм *Streptomyces carpaticus* RCAM04697, выделенный в 2013 г. из бурой полупустынной почвы с очень сильной степенью засоления (сухой остаток водной вытяжки – 2.4%) в Наримановском районе Астраханской области.

Условия культивирования. Для изучения культурально-морфологических и физиолого-биохимических свойств штамм выращивали на плотной крахмально-казеиновой среде при температуре 28°C в течение 7 сут. Культуральные свойства исследовали путем определения цвета воздушного и субстратного мицелия, цвета растворимых пигментов, которые окрашивают среду. Изучение морфологического строения репродуктивных структур штамма проводили на 14 сут роста, вырастив

культуру на среде, наиболее благоприятной для спороношения – минеральном агаре. Физиолого-биохимические признаки определяли по стандартным методикам (Методы..., 1984).

Электронно-микроскопическое исследование клеток штамма *S. carpaticus* RCAM04697. Для ультраструктурного исследования клеток штамма *S. carpaticus* RCAM04697 на 3 сут инкубации отбирали фрагменты биопленки, выращенной на крахмально-казеиновой среде, размером примерно 2 × 2 мм. Образцы фиксировали в 2.5% растворе глутарового альдегида на фосфатном буфере (pH 7.4) в течение 2 ч при комнатной температуре (22°C). После двукратной промывки фосфатным буфером с сахарозой образцы дофиксировали 2% раствором OsO₄ в течение 2 ч при комнатной температуре. После отмычки указанным выше буфером образцы обезвоживали в серии растворов этилового спирта восходящей концентрации. Перед помещением в 96% спирт образцы выдерживали в 70% спиртовом растворе уранилацетата в течение 12 ч при температуре 4°C. Затем образцы отмывали от уранилацетата и продолжали обезвоживание 100% спиртом и чистым ацетоном в три смены по 15 мин каждая. Далее образцы пропитывали смолой в серии растворов эпона в ацетоне возрастающей концентраций и заливали в чистый эпоно. Полимеризацию проводили в термостате при температуре 37°C (24 ч), 60°C (48 ч).

Ультратонкие срезы (толщиной 90–100 нм) получали на приборе EM UC26 (“Leica”, Wetzlar, Германия). Их ультраструктурный анализ проводили в электронном микроскопе Tescnai I2 (“FEI, Philips”, Чехия).

Молекулярно-генетическая идентификация штамма. Для идентификации выделенного штамма выделяли геномную ДНК, используя набор реактивов AxyPrep Multisource Genomic DNA Mini-prep Kit (“Corning”, США). Для амплификации участка гена 16S рНК (около 1500 п.н.) применяли праймеры fD1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCT-CAG-3') и rD1 (5'-CTTAAGGAGGTGATCCAG-CC-3'). ПЦР проводили в амплификаторе C1000™ Thermal Cycler (“BioRad”, США) в течение 36 циклов. Выделенную ДНК визуализировали с помощью электрофореза в 1%-ном агарозном геле с использованием маркера Lambda DNA/HindIII (“Fermentas”, США) для оценки размера фрагментов и количества ДНК. Определение нуклеотидной последовательности ПЦР-продукта проводили на генетическом анализаторе ABI 3500 × 1 (“Applied Biosystems”, США). Поиск гомологичных последовательностей проводили с помощью базы данных GenBank NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) и программы BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Для конструирования филогенетических деревьев использовали программу MEGA 6.0 и метод

Neighbor-Joining. Эволюционные расстояния рассчитаны с использованием модели Maximum Composite Likelihood. Статистическую достоверность кластеров оценивали с помощью бутстреп-анализа (1000 реплик).

Полногеномное секвенирование и аннотирование генома. Геномную ДНК выделяли фенол-хлороформным методом. Полногеномное секвенирование осуществлено на платформе Illumina MiSeq, с использованием наборов Nextera DNA Library Preparation Kit и MiSeq Reagent Kits v3. Мономолекулярное нанопоровое секвенирование ДНК осуществлено на платформе MinION, согласно рекомендациям производителя, с использованием набора для быстрого баркодирования (RBK004) и проточной ячейки MinION (R9.4.1). Программное обеспечение для проведения секвенирования – MinKNOW v18.05.5 (время – 48 ч, 180 мВ), демультиплексирование – с помощью программы Guppy v6.0.1. Гибридную сборку генома без предварительного треммирования прочтений осуществили с помощью программы Unicycler v0.4.7.

Приготовление суспензии и экстрактов штамма. Для определения биологической активности и при изучении продукции вторичных метаболитов исследуемый штамм выращивали в жидкой крахмально-казеиновой среде в течение 72 ч при 28°C и непрерывном перемешивании на шейкере (120 об./мин) (Гаузе и соавт., 1983). Суспензия исследуемого штамма представляла собой однородную жидкость светло-желтого цвета со специфическим “землистым” запахом (концентрация клеток 10⁹ КОЕ/мл).

Метанольный и водно-спиртовой экстракты готовили из сухой биомассы исследуемого штамма *S. carpaticus* RCAM04697 с титром клеток 10⁹ КОЕ/мл, полученной путем высушивания в ротационном испарителе (IKA RV 10 digital). Сухую биомассу штамма заливали метанолом или раствором дистиллированной воды и этанола (20 : 80; 50 : 50; 80 : 20) в соотношении 1 мг/мл на 40 мин. После центрифугирования, удаления осадка, высушивания жидкости в ротационном вакуумном испарителе при температуре от 60 до 70°C, досушивания в сушильном шкафу (ШС-80-01 СПУ) при температуре 37°C в течение 3 сут до постоянной массы получали сухой экстракт.

Для приготовления гексановых экстрактов 250 мл суспензии (концентрация клеток 10⁹ КОЕ/мл) штамма экстрагировали 5 мл гексана в течение 3 мин в делительной воронке. Гексановый экстракт высушивали в ротационном испарителе. Экстракты хранили в морозильной камере при температуре –18°C.

Для определения биологической активности использовали высушенную и измельченную массу сухих экстрактов, которую разводили дистиллированной водой до концентраций 1.0 и 0.5 мг/мл.

Определение фитотоксичности. Фитотоксичность суспензии и экстрактов штамма RCAM04697 исследовали методом ингибирования роста корня редиса (*Rarhanus sativus*) сорта Хелро при 20°C в течение 3 сут в двух концентрациях: 0.5 и 1.0 мг/мл.

Создание инфекционного фона для определения противовирусной активности. Искусственное заражение рассады томата проводили на стадии 3–4 настоящих листьев вирусами мозаики томата (ВМТо) и мозаики огурца (ВОМ) путем нанесения на листовые пластинки инокулюмов, полученных путем растирания пестиком инфицированных фитовирусами растений. Проростки картофеля искусственно заражали на стадии 3–4 настоящих листьев Y-вирусом картофеля (YVK) и X-вирусом картофеля (XVK). Идентифицированные изоляты вирусов (ВОМ, ВМТо, YVK, XVK) взяты из коллекции филиала ФГБУ “Россельхозцентр” по Астраханской области. Обработку растений томата и картофеля суспензией штамма *S. carpaticus* RCAM04697 с титром 10⁹ КОЕ/мл проводили двукратно методом опрыскивания через 7 сут после контаминации возбудителями вирусной инфекции. Интервал времени между обработками составил 5 сут. Контрольные растения опрыскивали водопроводной водой. На 3 сут после второго опрыскивания определяли наличие вирусов в растениях.

Иммунохроматографический метод определения вирусов растений. Присутствие вирусов в растениях томата и картофеля, обработанных суспензией штамма, определяли методом ИХА с помощью иммунострипов (ImmunoStrip Test Kit Flashkits, США), которые состоят из пластины микротитра, пропитанной щелочным ферментом, покрытой с обеих сторон антителами выявляемого возбудителя болезни, и пакета с буфером для экстракции образцов.

Метод ПЦР-диагностики определения вирусов растений. Определение вирусов в растениях проводили также методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов в режиме “реального времени” с использованием микроципового амплификатора нуклеиновых кислот “АриаДНА”. Для этого получали пробы ДНК и РНК из зеленой массы картофеля.

Определение антиоксидантной активности. Изучение антиоксидантной активности и компонентного состава метаболитов суспензии и экстрактов штамма RCAM04697 проводили с концентрацией 1.0 мг/мл. Для определения антиоксидантной активности использовали реакцию со стабильным свободным радикалом ДФПГ.

Исследование антифунгальной активности. Антифунгальные свойства суспензии штамма в лабораторных условиях исследовали с помощью метода лунок на лабораторной культуре фитопатогенного гриба *Fusarium sporotrichioides*, хранящегося в

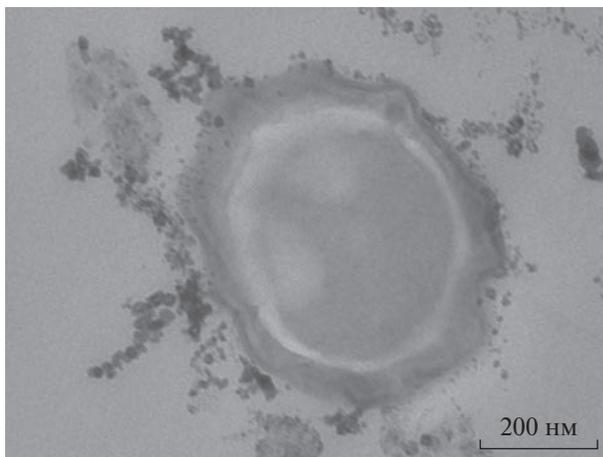


Рис. 1. Ультратонкий срез споры *S. carpaticus* RCAM04697, полученный с помощью трансмиссионного электронного микроскопа (масштабная метка – 0.2 мкм).

научной лаборатории биотехнологий АГУ им. В.Н. Татищева. В лунки помещали суспензию штамма *S. carpaticus* RCAM 04697 в концентрации 10^9 КОЕ/мл, в качестве контроля вносили дистиллированную воду. Опыт проводили в 4-х повторностях.

Исследование инсектицидной активности. Инсектицидную активность штамма в концентрации 10^9 КОЕ/мл определяли в лаборатории филиала ФГБУ “Россельхозцентр” по Астраханской области по методике, основанной на контактном взаимодействии препарата и тест-объекта – бобовой тли *Aphis fabae*. Расчет инсектоакарицидной активности осуществляли по формуле Аббота, % (при сопоставлении с контролем).

Исследование основных групп веществ методом качественных реакций. Определение флавоноидов, алкалоидов, гликозидов и сапонинов культуральной жидкости и экстрактов штамма проводили методом качественных реакций.

Определение органических кислот в водно-спиртовых экстрактах штамма *S. carpaticus* RCAM04697 проводили методом ВЭЖХ с использованием анионообменных колонок и супрессионной системы с кондуктометрическим детектированием. Для определения органических кислот использовали жидкостной хроматограф Waters – Alliance 2695 с диодно-матричным детектором Waters 2996 при длине волны 220 нм.

Определение состава низкомолекулярных органических соединений (НОС). Качественный и количественный состав НОС суспензии и гексанового, водно-спиртового (50 : 50), метанольного экстрактов штамма *S. carpaticus* RCAM04697 исследовали методом ГХ/МС на газовом хромато-масс-спектрометре Shimadzu GCMS-QP2010 UI-

tra. Использовали неполярную колонку МТХ (1.30 м × 0.25 мм × 0.25 мкм); газ-носитель – гелий. Масс-спектры снимали в режиме сканирования по полному диапазону масс (30–1090 m/z) в программном режиме температур (35°C – 3 мин, 2°C/мин до 60°C – 3 мин, 2°C/мин до 80°C – 3 мин, 4°C/мин до 120°C – 3 мин, 5°C/мин до 150°C – 3 мин, 15°C/мин до 240°C – 10 мин) с последующей пошаговой обработкой хроматограмм. Идентификацию обнаруженных НОС проводили с использованием библиотек масс-спектров “NIST-2014” и “Wiley”. Количественный анализ выполняли, используя декафторбензофенон и бензофенон в качестве внутренних стандартов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Морфолого-культуральные и физиолого-биохимические свойства

Штамм *S. carpaticus* K-11 RCAM04697 характеризуется следующими культурально-морфологическими свойствами. На крахмально-казеиновой среде колонии круглые, слабоскладчатые, с мучнистой поверхностью ($d = 4$ мм). Воздушный мицелий темно-коричневого цвета, субстратный – вишнево-красного цвета. Пигмент на среду не влияет. Пигменты, как продукты вторичного метаболизма, являются важной биохимической характеристикой актинобактерий (Гаузе и соавт., 1983). Оптимальная температура роста 28°C. Оптимальное значение pH 7.0–7.1. Спораносцы прямые или извитые, короткие. Как видно на электронных микрофотографиях, споры овальные и шаровидные с плотной оболочкой, размером 0.5–1.0 × 1.0–1.1 мкм (рис. 1).

Исследование физиолого-биохимических признаков показало, что штамм не выделяет сероводород; использует органический азот (пептон); восстанавливает нитраты в нитриты; развивается на среде с мальтозой, глюкозой, фруктозой, лактозой, сахарозой, маннитом; не растет на средах с ксилотой, арабинозой, раффинозой, ионозитом.

Штамм депонирован в ведомственной коллекции полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения (ФГБНУ “Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии”, г. Пушкин) под номером RCAM04697 и в государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур “ГКПМ-Оболенск” (ФБУН “Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии”) под номером SCPM-O-B-9993.

Для хранения штамма используется метод периодических пересевов (4–6 раз в год) на крахмально-казеиновой среде.

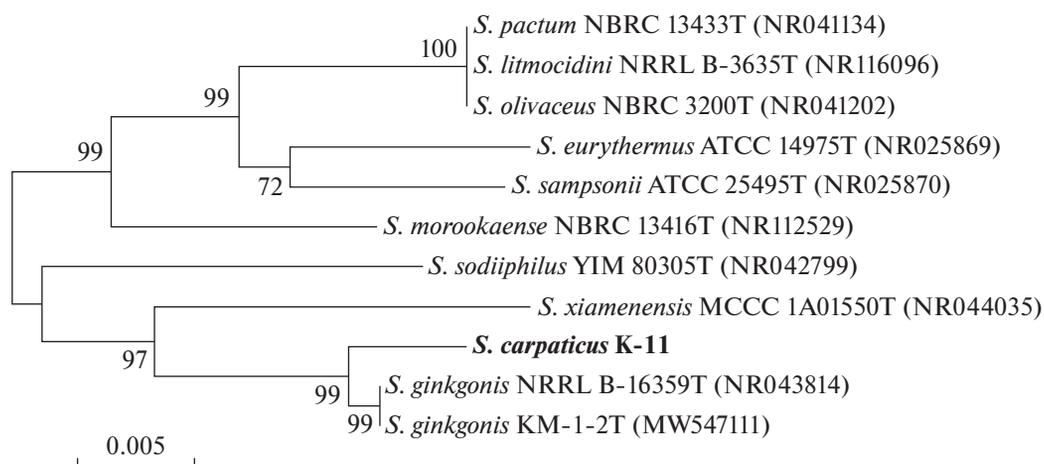


Рис. 2. *Rrs*-филограмма, отражающая таксономическое положение штамма К-11 в пределах рода *Streptomyces*. Полу-жирным шрифтом выделен изученный в данной работе штамм; литерой “Т” отмечены типовые штаммы; указаны уровни поддержки кластеров (более 30%).

Генотипическая характеристика. Анализ гена *16S rPHK*

С помощью метода секвенирования обнаружено, что фрагмент *rrs* гена штамма К-11 имеет уровень сходства 100% с аналогичным фрагментом типового штамма *Streptomyces carpaticus*, что позволяет отнести изучаемый штамм к данному виду (рис. 2).

Штамм К-11 сформировал единый кластер с типовым штаммом *S. ginkgonis* KM-1-2T при высоком уровне поддержки 99%.

Результаты полногеномного секвенирования

В результате полногеномного секвенирования на платформе Illumina MiSeq получено 916371 коротких прочтений (533 148 207 п.н.), на платформе MinION – 103 371 (24 766 704 п.н.). Впервые в базе данных NCBI GenBank задепонирована полногеномная последовательность штамма *Streptomyces carpaticus* под номером CP104005.1 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/CP104005.1>). Аннотация осуществлена в NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP) GeneMarkS-2+ (revision 6.2). Финальная сборка генома состояла из одной линейной хромосомы размером 5 968 715 п.н. (G + C) состав – 72.84%. В процессе аннотации и анализа генома было определено 5206 последовательности, кодирующие белки, 60 последовательностей тРНК, 15 – рРНК (5 – 5S, 5 – 16S, 5 – 23S) и 8 CRISPR-локусов.

Биологическая активность штамма *S. carpaticus* RCAM04697

Суспензию и экстракты штамма *S. carpaticus* RCAM04697 исследовали на биологическую ак-

тивность: фитотоксическую, антифунгальную, противовирусную, антиоксидантную и инсектицидную.

Фитотоксичность штамма. Штамм *S. carpaticus* RCAM04697 не оказал токсического действия на растения. Выявлено, что с обработкой всеми экстрактами при концентрации 0.5 мг/мл, в отличие от концентрации 1 мг/мл, наблюдалось увеличение всхожести семян редиса, что говорит о повышении ингибирующего эффекта при увеличении концентрации изучаемых образцов (табл. 1).

Наиболее высокие биометрические показатели растений, характеризующиеся длиной корня, выявлены в гексановом экстракте штамма *S. carpaticus* RCAM04697 2.67–2.82 см, превышающем контроль на 2.55 и 2.53 см – 2.38 и 2.40 см, и водно-спиртовом экстракте 80 : 20 в концентрации 0.5 мг/мл – 2.44 см, превышающем контроль на 2.15–2.17 см. Проявление высокой фитостимулирующей активности у гексановых экстрактов может быть связано с присутствием соединений стероидной природы, которые обладают высокой биологической активностью. В основном в литературе встречаются сведения о защитных свойствах стрептомицетов, используемых для борьбы с фитопатогенами (Pacios-Michelena et al., 2021). Но стрептомицеты также играют важнейшую роль в создании почвенного плодородия и оптимизации условий произрастания растений, что проявляется в стимуляции их роста, развития и увеличении урожайности в 2–2.5 раза (Бурцева и соавт., 2014; Чулуун и соавт., 2014; Pylro et al., 2019).

Противовирусная активность. После искусственного заражения растений вирусами и опрыскивания суспензией штамма определяли количество бессимптомных растений. Обнаружено, что суспензия исследуемого штамма проявляет про-

Таблица 1. Влияние штамма *S. carpaticus* RCAM04697 на биометрические характеристики редиса

Вариант	Средняя всхожесть, %		Средняя длина корня, см	
	0.5	1.0	0.5	1.0
Концентрация, мг/мл				
Гексановый экстракт	90.1 ± 1.21	87.5 ± 0.25	2.82 ± 0.22	2.67 ± 1.21
Метанольный экстракт	59.2 ± 0.20	57.0 ± 0.11	0.41 ± 1.14	0.31 ± 0.14
Водно-спиртовой экстракт (20 : 80)	75.7 ± 0.61	70.8 ± 0.34	1.85 ± 0.23	0.33 ± 0.62
Водно-спиртовой экстракт (50 : 50)	74.1 ± 2.30	73.8 ± 1.31	1.39 ± 0.25	1.15 ± 0.85
Водно-спиртовой экстракт (80 : 20)	86.6 ± 2.11	84.1 ± 1.21	2.44 ± 0.36	0.98 ± 0.92
Культуральная жидкость	75.5 ± 1.54		1.78 ± 1.14	
Контроль № 1	42.1 ± 0.22		0.27 ± 1.32	
Контроль № 2	44.4 ± 1.63		0.29 ± 2.10	

Таблица 2. Противовирусная активность суспензии штамма *S. carpaticus* RCAM04697 в лабораторных условиях

Вариант эксперимента	Количество инокулированных растений, шт.	Количество растений без симптомов	
		шт.	%
Томаты			
Контроль при инокуляции ВОМ	80	2	2.5
Контроль при инокуляции ВМТо	80	4	5.0
<i>S. carpaticus</i> RCAM04697			
Бактеризация суспензией штамма растений после инокуляции ВОМ	80	32	40.0
Бактеризация суспензией штамма растений после инокуляции ВМТо	80	26	32.5
Картофель			
Контроль при инокуляции УВК	80	3	3.8
Контроль при инокуляции ХВК	80	2	2.5
<i>S. carpaticus</i> RCAM04697			
Бактеризация суспензией штамма растений после инокуляции УВК	80	41	51.3
Бактеризация суспензией штамма растений после инокуляции ХВК	80	33	41.3

тивовирусную активность в отношении ВОМ, ВМТо, УВК и ХВК (табл. 2).

При бактерилизации томатов, зараженных ВОМ, суспензией штамма количество бессимптомных растений составило 40.0%, зараженных ВМТо – 32.5%, в то время как в контроле это количество было 2.5 и 5.0% соответственно. Изучение противовирусной активности штамма на картофеле методами иммунострипов и ПЦР-диагностики показало количество бессимптомных растений, зараженных УВК – 51.3%, зараженных ХВК – 41.3%. В литературе редко встречается информация о проявлении активности микроорганизмов в отношении вирусов растений. Известен штамм *Streptomyces chrysomallus* P-21 с фиторегуляторной активностью, который проявлял свойства против вируса мозаики ковра на ячмене (патент № 2226214).

Таким образом, лабораторные опыты по изучению противовирусных свойств исследуемого

штамма свидетельствует о подавлении развития вирусных патогенов ВОМ, ВМТо, УВК, ХВК.

Антиоксидантная, антифунгальная, инсектицидная активности. Антиоксиданты – вещества, которые задерживают, предотвращают или ингибируют окислительное повреждение молекул. Физиологическая роль антиоксидантов заключается в предотвращении повреждения клеточных компонентов в результате химических реакций, в которых участвуют свободные радикалы. Суспензия и экстракты штамма обладали антиоксидантной активностью, которая варьировала от 35.2% (водно-спиртовой экстракт 80 : 20) до 88.8% (суспензия штамма *S. carpaticus* RCAM04697), что существенно выше контроля (аскорбиновой кислоты) – 12.5%. Наибольшую антиоксидантную активность проявила суспензия штамма *S. carpaticus* RCAM04697 – 88.8%. Среди трех разных вариантов водно-спиртовых экстрактов достаточно высокий процент отме-

Таблица 3. Биологическая активность штамма *S. carpaticus* RCAM04697

Вариант опыта	Антифунгальная активность, ДЗЗР* <i>F. sporotrichioides</i> , мм	Инсектицидная активность, % относ. <i>A. fabae</i> через 6 ч обработки	Антиоксидантная активность, %
Гексановый экстракт	25.3 ± 1.24	100.0	37.2 ± 0.15
Метанольный экстракт	17.4 ± 3.20	100.0	56.1 ± 0.18
Водно-спиртовой экстракт (20 : 80)	28.1 ± 0.23	72.5	76.0 ± 0.08
Водно-спиртовой экстракт (50 : 50)	17.5 ± 1.12	100.0	63.5 ± 0.05
Водно-спиртовой экстракт (80 : 20)	14.2 ± 2.14	100.0	35.2 ± 0.12
Суспензия	31.4 ± 1.11	100.0	88.8 ± 0.09
Контроль	0	0	12.5 ± 0.07

* ДЗЗР – диаметр зоны задержки роста микромицета.

чен в модификации 20 : 80 штамма *S. carpaticus* RCAM04697 – 76.0%.

Суспензия и все экстракты штамма *S. carpaticus* RCAM04697 в различной степени ингибировали рост фитопатогенного гриба *F. sporotrichioides*. Наибольшее антагонистическое действие оказала суспензия и водно-спиртовой экстракт (20 : 80) с ДЗЗР гриба 31.4 и 28.1 мм соответственно (табл. 3). Микроскопирование показало лизис мицелия. Стрептомицеты широко известны своей антифунгальной активностью, например, против листовой и стеблевой ржавчины пшеницы, листовой ржавчины и септориоза ячменя, корневой гнили овса и др. (Широких и соавт., 2020). Присутствие у стрептомицетов первичных метаболитов – хитиназ, определяет ингибирование ими роста грибов путем разрушения клеточной стенки. Увеличение количества клеток, снижение разнообразия почвенного прокариотического комплекса с одновременным снижением количества грибов связано с развитием селективной группы гидролитического комплекса хитин-деградирующих микроорганизмов (Manucharova et al., 2016).

Инсектицидная активность в отношении бобовой тли *A. fabae* через 6 ч обработки составила 100% в вариантах: суспензия, водно-спиртовой (80 : 20, 50 : 50), метанольный и гексановый экстракты. Полученные данные свидетельствуют о том, что штамм *S. carpaticus* RCAM04697 способен к синтезу метаболитов с инсектицидной активностью (Григорян и соавт., 2020).

Таким образом, исследование показало, что суспензия и экстракты штамма *S. carpaticus* RCAM04697 обладали выраженной антиоксидантной, антифунгальной, инсектицидной активностью, ингибировали развитие фитопатогенного гриба *F. sporotrichioides* и бобовой тли *A. fabae*.

Компонентный состав вторичных метаболитов штамма

В экстрактах и суспензии штамма *S. carpaticus* RCAM04697 исследовали присутствие гликозидов, сапонинов, алкалоидов, флавоноидов. В составе метаболитов обнаружены флавоноиды, алкалоиды и гликозиды. Наличие флавоноидов установлено во всех исследуемых образцах, за исключением гексанового экстракта. Флавоноиды являются эффективными противомикробными агентами против широкого спектра микроорганизмов: бактерий, грибов, водорослей, а также обладают антиоксидантными свойствами (Karak, 2019). Алкалоиды присутствовали в гексановом и водно-спиртовом (20 : 80) экстрактах. Алкалоиды представляют собой большую и структурно разнообразную группу соединений, которые известны своей способностью усиливать действие антибиотиков. Изучено влияние алкалоидов на системы регуляции генов вирулентности. Например, синтетический изохинолиновый алкалоид вирстатин ингибировал регулятор транскрипции ToxT у *Vibrio cholerae*, предотвращая экспрессию холерного токсина и фимбрий и обеспечивая *in vivo* защиту от кишечной колонизации (Cushnie et al., 2014). Гликозиды выявлены во всех изучаемых пробах, за исключением гексанового и метанольного экстрактов штамма. Гликозиды характеризуются высокой фунгицидной и ростстимулирующей активностью (Толкачева и соавт., 2014). Результаты качественных реакций свидетельствуют об отсутствии сапонинов во всех исследуемых образцах.

Методом ВЭЖХ обнаружено наличие шести органических кислот в водно-спиртовых экстрактах штамма (табл. 4). Уксусная и фумаровая кислоты выявлены во всех экстрактах. Уксусная кислота в наибольшем количестве содержалась в водно-спиртовом экстракте (50 : 50) – 21.277 г/л. Широко известны антибактериальные, антифунгальные и противовирусные свойства уксусной кислоты (Zinn, Vockmühl, 2020). Фумаровая кис-

Таблица 4. Органические кислоты водно-спиртовых экстрактов штамма *S. carpaticus* RCAM04697

Тривиальное название	Название по ИЮПАК	Содержание, г/л		
		20 : 80	80 : 20	50 : 50
Изолимонная кислота	1-Гидрокси-1,2,3-пропантрикарбоновая кислота	–	0.484	–
Уксусная кислота	Этановая кислота	20.395	19.443	21.277
Фумаровая кислота	<i>Транс</i> -бутендиовая кислота	0.004	0.004	0.004
Молочная кислота	2-Гидроксипропановая кислота	0.270	–	–
Пировиноградная кислота	2-Оксопропановая кислота	–	0.082	–
Яблочная кислота	2-Гидроксипропановая кислота	0.063	–	0.009

лота обнаружена в концентрации 0.004 г/л во всех экстрактах. Она обладает антиоксидантным и бактериостатическим эффектом. Обработка пищевой продукции фумаровой кислотой приводила к снижению общего количества мезофильных и психротрофных бактерий, бактерий, продуцирующих H₂S, и *Pseudomonas* spp. (Remya et al., 2022). Изолимонная кислота с содержанием 0.484 г/л обнаружена в водно-спиртовом экстракте (80 : 20), в котором также установлено присутствие пировиноградной кислоты (0.082 г/л). Молочная кислота, известная противомикробными свойствами, зафиксирована в водно-спиртовом экстракте (20 : 80) в количестве 0.270 г/л. Яблочная кислота присутствовала в двух образцах: водно-спиртовой экстракт (20 : 80) с содержанием 0.063 г/л и водно-спиртовой экстракт (50 : 50) с содержанием 0.009 г/л. Обнаруженные органические кислоты обладают мощными антиоксидантными и противомикробными свойствами (Рыжкова и соавт., 2018).

ГХ/МС-анализ показал наличие в составе вторичных метаболитов – спиртов, альдегидов, углеводов, эфиров, серосодержащих соединений и других групп низкомолекулярных органических соединений (НОС) (табл. 5) (Батаева и соавт., 2021). При всех вариантах экстракции в составе НОС преобладали спирты и эфиры. Доминирующими соединениями в суспензии, в гексановом и водно-спиртовом экстракте были 3-бутенилпентилового эфира и 2-метилпентан-2,4-диол (1,2-гександиол). Их содержание в суспензии составило 32.17 и 23.20%, в гексановом экстракте – 19.49 и 20.69% и в водно-спиртовом экстракте – 15.59 и 18.91% соответственно.

В метанольном экстракте преобладал 5-(пиридин-4-ил)-1Н-пиразол-3-карбоксилат (57.8% от суммарного содержания НОС). По данным Kagouchi и соавт. (2018) вещества, содержащие пиразол, характеризуются противовирусными, противомикробными и противоопухолевыми свойствами. 1,2-Гександиол обладает широким антимикробным спектром действия, нарушает потенциал цитоплазматической мембраны и эффективен против как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий.

Возможные биологические активности 3-бутенилпентилового эфира не изучены. Хорошим решением исследования его потенциальных свойств мог бы стать метод QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationship), позволивший, в частности, выявить наиболее перспективные метаболиты высших водных растений, обладающих противовоспалительной, антифунгальной и антибактериальной активностями (Kurashov et al., 2016).

Таким образом, изучен синтез штаммом *S. carpaticus* RCAM04697 химических соединений различных групп: флавоноидов, алкалоидов, гликозидов, спиртов, альдегидов, углеводов, эфиров, серосодержащих соединений; органических кислот (изолимонная, уксусная, фумаровая, молочная, пировиноградная, яблочная); 3-бутенилпентилового эфира, 1,2-гександиола, 5-(пиридин-4-ил)-1Н-пиразол-3-карбоксилата. Высокие противомикробные свойства органических кислот биологического происхождения хорошо известны, и они рассматриваются как перспективные соединения для защиты семян, кормов и растений (Рыжкова, 2018).

В биологической борьбе с фитопатогенами стрептомицеты играют регуляторную роль. Одновременный биосинтез вторичных метаболитов широкого спектра действия, по-видимому, определяет стратегию их воздействия на другие организмы и способность к высоким адаптационным возможностям и высокой конкурентоспособности в различных экологических нишах.

Штамм был запатентован в Российской Федерации в качестве средства для защиты от насекомых-вредителей, грибных, вирусных болезней и стимуляции роста томатов (патент РФ № 2695157).

Проведенные исследования показали, что бактерии рода *Streptomyces* являются богатым источником комплексных метаболитов, проявляющих высокую биологическую активность, и могут служить основой для разработки полифункциональных биопрепаратов для растениеводства с фитостимулирующими, противовирусными, ан-

тифунгальными, антиоксидантными и инсектицидными свойствами.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках реализации проекта “Разработка экологически безопасного средства защиты растений на основе почвенных актинобактерий для восстановления агроэкосистем” по Программе развития Астраханского государственного университета им. В.Н. Татищева на 2021–2030 гг. (“Приоритет 2030”), а также в рамках исследований, проводимых по теме № 0154-2019-0002 ИНОЗ РАН – СПб ФИЦ РАН.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

В настоящей статье отсутствует конфликт интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Анисимова О.С. *Streptomyces loidensis* и *Streptomyces herbaricolor*: биологическое обоснование использования вторичных метаболитов для создания новых инсектоакарицидных биопрепаратов. Автореферат дис. ... канд. биол. наук, 24.07.2008. Санкт-Петербург: Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, 2008. 19 с.
- Батаева Ю.В., Григорян Л.Н., Курашов Е.А., Крылова Ю.В., Федорова Е.В., Явид Е.Я., Ходонович В.В., Яковлева Л.В. Изучение метаболитов *Streptomyces carpaticus* RCAM04697 для создания экологически безопасных средств защиты растений // Теоретическая и прикладная экология. 2021. № 3. С. 172–178. <https://doi.org/10.25750/1995-4301-2021-3-172-178>
- Бурцева С.А., Пойрас Н.А., Бырса М.Н., Пойрас Л.Н. Эффект предпосевной обработки семян томатов метаболитами стрептомицетов почв Молдовы // Материалы II Всерос. научно-практ. конф. с межд. участием “Биоразнообразие и рациональное использование природных ресурсов”. Махачкала, 2014. С. 213–216.
- Гаузе Г.Ф., Преображенская Т.П., Свешникова М.А., Терехова Л.П., Максимова Т.С. Определитель актиномицетов. Роды *Streptomyces*, *Streptoverticillium*, *Chainia*. М.: Наука, 1983. 248 с.
- Григорян Л.Н., Батаева Ю.В., Шляхов В.А. Влияние штамма бактерий *Streptomyces carpaticus* RCAM04697 на фитостимуляцию, фитовирусы томата и насекомых-вредителей в лабораторных условиях // Естественные и технические науки. 2020. № 6(144). С. 58–61.
- Домрачева Л.И., Скугорева С.Г., Стариков П.А., Горностаева Е.А., Ашихмина Т.Я. Микробы-антагонисты против фитопатогенных бактерий и грибов (обзор) // Теоретическая и прикладная экология. 2022. № 2. С. 6–14.
- Domracheva L.I., Skugoreva S.G., Starikov P.A., Gornostayeva E.A., Ashikhmina T.Ya. Microbes-antagonists against of phytopathogenic bacteria and fungi (review) // Theoretical and Applied Ecology. 2022. № 2. P. 6–14. <https://doi.org/10.25750/1995-4301-2022-2-006-014>
- Егорова А.М., Тарчевский И.А. Праймин-сигнальная функция антибиотиков, продуцируемых стрептомицетами // Экобиотех. 2019. Т. 2. № 4. С. 504–509. <https://doi.org/10.31163/2618-964X-2019-2-4-504-509>
- Методы общей бактериологии / Под ред. Герхардт Ф.М. М.: Мир, 1984. Т. 1–3.
- Патент РФ № 2156301. 2000. Штамм актиномицета *Streptomyces avermitilis* ССМ 4697 – продуцент авермектинов.
- Патент РФ № 2226214. 2004. Штамм актиномицета *Streptomyces chrysomallus* P-21 для получения биопрепарата полифункционального действия.
- Патент РФ № 2243259. 2002. Штамм актиномицета *Streptomyces hygrosopicus* subsp. ЦКМ В-4561, обладающий фунгицидными, бактерицидными и инсектицидными свойствами.
- Патент РФ № 2695157. 2019. Штамм *Streptomyces carpaticus* для защиты от насекомых-вредителей, грибных, вирусных болезней и стимуляции роста томатов.
- Поляк Ю.М., Сухаревич В.И. Выделение почвенных стрептомицетов – продуцентов комплексных антибиотиков // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. 2017. Т. 13. С. 18–24.
- Рыжкова Е.П., Данилова И.В., Шамрайчук И.Л., Кураков А.В., Непрусов А.И. Антифунгальная активность штамма *Propionibacterium freudenreichii* представителя рода *Lactobacillus* // Микология и фитопатология. 2018. Т. 52. С. 144–149.
- Ryzhkova E.P., Danilova I.V., Shamraichuk I.L., Kurakov A.V., Netrusov A.I. Antifungal activity of *Propionibacterium freudenreichii* and several *Lactobacillus* species // Mycology and Phytopathology. 2018. V. 52. P. 144–149.
- Толкачева Н.В., Комаровская-Порохнявец Е.З., Новиков В.П. Биологическая активность стероидных гликозидов, выделенных из луковок *Allium cyrillii* ten. (Alliaceae) // Фармация и фармакология. 2014. № 6(7). С. 29–32.
- Tolkachova N.V., Komarovskaya-Porokhnyavets E.Z., Novikov V.P. Biological activity of steroid glycosides from bulbs of *Allium cyrillii* ten. (Alliaceae) // Pharmacy and Pharmacology. 2014. № 6(7). P. 29–32. [https://doi.org/10.19163/2307-9266-2014-2-6\(7\)-29-32](https://doi.org/10.19163/2307-9266-2014-2-6(7)-29-32)
- Чулуун Б., Сапармырадов А., Алимова Ф.К., Миндубаев А.З. Сравнение показателей фитотоксичности, фунгицидной и бактерицидной активности стрептомицетов из различных местообитаний // Бултеровские сообщения. 2014. Т. 38. № 6. С. 147–152.
- Широких И.Г., Бакулина А.В., Назарова Я.И., Широких А.А., Козлова Л.М. Влияние *Streptomyces castelarensis* A4 на заболеваемость и урожайность зерновых культур полевого севооборота // Микология и фитопатология. 2020. Т. 54. С. 59–66.
- Shirokikh I.G., Bakulina A.V., Nazarova Ya.I., Shirokikh A.A., Kozlova L.M. The influence of *Streptomyces castelarensis* A4 on the incidence and yield of grain crops of field crop rotation // Mycology and Phytopathology. 2020. V. 54. P. 59–66. <https://doi.org/10.31857/S0026364820010080>

- Cho J.Y., Kim M.S. Antibacterial benzaldehydes produced by seaweed-derived *Streptomyces atrovirens* PK288-21 // Fisheries Science. 2012. V. 78. P. 1065–1073. <https://doi.org/10.1007/s12562-012-0531-3>
- Cushnie T., Cushnie B., Lamb A.J. Alkaloids: An overview of their antibacterial, antibiotic-enhancing and antivirulence activities // Int. J. Antimicrob. Agents. 2014. V. 44. P. 377–386. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.06.001>
- Grigoryan L.N., Bataeva Y.V., Andreeva E.D., Zakar'yeva D.Kh., Turaeva Z.O., Antonova S.V. Study of the component structure of the metabolites of bacteria *Nocardioopsis umidischolae* in the search for eco-friendly plant protection agents // Russ. J. Gen. Chem. 2020. V. 90. P. 2531–2541. <https://doi.org/10.1134/S1070363220130010>
- Karak P. Biological activities of flavonoids: an overview // Int. J. Pharm. Sci. Res. 2019. V. 10. P. 1567–1574. [https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.10\(4\).1567-74](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.10(4).1567-74)
- Karrouchi K., Radi S., Ramli Y., Taoufik J., Mabkhot Y.N., Al-aizari F.A. Synthesis and pharmacological activities of pyrazole derivatives // Molecules. 2018. V. 23. Art. 134. P. 1–85. <https://doi.org/10.3390/molecules23010134>
- Korkmaz M.O., Erturk D. Gurel insecticidal activity of some strains of streptomycetes isolated from the soil against larvae and adults of the Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*) // Turkey: Bitki Koruma Bul. 2015. V. 55. P. 73–84. <https://doi.org/10.3923/jm.2017.218.228>
- Kurashov E.A., Fedorova E.V., Krylova J.V., Mitrukova G.G. Assessment of the potential biological activity of low molecular weight metabolites of freshwater macrophytes with QSAR // Scientifica. 2016. V. 2016. Art. 1205680. <https://doi.org/10.1155/2016/1205680>
- Manucharova N.A., Troshcheva E.V., Kol'tsova E.M., Demkina E.V., Karaevskaya E.V., Rivkina E.M., Mardanov A.V., El'-Registan G.I. Characterization of the structure of the prokaryotic complex of antarctic permafrost by molecular genetic techniques // Microbiology (Moscow). 2016. V. 85. P. 102–108. <https://doi.org/10.7868/S0026365616010055>
- Pacios-Michelen S., Aguilar González C.N., Alvarez-Perez O.B., Rodriguez-Herrera R., Chávez-González M., Arredondo Valdés R., Ascacio Valdés J.A., Govea Salas M., Ilyina A. Application of *Streptomyces* antimicrobial compounds for the control of phytopathogens // Front. Sustain. Food Syst. 2021. V. 5. Art. 696518. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.696518>
- Pylro V.S., Dias A.C.F., Andreote C.C.F., Andreote F.D., Melo D.E., Varani A., Figueiredo D.E., Ribeiro I.A., Kitano I.T., Almeida D.E., Bernardo E.R. Draft genomic sequences of *Streptomyces misionensis* ACT66 and *Streptomyces albidoflavus* act77, bacteria with potential application for phytopathogen biocontrol // Microbiol. Resour. Announc. 2019. V. 8. № 36. P. 118–125. <https://doi.org/10.1128/MRA.00949-19>
- Remya S., Sivaraman G.K., Joseph T.C., Parmar E., Sreelakshmi K.R., Mohan C.O., Ravishankar C.N. Influence of corn starch based bio-active edible coating containing fumaric acid on the lipid quality and microbial shelf life of silver pomfret fish steaks stored at 4°C // J. Food Sci. Technol. 2022. V. 59. P. 3387–3398. <https://doi.org/10.1007/s13197-021-05322-y>
- Řezanka T., Spížek Přikrylová J., Prell A., Dembitsky V.M. Five new derivatives of nonactic and homo-nonactic acids from *Streptomyces globisporus* // Tetrahedron. 2004. V. 60. P. 4781–4787. <https://doi.org/10.1016/J.TET.2004.04.006>
- Zinn M.-K., Bockmühl D. Did granny know best? Evaluating the antibacterial, antifungal and antiviral efficacy of acetic acid for home care procedures // BMC Microbiology. 2020. V. 20. Art. 265. P. 1–9.

Biological Activity and Composition of Metabolites of Potential Agricultural Application from *Streptomyces carpaticus* K-11 RCAM04697 (SCPM-O-B-9993)

Yu. V. Bataeva^{1, *}, L. N. Grigoryan¹, A. G. Bogun², A. A. Kislichkina², M. E. Platonov², E. A. Kurashov³, J. V. Krylova⁴, A. G. Fedorenko⁵, and M. P. Andreeva¹

¹Tatishchev Astrakhan State University, Astrakhan, 414056 Russia

²State Scientific Center of Applied Microbiology and Biotechnology, Rospotrebnadzor, Obolensk, 142279 Russia

³Institute of Limnology, a Separate Subdivision of the St. Petersburg Federal Research Center, Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, 196105 Russia

⁴Saint-Petersburg Branch of the All-Russian Research Institute of Fisheries and Oceanography (L.S. Berg GosNIORKh), Saint-Petersburg, 199004 Russia

⁵Southern Federal University, Rostov-on-Don, 344006 Russia

*e-mail: aveatab@mail.ru

Received November 2, 2022; revised November 28, 2022; accepted January 10, 2023

Abstract—Strain K-11 was isolated from the highly saline brown semi-desert soil of the Astrakhan region. Based on analysis of the 16S rRNA gene sequence, this strain was identified as *Streptomyces carpaticus* K-11 RCAM04697 (SCPM-O-B-9993). Whole genome sequencing of the strain was performed. Phytotoxicity, antiviral, antioxidant, antifungal, and insecticidal activities of the strain were studied. All extracts and suspensions of *S. carpaticus* strain RCAM04697 had plant-stimulating activity. Antiviral properties was exhibited as suppression of development and propagation of viral pathogens in laboratory conditions: *Tomato Mosaic Virus* (ToMV) – 26.3%, *Cucumber Mosaic Virus* (CMV) – 33.8%, *Y-Potato Virus* (YVK) (*Potato Y potyvirus*, PVY) – 51.3%, *Potato X-Virus* (PVX) (*Potato X potyvirus*, PVX) – 41.3%. The highest antioxidant activity was shown by a suspension of *S. carpaticus* strain RCAM04697 (88.8%) and its aqueous-alcoholic (20 : 80) extract

(76.0%). The strain inhibited growth of the phytopathogenic fungus *Fusarium sporotrichioides* to varying degrees. The insecticidal activity against *Aphis fabae* after 6 h of treatment was 100% in the variants with suspension treatment, water-alcohol (80 : 20, 50 : 50), methanol, and hexane extracts. The metabolites of the *S. carpaticus* RCAM04697 strain included flavonoids, alkaloids, glycosides, organic acids (isocitric, acetic, fumaric, lactic, pyruvic, and malic), alcohols, aldehydes, hydrocarbons, ethers, sulfur-containing compounds, and other groups of low-molecular weight organic compounds.

Keywords: streptomycetes, *Streptomyces*, actinobacteria, antioxidant activity, antifungal activity, antiviral activity, metabolites, extract, mass spectrometry

ВЛИЯНИЕ МУТАЦИЙ В ЭКСТРАЦИТОЗОЛЬНОМ ДОМЕНЕ H^+ -АТФазы ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* НА ЕЕ АКТИВНОСТЬ И РЕГУЛЯЦИЮ

© 2023 г. В. В. Петров*

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

*e-mail: vpetrov07@gmail.com

Поступила в редакцию 30.11.2022 г.

После доработки 21.01.2023 г.

Принята к публикации 23.01.2023 г.

H^+ -АТФаза плазматической мембраны (PMA1), ключевой фермент метаболизма дрожжей, подвергается множественному фосфорилированию во время биогенеза и функционирования. При этом происходит активация АТФазы – феномен, названный глюкозным эффектом. В работе использовали сайт-направленный мутагенез для определения функциональной роли потенциально фосфорилируемых аминокислотных остатков в экстрацитозольной петле L9-10 (846-SENWTD). Мутантные формы фермента были экспрессированы на уровне плазматической мембраны для определения АТФазной активности и влияния мутаций на биогенез фермента. Иммуноблоттинг показал, что экспрессия мутантных форм АТФазы не была существенно нарушена. Базовая активность (в отсутствие глюкозы) мутантных форм фермента незначительно отличалась от таковой дикого типа; в то же время регуляция ферментов E847A, T850A и D851A была нарушена и степень активации глюкозой снижалась в 2–2.5 раза. Мутант S846A, напротив, обладал повышенной базовой активностью и сохранял способность активироваться. Данные указывают на то, что эти остатки (особенно Ser-846, Thr-850 и Asp-851) важны для нормального функционирования PMA1 и ее регулирования глюкозой.

Ключевые слова: глюкозная активация, PMA1 H^+ -АТФаза, плазматическая мембрана, *Saccharomyces cerevisiae*, дрожжи

DOI: 10.31857/S0026365623800017, EDN: FXGVIF

Дрожжи являются не только важным биотехнологическим организмом и объектом медицинских исследований, но и удобной моделью при изучении физиологических процессов в животных и растительных клетках. Одним из жизненно важных ферментов дрожжевой клетки является H^+ -АТФаза плазматической мембраны (PMA1), кодируемая геном *PMA1*, нокаут которого для клетки летален. Будучи протонным насосом, этот фермент создает электрохимический градиент ионов водорода ($\Delta\mu_{H^+}$), энергия которого используется для активного вторичного транспорта веществ. Большая часть АТФазы находится в цитозольном участке фермента, часть – в мембранном домене и только 3–4% в экстрацитозольном домене, наименее изученном участке АТФазы. Фермент заякорен в мембране за счет 10 трансмембранных сегментов, в которых находятся аминокислотные остатки, образующие сайты транспорта протонов (Ambesi et al., 2000; Petrov et al., 2000; Guerra et al., 2007; Miranda et al., 2011). Сайты связывания АТФ

и фосфорилирования находятся в цитозольной части PMA1 АТФазы: при связывания аденозинтрифосфата происходит *каталитическое* фосфорилирование консервативного остатка Asp (в PMA1 *S. cerevisiae* – Asp-378) с образованием β -аспартилфосфата и последующим гидролизом образующейся макроэргической связи, энергия которой используется на транспорт H^+ из клетки. Функционирование АТФазы и ее регуляция тесно связаны с метаболизмом глюкозы и других ферментируемых сахаров: при добавлении глюкозы к клеткам происходит обратимое быстрое и значительное увеличение активности фермента – феномен, называемый “глюкозным эффектом” (Serrano, 1983). При этом происходит множественное *регуляторное* фосфорилирование молекулы АТФазы. В основном фосфорилируются остатки Ser, в значительно меньших количествах был также обнаружен фосфотреонин (Chang, Slayman, 1991). За 40 лет, прошедшие с момента открытия этого феномена, тонкие механизмы этого эффекта до сих пор полностью не выявлены. Предполагается,

Таблица 1. Олигонуклеотиды, синтезированные для замены аминокислотных остатков Ser-846, Glu-847, Thr-850 и Asp-851 в экстрацитозольной петле L9-10. Триплеты, кодирующие замены, выделены жирным шрифтом и подчеркиванием

Мутация	Последовательность нуклеотидов
S846A	5' > C GCT GTC GAC ATC ATC GCT ACC ATG TTT ACC TTA TTC GGT TGG TGG <u>GCT</u> GAA AAC TGG < 3'
E847A	5' > C GCT GTC GAC ATC ATC GCT ACC ATG TTT ACC TTA TTC GGT TGG TGG TCT <u>GCT</u> AAC TGG < 3'
T850A	5' > C GCT GTC GAC ATC ATC GCT ACC ATG TTT ACC TTA TTC GGT TGG TGG TCT GAA AAC TGG <u>GCT</u> GAT ATT G < 3'
T850S	5' > C GCT GTC GAC ATC ATC GCT ACC ATG TTT ACC TTA TTC GGT TGG TGG TCT GAA AAC TGG <u>TCT</u> GAT ATT G < 3'
D851A	5' > C GCT GTC GAC ATC ATC GCT ACC ATG TTT ACC TTA TTC GGT TGG TGG TCT GAA AAC TGG ACT <u>GCT</u> ATT G < 3'

что в процессе созревания фермента и его внутриклеточного трафика фосфорилируются около 10 аминокислотных остатков, из которых установлены только три (Lecchi et al., 2005, 2007; Mazon et al., 2015). Важным доменом этого фермента является С-концевой цитоплазматический участок молекулы, являющийся регуляторным. Показано, что глюкозо-зависимая регуляция активности H^+ -АТФазы дрожжей связана с фосфорилированием tandemно расположенных в этом домене остатков Ser-911 и Thr-912 (Lecchi et al., 2005, 2007); вовлеченность остальных потенциальных фосфосайтов в этот процесс до настоящего времени не установлена. Таким образом, представлялось важным выяснить, влияют ли замены других потенциально фосфорилируемых остатков, расположенных в С-концевой части фермента, на его активность и регуляцию.

Было выбрано несколько таких остатков, находящихся в короткой экстрацитозольной петле L9-10 846-SENWTD, расположенной между трансмембранными сегментами M9 и M10, проведен сайт-направленный мутагенез, и получены мутанты S846A, E847A, T850A, T850S и D851A, у которых изучали вышеуказанные параметры, а также экспрессию.

Следует особо отметить, что данные о роли экстрацитозольной части PMA1 АТФазы очень скудны: изучались только экстрацитозольные петли L1-2 (Seto-Young et al., 1994) и L5-6 (Petrov, 2015; Петров, 2015); в случае петли L9-10 изучалось влияние указанных выше мутаций на накопление различных фракций полифосфатов (Tomashovsky, Petrov, 2022). Влияние мутаций в этих петлях на регуляцию фермента не изучалось.

Представленная работа является частью систематического исследования структурно-функциональной организации PMA1 АТФазы дрожжей. Целью работы являлось изучение влияния точечных замен аминокислотных остатков Ser-846, Glu-847, Thr-850, Asp-851 в экстрацитозольной петле L9-10 С-концевого участка H^+ -АТФазы плазматической мембраны на ее экспрессию, активность и регуляцию глюкозой.

В работе использовали штамм дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* NY13 (MATA *ura3-52*), ген PMA1 которого контролируется нативным промотором P_{PMA1} (P_{PMA1} -PMA1) и связан с селективным маркером URA3 (Guerra et al., 2007; Петров, 2010), и производные от него мутантные штаммы с различными мутациями в гене PMA1, кодирующими точечные замены аминокислотных остатков. Для этого были синтезированы олигонуклеотиды, несущие замены соответствующих остатков (табл. 1), и с помощью ПЦР проведен сайт-направленный мутагенез (Петров, 2010). Была также получена замена Thr-850 → Ser, которая послужила дополнительным контролем. Культуры дрожжей поддерживали на агаризованной среде, содержащей 2%-ную глюкозу, 6.7 г/л YNB (“Difco”, США), 20 мг/л гистидина. Штаммы выращивали на качалке при 30°C на жидкой среде того же состава до середины логарифмической фазы роста. Клетки осаждали центрифугированием, полученную биомассу промывали дистиллированной водой, делили на две части, которые ресуспендировали в воде, после чего в одну из частей добавляли глюкозу до 2% и инкубировали оба образца с перемешиванием 30 мин при 30°C и осаждали. Затем выделяли плазматические мембраны, которые промывали 1 мМ буфером EGTA-Tris, pH 7.5, содержавшим ингибиторы протеаз (2 мкг/мл хемостатина и лейпептина, 1 мкг/мл

пепстатина и апротинина), и ресуспендировали в том же буфере. Выделенные плазматические мембраны использовали для определения уровня экспрессии и активности. Все препаративные процедуры выполняли при 0–4°C.

Количество экспрессированного белка РМА1 АТФазы определяли с помощью SDS-ПААГ-электрофореза и иммуноблоттинга, как описано ранее (Petrov et al., 2000; Петров, 2010). Блоты обрабатывали поликлональными антителами к РМА1 H⁺-АТФазе, а затем [¹²⁵I]-белком А (“ICN”, США). Уровень экспрессии мутантной РМА1 АТФазы определяли с помощью прибора PhosphorImager, оснащенный программой ImageQuant (“Molecular Dynamics”, США) и выражали в процентном отношении от количества фермента в штамме дикого типа, выделяемого параллельно в этот же день (Петров, 2010). Измерение активности АТФазы проводили в препаратах плазматических мембран при 30°C в 0.5 мл инкубационной смеси, содержащей 10 мМ MgSO₄, 5 мМ Na₂АТФ, 50 мМ MES-Tris pH 5.7, 5 мМ KN₃, 5 мМ фосфоенолпирувата и 50 мкг/мл пируваткиназы в присутствии и в отсутствие 100 мкМ специфического ингибитора Na₃VO₄. Активность РМА1 рассчитывали по ванадат-чувствительной части ортофосфата, образующегося при гидролизе АТФ. За 100% базовой активности была принята АТФазная активность плазматических мембран, выделяемых из голодающих клеток дикого типа.

РМА1 АТФаза синтезируется в эндоплазматическом ретикулуме и через аппарат Гольджи и секреторные везикулы достигает плазматической мембраны. На этом секреторном пути находятся пункты контроля качества; если фолдинг фермента был серьезно нарушен, такой белок отбраковывается (Ambesi et al., 2000). Поэтому было важно оценить, влияют ли введенные мутации на экспрессию фермента в плазматических мембранах и, как следствие, на его биогенез. Для этого плазматические мембраны были выделены из голодающих клеток (без глюкозы, рис. 1) и из клеток, метаболизирующих глюкозу (с глюкозой, рис. 1). Количество белка РМА1 дикого типа, полученное из клеток, не инкубированных с глюкозой, было принято за 100%. В обоих случаях мутантная АТФаза с заменой S846A экспрессировалась даже немного лучше, чем фермент дикого типа в родительском штамме NY13, в то время как экспрессия АТФазы в остальных штаммах была понижена: от незначительных 16% (E847A) до заметных 41% (T850S). В штаммах с АТФазой дикого типа и мутациями S846A и D851A сбраживание глюкозы практически не влияло на экспрессию фермента, а в остальных случаях несколько понижало количество мутантной АТФазы в плазматических мембранах (на 10–15%, рис. 1). Следует отметить, что наиболее выраженное влияние мутаций на экс-

прессию наблюдалось в случае гомологичной замены Thr-850 на Ser. Замена этого остатка на Ala приводили к повышению экспрессии на 15–22% по сравнению с T850S, это предполагает, что сериновая замена в большей степени влияет на биогенез и фолдинг фермента, чем замена на аланин. Вместе с тем представленные данные указывают на то, что биогенез мутантных ферментов с заменами в петле L9-10 не был серьезно нарушен, как это было показано, например, в случае замены остатка Leu-717, находящегося в экстрацитозольной петле L5-6, на Ala или Cys. Такие замены приводили к практически полному блокированию внутриклеточного траффика мутантных АТФаз (Petrov, 2015; Петров, 2015).

Для того чтобы оценить, как функционирует фермент, имеющий замены изучаемых остатков, была измерена ферментативная активность препаратов плазматических мембран, выделенных из голодающих клеток (базовая активность), и клеток, метаболизирующих глюкозу (рис. 1). Базовая активность фермента дикого типа была принята за 100%. Базовая активность АТФазы мутантных штаммов наиболее выражено отличалась от таковой дикого типа в случае S846A (увеличение на 45%) и D851A (уменьшение на 30%, рис. 1). В остальных случаях активность менялась незначительно, на 10–13% в ту или иную сторону. На основании этих данных можно предположить, что в штамме S846A АТФаза частично активирована даже в отсутствие глюкозы, в то время как мутация D851A приводила к снижению активности фермента. Присутствие глюкозы приводило к более выраженному влиянию замен на функционирование АТФазы. В штамме с заменой S846A глюкозный эффект был ясно выражен, и уровень активности фермента при сбраживании глюкозы даже превышал отмеченный у родителя; однако, вследствие того, что базовая активность мутанта была выше родительской, степень активации мутантного фермента S846A была несколько ниже, чем у родителя (3.5 и 4.5 раза соответственно, рис. 1). У трех других мутантных ферментов (E847A, T850A и D851A) уровень гидролиза АТФ в активированном состоянии был ниже в 2.3–2.6 раза, чем у дикого типа. У мутанта T850S уровень такой активности и степень активации фермента были значительно выше, чем у мутанта T850A, но на 40% ниже, чем у родительского типа.

Различие в действии замен T850A и T850S косвенно подтверждает, что находящиеся в этой позиции остатки треонина или серина могут фосфорилироваться, но серин может некоторым образом влиять на (локальную) конформацию фермента. Это может указывать на изменения во взаимодействии как различных доменов фермента между собой, так и самой молекулы АТФазы с липидным микроокружением и/или соседними белками. Недавно было показано, что молекулы АТФазы об-

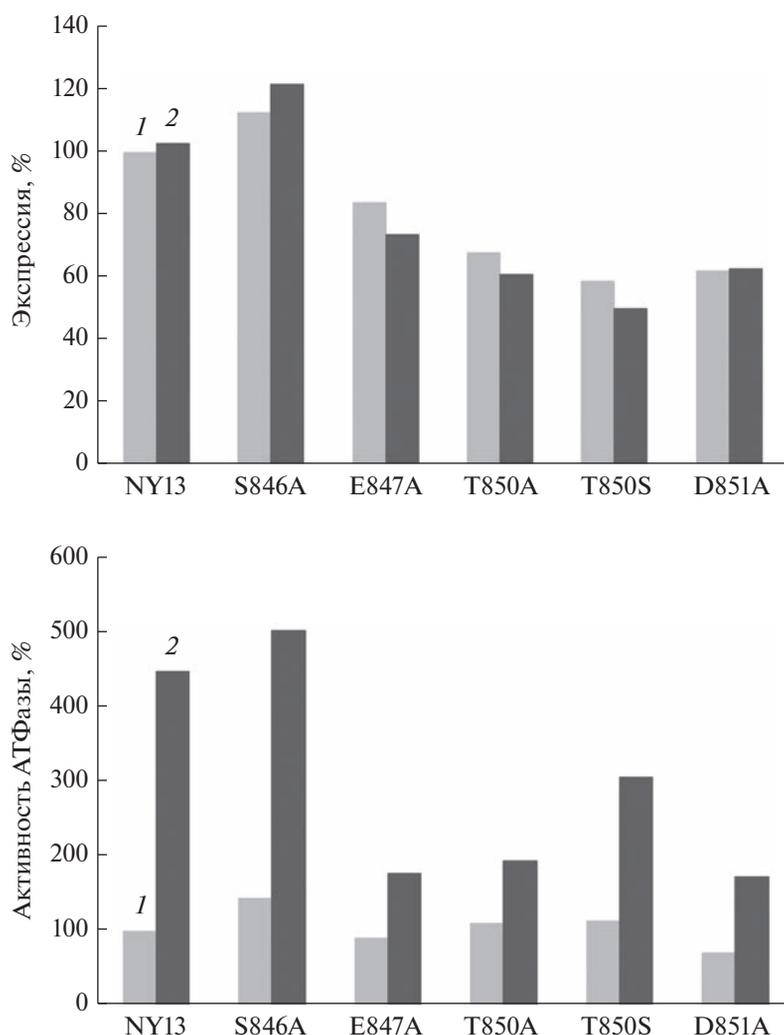


Рис. 1. Влияние мутаций на экспрессию и активность РМА1 H^+ -АТФазы плазматической мембраны *S. cerevisiae* (%). 100% соответствуют экспрессии и активности АТФазы родительского штамма NY13 в отсутствие глюкозы: 1 – без глюкозы; 2 – с глюкозой.

разуют гексамер, где мономеры взаимодействуют друг с другом, в частности, через фосфорилирующей и регуляторный домены (Heit et al., 2021). Нельзя исключить, что во взаимодействии принимают участие и экстрацитозольные части фермента, в том числе потенциально фосфорилируемые остатки, образующие петлю L9-10 – 846-SENWTD. Более того, наше исследование влияния изучаемых замен на метаболизм полифосфатов показало, что все мутации, кроме E847A, заметным образом влияли на распределение полифосфатов по фракциям. Причем наиболее значительными были изменения в штаммах S846A и T850A и носили сходный характер, а характер перераспределения полифосфатов в штамме T850S значительно отличался от такового в указанных штаммах. Распределение полифосфатов в штамме Asp-851 было сходным с наблюдаемым как в случае S846A и T850A, так и в случае T850S (Tomashevsky, Petrov, 2022). Это сви-

детельствовало о том, что остатки Ser-846 и Thr-850 и, вероятно, Asp-851 важны для нормального функционирования РМА1 АТФазы и ее регуляции глюкозой.

Очевидно, для слаженной работы РМА1 АТФазы необходимо наличие нескольких сайтов фосфорилирования (фосфосайтов), из которых главными являются Ser-911 и Thr-912; при удалении этих фосфосайтов или их замене на фосфосайты другого типа (Ser/Thr → Asp) происходят масштабные изменения как в функционировании фермента (Lecchi et al., 2005, 2007; Mazon et al., 2015), так и в энергетическом метаболизме в целом (Tomashevsky, Petrov, 2022). Так, мутации S846A, T850A и D851A вызывали значительное перераспределение коротко- и среднецепочечных фракций полифосфатов (и в целом увеличение суммарного количества полифосфатов), в то время как эффект T850S был менее выражен, а в

случае E847A практически отсутствовал. Данные, представленные в настоящей работе, предполагают, что в общем процессе регуляции участвуют дополнительные сайты фосфорилирования, в том числе и изучаемые здесь Ser-846, Thr-850 и Asp-851. При удалении этих фосфосайтов происходит разогласованность функционирования Pma1 АТФазы и нарушение ее регуляции глюкозой. Дальнейшие исследования помогут пролить свет на тонкие механизмы регуляции этого жизненно важного фермента метаболизма дрожжей.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет отсутствие конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Петров В.В.* Точечные мутации в Pma1 H⁺-АТФазе дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*: влияние на ее экспрессию и активность // Биохимия. 2010. Т. 75. С. 1170–1180.
- Petrov V.V.* Point mutations in Pma1 H⁺-ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*: influence on its expression and activity // Biochemistry (Moscow). 2010. V. 75. P. 1055–1063.
- Петров В.В.* Роль петли L5-6, соединяющей мембранные сегменты M5 и M6, в биогенезе и функционировании Pma1 H⁺-АТФазы дрожжей // Биохимия. 2015. Т. 80. С. 41–58.
- Petrov V.V.* Role of loop L5-6 connecting transmembrane segments M5 and M6 in biogenesis and functioning of yeast Pma1 H⁺-ATPase // Biochemistry (Moscow). 2015. V. 80. P. 31–44.
- Ambesi A., Miranda M., Petrov V.V., Slayman C.W.* Biogenesis and function of the yeast plasma-membrane H⁺-ATPase // J. Exp. Biol. 2000. V. 203. P. 156–160.
- Chang A., Slayman C.W.* Maturation of the yeast plasma membrane [H⁺]ATPase involves phosphorylation during intracellular transport // J. Cell. Biol. 1991. V. 115. P. 289–295.
- Guerra G., Petrov V.V., Allen K.E., Miranda M., Pardo J.P., Slayman C.W.* Role of transmembrane segment M8 in the biogenesis and function of yeast plasma-membrane H⁺-ATPase // Biochim. Biophys. Acta. 2007. V. 1768. P. 2383–2392.
- Heit S., Geurts M.M.G., Murphy B.J., Corey R.A., Mills D.J., Kühlbrandt W., Bublitz M.* Structure of the hexameric fungal plasma membrane proton pump in its autoinhibited state // Sci. Adv. 2021. V. 7. Art. eabj5255. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abj5255>
- Lecchi S., Allen K.E., Pardo J.P., Mason A.B., Slayman C.W.* Conformational changes of yeast plasma membrane H⁺-ATPase during activation by glucose: role of threonine-912 in the carboxy-terminal tail // Biochemistry. 2005. V. 44. P. 16624–16632.
- Lecchi S., Nelson C.J., Allen K.E., Swaney D.L., Thompson K.L., Coon J.J., Sussman M.R., Slayman C.W.* Tandem phosphorylation of Ser-911 and Thr-912 at the C terminus of yeast plasma membrane H⁺-ATPase leads to glucose-dependent activation // J. Biol. Chem. 2007. V. 282. P. 35471–35481.
- Mazon M.J., Eraso P., Portillo F.* Specific phosphoantibodies reveal two phosphorylation sites in yeast Pma1 in response to glucose // FEMS Yeast Res. 2015. V. 15. P. 1–9.
- Miranda M., Pardo J.P., Petrov V.V.* Structure-function relationships in membrane segment 6 of the yeast plasma membrane Pma1 H⁺-ATPase // Biochim. Biophys. Acta. 2011. V. 1808. P. 1781–1789.
- Petrov V.V.* Point mutations in the extracytosolic loop between transmembrane segments M5 and M6 of the yeast Pma1 H⁺-ATPase: alanine-scanning mutagenesis // J. Biomol. Struct. Dynam. 2015. V. 33. P. 70–84.
- Petrov V.V., Padmanabha K.P., Nakamoto R.K., Allen K.E., Slayman C.W.* Functional role of charged residues in the transmembrane segments of the yeast plasma membrane H⁺-ATPase // J. Biol. Chem. 2000. V. 275. P. 15709–15716.
- Serrano R.* In vivo glucose activation of the yeast plasma membrane ATPase // FEBS Lett. 1983. V. 156. P. 11–14.
- Seto-Young D., Na S., Monk B.C., Haber J.F., Perlin D.S.* Mutational analysis of the first extracellular loop region of the H⁺-ATPase from *Saccharomyces cerevisiae* // J. Biol. Chem. 1994. V. 269. P. 23988–23995.
- Tomashevsky A.A., Petrov V.V.* Point mutations in the different domains of the *Saccharomyces cerevisiae* plasma membrane PMA1 ATPase cause redistribution among fractions of inorganic polyphosphates // J. Biomol. Struct. Dyn. 2022. V. 40. P. 635–647. <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1815582>

Effect of Mutations in the Extracytosolic Domain of the *Saccharomyces cerevisiae* H⁺-ATPase on Its Activity and Regulation

V. V. Petrov*

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

*e-mail: vpetrov07@gmail.com

Received November 30, 2022; revised January 21, 2023; accepted January 23, 2023

Abstract—Plasma membrane H⁺-ATPase (PMA1), the key enzyme of yeast metabolism, undergoes multiple phosphorylation during biogenesis and functioning. In the course of this process, the ATPase is getting activated (glucose effect). We have employed site-directed mutagenesis to determine the functional role of po-

tentially phosphorylable amino acid residues located in the extracytosolic L9-10 loop (846-SENWTD). The mutant enzyme forms were expressed at the plasma membrane to examine the effect of substitutions on biogenesis and ATPase activity. Immunoblotting revealed that the mutant ATPase expression was not significantly impaired. In the absence of glucose, basal activity of the mutant enzymes differed insignificantly from that of the wild type. At the same time, regulation of the mutant E847A, T850A, and D851A enzymes has been impaired; the level of enzyme activation by glucose was lower by 2.0–2.5-fold. On the contrary, the S846A mutant displayed elevated basal activity, maintaining the ability to undergo further activation. These data indicate that these residues (especially, Ser-846, Thr-850, and Asp-851) are essential for the normal functioning of the PMA1 and its regulation by glucose.

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

КАЛЬЦИНИРУЮЩИЕ БАКТЕРИИ В ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ ЭКОСИСТЕМАХ ЮЖНОГО ПРИАРАЛЯ

© 2023 г. К. В. Кондрашева^а, А. А. Умрузоков^а, С. В. Калёнов^б, А. Ю. Меркель^с, Н. А. Черных^с,
А. И. Слободкин^с, С. Н. Гаврилов^{с, *}, К. Д. Давранов^а

^аИнститут микробиологии АН Республики Узбекистан, Ташкент, 100128 Узбекистан

^бРоссийский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Кафедра биотехнологии,
Факультет биотехнологии и промышленной экологии, Москва, 125480 Россия

^сИнститут микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, 117312 Россия

*e-mail: snlavrilov@gmail.com

Поступила в редакцию 23.12.2022 г.

После доработки 23.01.2023 г.

Принята к публикации 23.01.2023 г.

Процессы микробно-индуцированного осаждения карбонатов кальция широко распространены в природных условиях и являются важной частью биогеохимического цикла углерода. Эти процессы легли в основу новых технологий “биоцементирования”, разработка которых активно ведется в последнее десятилетие по всему миру. Данные технологии направлены на создание новых “саможивляющихся” строительных материалов, а также на поддержание прочности различных сооружений и строительных конструкций. Оптимальными условиями для образования кальцитов являются повышенная соленость и щелочность среды, что вызвало интерес к поиску кальцинирующих микроорганизмов в разнообразных экосистемах, включая экстремальные. В настоящее время выделено и протестировано в полупромышленных условиях уже немало штаммов галофильных и галотолерантных бактерий, индуцирующих кальцинирование. Большинство этих бактерий обладает уреазной активностью, которая вносит основной вклад в связывание ионов кальция в нерастворимый карбонат кальция. Широкое разнообразие природных экосистем с оптимальными условиями для развития кальцинирующих уробактерий, а также экономическая востребованность технологий биоцементирования побуждает интерес к поискам все новых штаммов этих микроорганизмов. Одним из перспективных ресурсов для поиска таких организмов является экосистема высыхающего Аральского моря и прилегающего к нему пустынного и полупустынного региона Приаралья. В нашей работе мы приводим результаты скрининга различных экстремальных экосистем Аральского региона на наличие кальцинирующих микроорганизмов. Из образцов растительных остатков и почв Приаралья нами получено 28 чистых культур гетеротрофных аэробных бактерий, 4 из которых обладают уреазной и кальцинирующей активностями, дана сравнительная оценка их активности со штаммами, уже использованными для создания биоцементирующих препаратов. Методами молекулярной экологии детектированы филогены потенциальных кальцинирующих микроорганизмов в микробных сообществах пустынной почвы, термальных вод и донных отложений соленого озера, дано описание филогенетического разнообразия этих сообществ. Полученные результаты выявили широкое распространение кальцинирующих микроорганизмов в экосистемах Южного Приаралья и показали целесообразность поиска в них новых биотехнологически значимых штаммов этих организмов.

Ключевые слова: микробно-индуцированное осаждение кальцита, экстремальные экосистемы, Аральское море, биоцементирование

DOI: 10.31857/S0026365622600869, **EDN:** FWYKTA

На территории Узбекистана находится один из экстремальных биогеоценозов планеты — дно высыхающего Аральского моря. Резкое сокращение его акватории привело к повышению минерализации воды и концентрации минеральных удобрений и пестицидов, которые вымывались с орошаемых полей водами рек Амударья и Сырдарья в 1960–1990-е годы (Micklin, 2007). За время высы-

хания минерализация воды Арала повысилась на порядок — с десятков до сотен г/кг (Завьялов и соавт., 2012). В настоящее время на большей части Арала сформировалась новая песчано-солончакная пустыня Аралкум. Общей чертой почв этой области является высокая засоленность и крайняя нестабильность уровня влажности, вплоть до полного высыхания (Завьялов и соавт., 2012;

Давлетмуратова, 2017). Микрофлора почв этого типа обычно представлена солеустойчивыми, термостабильными и ксерофильными организмами, однако детальные исследования микробного разнообразия Аральского региона только разворачиваются. С учетом наличия сразу нескольких экстремальных для жизни физико-химических факторов в экосистеме Аралкума, населяющие ее микроорганизмы могут быть востребованы в различных областях биотехнологии, в частности, в технологиях “биоцементирования” при помощи микробно-индуцированного осаждения кальцита (МИОК, МІСР). Процессы МИОК широко распространены в природных условиях, являются важной частью биогеохимического цикла углерода и способствуют фиксации атмосферного CO_2 в составе карбонатных осадочных пород. Глобальная геохимическая роль этого процесса заключается в превращении рыхлых осадков в твердые горные породы, а также в уплотнении грунтов и песков (Frankel, Bazyliniski, 2003; DeJong, 2013; Osinubi et al., 2020; Pacheco et al., 2022). Наиболее активное осаждение кальцита индуцируют уробактерии, осуществляющие гидролиз мочевины и мочевой кислоты (Joshi et al., 2017; Omoregie et al., 2021). Мочевина является конечным продуктом метаболизма азотсодержащих соединений у многих животных, поэтому данное соединение и утилизирующие его микроорганизмы широко распространены во многих экосистемах, в основном, в богатых органикой животного происхождения (Atkinson, 1992). Интерес к кальцинирующим уробактериям растет, различными исследовательскими группами по всему миру проводится широкий скрининг таких микроорганизмов в разных экосистемах. Наиболее активные из уже отобранных штаммов относятся к разным видам рода *Bacillus* (Vahabi et al., 2015; Arias et al., 2019; Mutitu et al., 2019; Ekprasert et al., 2020; Leerprasert et al., 2022). МИОК при гидролизе мочевины является легко регулируемым процессом, при котором за короткое время образуется большое количество карбоната кальция (Калёнов и соавт., 2020). Дегградация мочевины катализируется уреазой, каталитическая активность которой считается достаточно высокой, а механизм катализа подробно изучен (Karplus et al., 1997). Выделяемый уреазой аммиак способствует повышению рН среды, благодаря чему свободные ионы кальция связываются с CO_2 , образующимся в результате уреазной реакции, в нерастворимые карбонаты (Charaño-Acuña et al., 2020). Благодаря высокой кальцинирующей активности уробактерий, препараты на их основе начинают успешно применяться для восстановления поврежденных (“закливления трещин”) в бетоне и камне, продления срока службы железобетонных конструкций, производства модифицированных строительных материалов с эффектом “самовосстановления” по-

сле механических повреждений. Недавние исследования показали большую экономическую эффективность технологий биогенного “самовосстановления” бетона по сравнению с абиотическими технологиями устранения трещин (Joshi et al., 2017, 2020; Almajed et al., 2021). Актуальность решения этой проблемы в материаловедении и строительстве определяется тем, что к природным факторам, пагубно влияющим на сохранность строительных материалов и конструкций, в последнее время все чаще прибавляется антропогенный фактор. Он выражается в загрязнении окружающей среды оксидами азота и серы, что приводит к кислотным дождям и туманам, способным растворять кальцитную матрицу известняка и вымывать из поверхностных слоев бетона растворимые компоненты (Alonso et al., 2018; Давидюк и соавт., 2021; Батыновский и соавт., 2022). Эти обстоятельства актуализируют поиск все новых кальцинирующих микроорганизмов.

Малоисследованной и перспективной экологической нишей для такого поиска являются соленые природные и техногенные водоемы, в которых обитают экстремально галофильные бактерии и археи, а также сопутствующая им микрофлора, которая, как показывают исследования, является либо галотолерантной, либо зависимой от продуктов жизнедеятельности и лизиса истинных галофилов, в частности, осмолитов. Предварительные исследования показали, что в микробных сообществах экстремально соленых и содовых озер присутствуют негалофильные микроорганизмы порядка *Bacillales*, обладающие высокой уреазной активностью (Galinski et al., 1994; Ventosa et al., 1998; Panosyan et al., 2018; Калёнов и соавт., 2020). Эти исследования вызвали интерес к поиску кальцинирующих микроорганизмов и в других экстремальных экосистемах, так как специфика применения МИОК подразумевает устойчивость таких микроорганизмов к высоким концентрациям солей и к щелочной среде цементных растворов, а также их способность закрепляться на целевой поверхности и выдерживать длительные периоды высыхания. Подобные физико-химические условия характерны, в частности, для почв Аральского региона.

В этой связи, целью нашей работы стала оценка потенциала микробных сообществ нескольких экстремальных экосистем Южного Приаралья в качестве источников новых уролитических кальцинирующих микроорганизмов для технологий биоцементирования и самовосстанавливающихся биобетонных, предназначенных к применению в условиях резко континентального аридного климата.

В ходе двух экспедиций, проведенных в ноябре—декабре 2021 г. и сентябре 2022 г., было отобрано, соответственно, 18 образцов растительных

остатков и почвы Южного Приаралья для выделения новых уrolитических бактерий и 23 образца почвы, микробных обрастаний, воды и донных отложений Аральского моря, Аралкума и Южного Приаралья, а также образцы термальной воды из скважин, пробуренных в бывшем дне Аральского моря. Все эти образцы были зафиксированы на месте для последующего выделения тотальной ДНК и филогенетического профилирования микробных сообществ по гену 16S рРНК.

Образцы почвы из первой экспедиции были подвергнуты общему химическому анализу по ГОСТ 2642(3-8)-85 и 26490-85 для определения физико-химических характеристик этих экстремальных экосистем. Эти образцы почвы, а также образцы собранных с нее растительных остатков были рассеяны на твердую питательную среду (мясо-пептонный агар (МПА), pH 6.8 ± 0.2 , концентрация NaCl 100–150 г/л, 2% агара) для накопления аэробных солеустойчивых гетеротрофных бактерий, к которым относится большинство известных уробактерий с кальцинирующей активностью (Joshi et al., 2017). Культивирование вели при температуре 35°C. Из полученных колоний методом 10-кратных разведений на жидкой питательной среде (мясо-пептонный бульон) было получено 28 чистых культур гетеротрофных микроорганизмов. Чистоту культур определяли микроскопированием, высевом на МПА и методом МАЛДИ-время-пролетной масс-спектрометрии (MALDI-TOF MS) с помощью комплекса MALDI Biotyper Microflex (“Bruker”, Германия), который также позволил провести первичную идентификацию полученных культур. Полученные культуры проверяли на наличие уреазной активности высевом штрихом на твердую питательную среду Кристенсена, pH 6.8 ± 0.2 , содержащую 7.5 г/л CaCl₂ и 0.012 г/л фенолового красного красителя в качестве индикатора. О проявлении уреазной активности судили по розовому окрашиванию среды вокруг колоний. Образование кальцита наблюдали визуально и при помощи световой микроскопии (цифровой микроскоп BA210 Digital, “Motic”, Китай) по формированию минеральной корки поверх или по краям колоний. Интенсивность кальцинирования оценивали по скорости проявления уреазной активности и образования кристаллов кальцита в сравнении с референтными галотолерантными штаммами уробактерий (далее, группа штаммов SKG1-9), которые были недавно выделены из нескольких различных гиперсоленых экосистем мира и успешно использованы в препаратах для улучшения функциональных и защитных характеристик бетона (Калёнов и соавт., 2020).

Из отобранных в ходе второй экспедиции образцов почвы, воды и микробных обрастаний была выделена тотальная ДНК, затем были подготовлены и отсекуены библиотеки ампликонов V4-вариабельного участка гена 16S рРНК и проведен

биоинформатический анализ полученных данных по методике, описанной ранее (Гаврилов и соавт., 2022). Необработанные прочтения были задепонированы в базе данных SRA (NCBI) под номером биопроекта PRJNA925816. В полученных наборах данных был произведен поиск филогенов, которые могут принадлежать микроорганизмам с кальцинирующей активностью. Для этого при анализе литературных данных были отобраны 10 полных последовательностей генов 16S рРНК штаммов с доказанной уреазной и кальцинирующей активностью. Кроме того, были использованы полные последовательности генов 16S рРНК галотолерантных штаммов уробактерий группы SKG1-9. Эти последовательности были определены ранее (Калёнов и соавт., 2020) и задепонированы в базе данных GenBank в рамках нашей работы под номерами, указанными в табл. 1. Нами также была определена солеустойчивость этих штаммов для оценки адекватности их использования в качестве референтных организмов при анализе экстремофильных микробных сообществ Аральского региона. Итоговый список последовательностей для поиска филогенов потенциальных кальцинирующих микроорганизмов приведен в табл. 1. Поиск целевых филогенов проводили программой Local blastn, во внимание принимался уровень сходства последовательностей не менее 98.8% (уровень одного вида).

Общий химический анализ показал, что отобранные в ходе первой экспедиции почвы являются щелочными и достаточно засоленными с вариацией pH от 8.23 до 9.27. Соленость почв варьирует в широких пределах от 0.24 до 56.63 г/л, но в большинстве образцов превышает 10 г/л. Основной солевой состав является NaCl, содержание сульфатов варьирует в широких пределах при среднем значении 73.4 мг-экв./л. Все эти данные указывают на существенную засоленность почв в большинстве отобранных нами образцов.

В результате скрининга 28 чистых культур аэробных гетеротрофов, выделенных из образцов растительных остатков и почв Приаралья, у четырех из них была выявлена уреазная и кальцинирующая активность. Уреазная активность начинала проявляться уже после 24 ч культивирования (рис. 1а), тогда как образование кристаллов кальцита можно было наблюдать визуально только на 5-е сут культивирования. В культурах, не проявивших уреазную активность, образования кристаллов кальцита не наблюдалось. Предварительная идентификация активных изолятов методом MALDI-TOF MS показала, что они относятся к видам *Bacillus licheniformis* (культуры AS001 и AS003), *Staphylococcus felis* (AS008) и *Azoarcus indigenus* (AS009). Время проявления кальцинирующей активности новыми изолятами было в 2.5 раза больше, чем у референтных штаммов SKG1-9 видов *Lysinibacillus macroides*, *B. licheniformis* и *B. subtilis*.

Таблица 1. Референтные полные последовательности гена 16S рРНК, использованные для поиска филогипов потенциальных кальцинирующих микроорганизмов в микробных сообществах экосистем Южного Приаралья

Наименование штамма	Упоминание в публикации по кальцинирующей активности	Идентификатор последовательности в базе данных	Ссылка на публикацию по кальцинирующей активности
<i>Mycosoccus xanthus</i> ATCC 25232	<i>Mycosoccus xanthus</i> СЕСТ 422	NR_043945.1	https://doi.org/10.1128/AEM.69.4.2182-2193.2003
<i>Sporosarcina pasteurii</i> ATCC 6453	<i>Bacillus pasteurii</i> ATCC 6453	Ген 16S рРНК из генома ATCC 6453	https://doi.org/10.1016/S0038-0717(99)00082-6
<i>Bacillus megaterium</i> de Bary ATCC 14581, VKM В-512	<i>Bacillus megaterium</i> ATCC 14581	Ген 16S рРНК из генома ATCC 14581	https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2010.11.009
<i>Sporosarcina ureilytica</i>	<i>Bacillus sphaericus</i> LMG 22257	CP017560.1	https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2006.12.011
<i>Bacillus megaterium</i> SS3	<i>Bacillus megaterium</i> SS3	KC121060.1	https://doi.org/10.1007/s11274-013-1408-z
<i>Bacillus</i> sp. CT5	<i>Bacillus</i> sp. CT5	FJ973470.1	https://ascelibrary.org/doi/full/10.1061/(ASCE)MT.1943-5533.0000159
<i>Alkalihalobacterium alkalinitriticum</i> FK3	<i>Bacillus alkalinitriticus</i>	ON834547.1	https://doi.org/10.1016/j.cemconcomp.2011.03.012
<i>Sutcliffella cohnii</i> RSH	<i>Bacillus cohnii</i> CCM 4369	X76437.1	https://doi.org/10.1016/j.cemconres.2014.06.003
<i>Alkalihalophilus pseudofirmus</i> DSM 8715	<i>Bacillus pseudofirmus</i>	NR_026139.1	https://research.tudelft.nl/en/publications/crack-repair-by-concrete-immobilized-bacteria
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> type strain	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	X06684.1	https://doi.org/10.14359/10154
<i>Bacillus licheniformis</i> SKG1	<i>Bacillus licheniformis</i>	OQ299525 ¹	https://doi.org/10.21519/0234-2758-2020-36-4-21-28
<i>Bacillus subtilis</i> SKG2	<i>Bacillus subtilis</i>	OQ299526 ¹	https://doi.org/10.21519/0234-2758-2020-36-4-21-28
<i>Bacillus subtilis</i> SKG3	<i>Bacillus subtilis</i>	OQ299527 ¹	https://doi.org/10.21519/0234-2758-2020-36-4-21-28
<i>Bacillus licheniformis</i> SKG4	<i>Bacillus licheniformis</i>	OQ299528 ¹	https://doi.org/10.21519/0234-2758-2020-36-4-21-28
<i>Bacillus subtilis</i> SKG5	<i>Bacillus subtilis</i>	OQ299529 ¹	https://doi.org/10.21519/0234-2758-2020-36-4-21-28
<i>Bacillus subtilis</i> SKG6	<i>Bacillus subtilis</i>	OQ299530 ¹	https://doi.org/10.21519/0234-2758-2020-36-4-21-28
<i>Lysinibacillus macroides</i> SKG7	<i>Lysinibacillus macroides</i>	OQ299531 ¹	https://doi.org/10.21519/0234-2758-2020-36-4-21-28
<i>Bacillus badius</i> SKG8	Не упоминался ранее	OQ299532 ¹	https://doi.org/10.21519/0234-2758-2020-36-4-21-28
<i>Bacillus subtilis</i> SKG9	<i>Bacillus subtilis</i>	OQ299533 ¹	https://doi.org/10.21519/0234-2758-2020-36-4-21-28

¹ Последовательности были определены ранее Калёновым и соавт. (2020), но помещены в базу данных в ходе нашей работы.

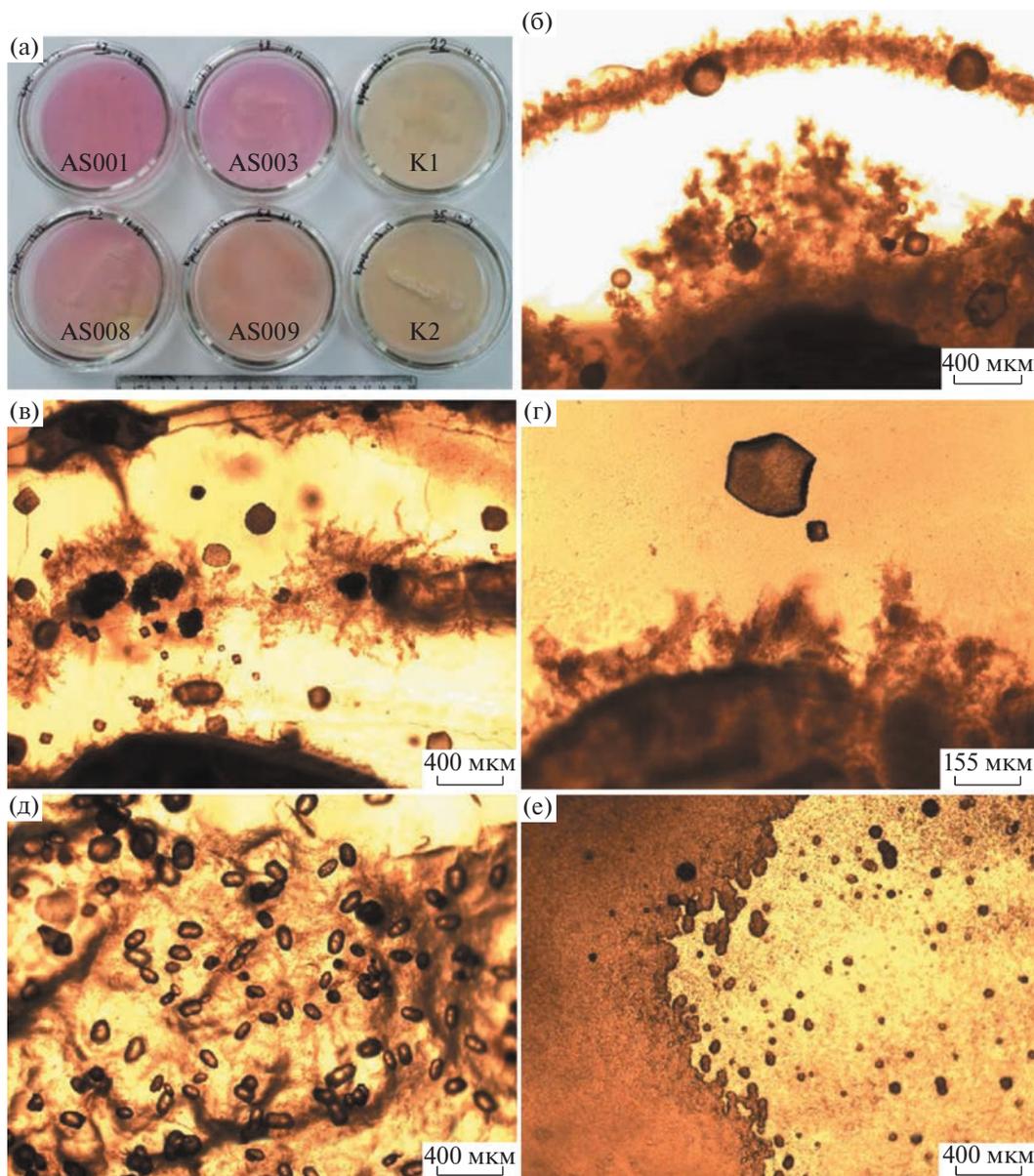


Рис. 1. Проявление уреазной и кальцинирующей активности чистыми культурами аэробных гетеротрофов, выделенными из образцов почв Приаралья: (а) – чашки Петри с чистыми культурами, посеянными штрихом на твердую среду Кристенсена, через 1 сут после начала инкубирования, активные культуры AS001, AS003, AS008, AS009 и неактивные контрольные культуры K1 и K2; (б–д) – кристаллы кальцита, образованные культурами с уреазной активностью; (б) – мелкие кристаллы по краям и вокруг колонии культуры AS001; (в) – мелкие и крупные кристаллы на поверхности колонии культуры AS003; (г) – кальцинированные колонии культуры AS009; (д) – крупные кристаллы на поверхности колонии культуры AS008; (е) – край колонии контрольной неактивной культуры K2.

Кальцинирующая активность этих штаммов проявлялась уже на 2-е сут культивирования (Калёнов и соавт., 2020). Оценка солеустойчивости штаммов группы SKG1-9 в рамках нашей работы выявила их рост при концентрациях NaCl до 150 г/л. Однако максимальная плотность культур этих штаммов наблюдается при концентрации NaCl до 50 г/л и значительно снижается при увеличении содержания соли. Урожай клеток *L. macroides* SKG7 сохраняется достаточно высоким до 100 г/л NaCl.

Эти данные позволяют корректно сравнивать кальцинирующую активность референтных штаммов группы SKG1-9 и чистых культур, выделенных нами из растительных остатков Аральского региона, почвы которого имеют солёность не выше 56 г/л.

Поиск микроорганизмов, близкородственных референтным штаммам кальцинирующих микроорганизмов (см. табл. 1), в образцах, отобранных из различных экосистем Приаралья в ходе нашей

второй экспедиции, выявил 9 фило типов (ASV) с высокой гомологией V4-участков гена 16S рРНК со штаммами *Bacillus megaterium* de Bary, *B. licheniformis* SKG1 и SKG4, *B. subtilis* SKG9, *Alkalihalophilus pseudofirmus* DSM 8715, а также *L. macroides* SKG7. Большая часть выявленных фило типов потенциальных кальцинирующих бактерий родственна штамму *L. macroides* SKG7 (табл. 2) с достаточно высокой солеустойчивостью. Эти фило типы были обнаружены в микробных сообществах сухой почвы плато Устюрт (образец K08), анаэробного слоя донных отложений озера Судочье (K21), а также в пресной термальной воде из скважины, пробуренной в бывшем дне Аральского моря на глубину до 400 м (K01), и в микробных сообществах, ассоциированных с изливом этой воды на засоленную почву (микробные маты и донные отложения термального ручья (K02 и K04)). Интересно, что в микробном сообществе донного осадка ручья с термальной пресной водой наблюдалась максимальная представленность фило типов потенциальных кальцинирующих бактерий, родственных галоалкалофильному штамму *A. pseudofirmus* DSM 8715 и солеустойчивому *L. macroides* SKG7. Описание всех упомянутых образцов и относительная представленность в них искомым фило типов кальцинирующих бактерий даны в табл. 2. Ни один из этих фило типов не был доминирующим в указанных сообществах, доля какого-либо одного из них не превышала 0.87% филогенетического разнообразия сообщества. Это неудивительно, учитывая гетеротрофный тип питания кальцинирующих бактерий и их зависимость от конечного продукта биодegradации азотсодержащих соединений (мочевина), а значит, от активности других многочисленных деструкторов органического вещества в сообществе. Проанализированные нами микробные сообщества, содержащие фило типы потенциальных кальцинирующих микроорганизмов, оказались довольно разнообразными (рис. 2). Сообщество термальной воды представлено, главным образом, γ -протеобактериями рода *Thiobacillus*, а также некультивируемыми группами уровня новых родов внутри семейств *Hydrogenophilaceae* и *Rhodocyclaceae*, составляющими, в общей сложности, 71% всех прочтений гена 16S рРНК. Также, существенную часть (7%) составляют разнообразные представители филума *Bacillota* (ранее *Firmicutes*) (рис. 2). Сообщества зеленого мата, отобранного на изливе скважины, и донных осадков термального ручья, идущего от нее, гораздо разнообразнее. В сообществе мата было представлено 88 различных фило типов α - и γ -протеобактерий (всего 40% сообщества), 21 фило тип цианобактерий (16% сообщества), 40 фило тип планктомицетов (7% сообщества), а 20% разнообразия этого сообщества составляли нитрифицирующие бактерии единственного фило типа, относящегося к роду *Nitrospira*. Сообщество дон-

ного осадка термального ручья представлено 65-ю фило типами α - и γ -протеобактерий, которые составляли всего 35% его разнообразия. Кроме того, существенные доли разнообразия этого микробного сообщества составляли микроводоросли, детектируемые по хлоропластам (16% прочтений гена 16S рРНК), а также различные бактерии филумов *Desulfobacterota* (9%), *Chloroflexota* (15%, 37 фило типов) и *Bacillota* (бывший *Firmicutes*, 8%). Последний филум представлен в этом сообществе 16-ю фило типами, два из которых близкородственны кальцинирующим штаммам *L. macroides* SKG7 и *A. pseudofirmus* DSM 8715. Микробное сообщество почвы плато Устюрт в точке нашего пробоотбора представлено, главным образом, актинобактериями (филум *Actinomycetota*, 51% всех прочтений гена 16S рРНК, 55 фило типов), α - и γ -протеобактериями (всего 22%), *Chloroflexota* (7%, 28 фило типов), *Bacteroidota* (6%, 27 фило типов). В донных отложениях озера Судочье, напротив, доминировали α - и γ -протеобактерии (26% сообщества) и *Desulfobacterota* (19%); ниже была представленность в этой эконише бактерий филума *Bacteroidota* (8%) и цианобактерий (7%), хотя эти филумы представляли 44 и 17 фило типов соответственно (рис. 2). Представители различных таксонов филума *Bacillota* составляли порядка 4% микробного сообщества донных осадков озера Судочье, один из этих фило типов имел высокую гомологию гена 16S рРНК с кальцинирующими штаммами *B. subtilis* SKG2,3,5,6,9 (табл. 2).

Полученные нами данные показали широкую распространенность микроорганизмов, обладающих уреазной активностью и способных индуцировать образование кальцита, в самых разнообразных экосистемах Южного Приаралья — в засоленных почвах, донных отложениях соленого озера, пресных термальных водах. Обнаружение кальцинирующих микроорганизмов в филогенетически разнообразных микробных сообществах подтверждает отмечавшуюся ранее тенденцию приуроченности этих прокариот к богатым органикой экосистемам, в которых комплексная активность многих деструкторов органического вещества, в том числе, экстремофильных, обеспечивает кальцинирующие штаммы источниками углерода, энергетическими субстратами и защитой от неблагоприятных факторов среды, в частности, за счет секреции осмолитов (Galinski et al., 1994; Jebbar, 1997; Panosyan et al., 2018; Kalenov et al., 2020).

Выделение в чистую культуру четырех новых штаммов кальцинирующих уробактерий из 18 образцов почвы и детекция фило типов таких бактерий в 5 из 28 проанализированных микробных сообществ говорит о высоком потенциале использования экстремальных экосистем Приаралья как источника новых биотехнологически ценных прокариот для разработки технологий биоцементи-

Таблица 2. Природные образцы, в которых молекулярно-экологическими методами были детектированы филогенетические типы, родственные известным кальцинирующим микроорганизмам

Образец	Описание	Референтный штамм	Сходство последовательностей 16S рРНК, %	Номера филогенов (ASV), родственных референтным штаммам	Таксономическое положение ASV (<i>Bacilli</i> ; <i>Bacillales</i> ...)	Относительная представленность ASV в сообществе, %
K01	Пресная термальная вода из скважины в дне Аральского моря (41°C, pH 7.0)	<i>L. macroides</i> SKG7	98.8	ASV1050	<i>Planococcaceae</i> ;	0.19
			98.8	ASV1314	<i>Planomicrobium/Planococcus</i>	0.21
K02	Зеленый мат с трубы на изливе скважины	<i>B. megaterium</i> de Bary ATCC 14581	100.0	ASV919	<i>Bacillaceae</i> ; <i>Bacillus</i>	0.23
K04	Черный осадок из ручья термальной воды, в 50 м от скважины	<i>L. macroides</i> SKG7 <i>A. pseudofirmus</i> DSM 8715	99.8	ASV1667	<i>Planococcaceae</i> ;	0.16
			99.2	ASV408	<i>Psychrobacillus/Planococcus</i>	0.87
			98.8	ASV988	<i>Bacillaceae</i> uncultured	0.64
K08	Сухая почва со склона плато Устюрт	<i>B. licheniformis</i> SKG1, SKG4 <i>A. pseudofirmus</i> DSM 8715	100.0	ASV1142	<i>Bacillaceae</i> ; <i>Bacillus</i>	0.42
			98.8	ASV2576	<i>Bacillaceae</i> uncultured	0.10
K21	Черный рыхлый донный осадок оз. Судочье (глубина под поверхностью осадка 15 см)	<i>B. subtilis</i> SKG2, SKG3, SKG5, SKG6, SKG9	99.6	ASV1742	<i>Bacillaceae</i> ; <i>Bacillus</i>	0.15

рования. Сравнительно низкая скорость кальцинирования в культурах выделенных нами штаммов указывает как на необходимость подбора оптимальных для них условий роста, так и на важность продолжения поиска наиболее активных кальцинирующих микроорганизмов в ранее неисследованных экстремофильных микробных сообществах экосистем Аралкума и Приаралья. Дальнейшие работы должны быть направлены на выделение таких организмов в чистые культуры и оценку биотехнологической значимости новых изолятов. Следует отметить, что применение биоцементирующих микробных препаратов является особенно перспективным для районов с повышенной сейсмичностью, где частота землетрясений, особенно мелких, высока, что приводит к повышенному и ускоренному износу железобетонных конструкций. В этой связи, кальцинирующие микроорганизмы Аральского региона с потенциально высокой устойчивостью не только к солености

среды, но и к высушиванию, высоким температурам и резким температурным контрастам, а также к относительно высоким дозам солнечного излучения, могут стать основными кандидатами на разработку биоцементирующих препаратов для Узбекистана и других регионов мира с резко континентальным аридным климатом, учитывая сходство физико-химических условий, формирующихся на засоленных засушливых почвах Аралкума и на поверхности бетонных строений в этих регионах.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность за помощь в отборе проб А.И. Кулонову и Ж.Э. Алимову.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Основные работы выполнены при поддержке проекта А-ФА-2021-428 "Микробные сообщества совре-

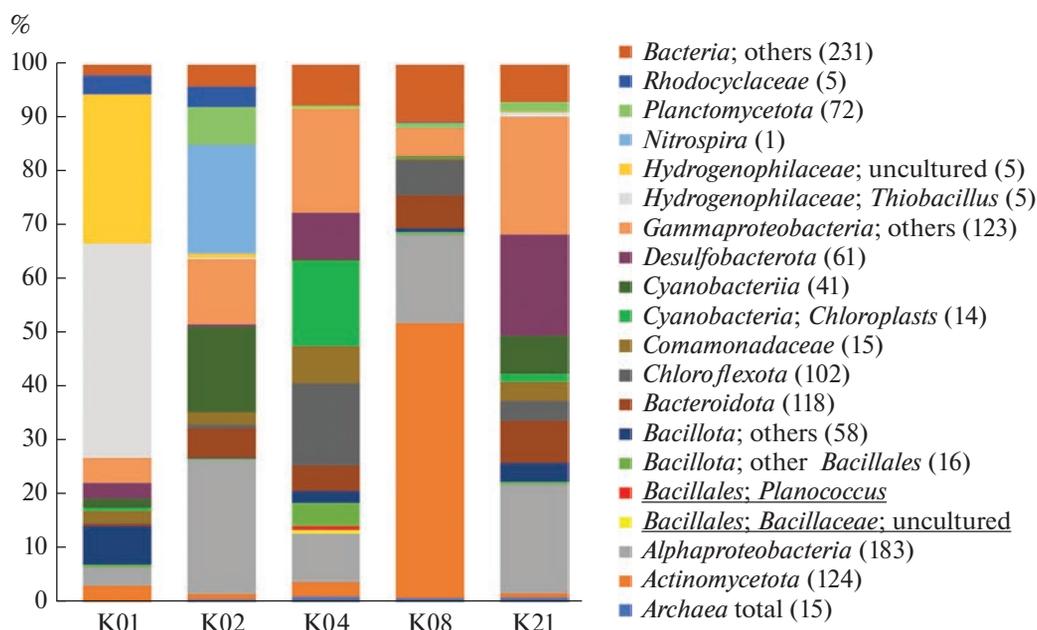


Рис. 2. Филогенетический состав по результатам профилирования по гену 16S рРНК микробных сообществ, в которых были детектированы филоциты, родственные известным кальцинирующим микроорганизмам. На оси X приведена нумерация образцов по табл. 2; K01 — термальная вода из скважины; K02 — зеленый мат на изливе скважины; K04 — донный осадок термального ручья, вытекающего из скважины; K08 — почва плато Устюрт; K21 — анаэробная зона донного осадка оз. Судочье. Подчеркнуты филоциты, близкородственные известным кальцинирующим штаммам бацилл и имеющие относительную представленность около 1%, которая подается визуализации на диаграмме. В скобках рядом с названиями таксонов указано суммарное количество их филоцитов (ASV), детектированное во всех проанализированных образцах.

менного Арала и зон Приаралья: разнообразие, свойства и биотехнологический потенциал». Работы по анализу результатов секвенирования были выполнены при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют отсутствие конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Батяновский Э.И., Гуриченко Н.С., Корсун А.М. Структура, непроницаемость и долговечность цементного бетона // Наука и техника. 2022. Т. 21. № 1. С. 19–27.
- Гаврилов С.Н., Потапов Е.Г., Прокофьева М.И., Ключкина А.А., Меркель А.Ю., Маслов А.А., Заварзина Д.Г. Разнообразие новых некультивируемых прокариот в микробных сообществах минеральных подземных вод Ессентукского месторождения // Микробиология. 2022. Т. 91. С. 32–49.
- Gavrilov S.N., Prokofeva M.I., Klyukina A.A., Merkel A.Y., Zavarzina D.G., Potapov E.G., Maslov A.A. Diversity of nov-

el uncultured prokaryotes in microbial communities of the Yessentukskoye underground mineral water deposit // Microbiology (Moscow). 2022. V. 91. P. 28–44.

Давидюк А.А., Рыбнов Д.С., Гоглев И.Н., Соколов К.Ю., Кустикова Ю.О. Математическое моделирование динамики процесса массопереноса при коррозии цементных бетонов // Промышленное и гражданское строительство. 2021. № 2. С. 34–41.

Давлетмуратова В.Б. Развитие процессов опустынивания и галофитизация естественной растительности в дельте и низовьях Амударьи // Экономика и социум. 2017. Т. 37. № 6-1. С. 519–522.

Большое Аральское море в начале XXI в.: физика, биология, химия / Под ред. Завьялова П.О. и др. М.: Наука, 2012. 232 с.

Калёнов С.В., Градова Н.Б., Сивков С.П., Агалакова Е.В., Белов А.А., Суясов Н.А., Хохлачёв Н.С., Панфилов В.И. Препарат на основе бактерий, выделенных из гиперсоленых сред, для улучшения функциональных и защитных характеристик бетона // Биотехнология. 2020. Т. 36. № 4. С. 21–28.

Almajed A., Lateef M.A., Moghal A.A.B., Lemboye K. State-of-the-art review of the applicability and challenges of microbial-induced calcite precipitation (MICP) and enzyme-induced calcite precipitation (EICP) techniques for geotechnical and geoenvironmental applications // Crystals. 2021. V. 11. Art. 370.

Alonso M.J.C., Ortiz C.E.L., Perez S.O.G. et al. Improved strength and durability of concrete through metabolic activ-

- ity of ureolytic bacteria // Environ. Sci. Pollut. Res. 2018. V. 25. P. 21451–21458.
- Arias D., Cisternas L.A., Miranda C., Rivas M. Bioprospecting of ureolytic bacteria from Laguna Salada for biomineralization applications // Front. Bioeng. Biotechnol. 2019. V. 18. Art. 209.
- Atkinson D.E. Functional roles of urea synthesis in vertebrates // Physiol. Zool. 1992. V. 65. P. 243–267.
- Chaparro-Acuña S.P., Becerra-Jiménez M.L., Martínez-Zambrano J.J., Rojas-Sarmiento H.A. Soil bacteria that precipitate calcium carbonate: Mechanism and applications of the process // Acta Agronomica. 2020. V. 67. P. 277–288.
- DeJong J.T. Biogeochemical processes and geotechnical applications: progress, opportunities and challenges // Geotechnique. 2013. V. 63. P. 287–301.
- Ekprasert J., Fongkaew I., Chainakun P. et al. Investigating mechanical properties and biocement application of CaCO₃ precipitated by a newly-isolated *Lysinibacillus* sp. WH using artificial neural networks // Sci. Rep. 2020. V. 10. Art. 16137.
- Frankel R.B., Bazylinski D.A. Biologically induced mineralization by bacteria // Rev. Mineral. Geochem. 2003. V. 54. P. 95–114.
- Galinski E.A., Trüper H.G. Microbial behaviour in salt-stressed ecosystems // FEMS Microbiol. Rev. 1994. V. 15. P. 95–108.
- Garabito M.J., Márquez M.C., Ventosa A. Halotolerant *Bacillus* diversity in hypersaline environments // Can. J. Microbiol. 1998. V. 44. P. 95–102.
- Jebbar M. Ectoine functions as an osmoprotectant in *Bacillus subtilis* and is accumulated via the ABC-transport system OpuC // FEMS Microbiol. Lett. 1997. V. 154. P. 325–330.
- Joshi S., Goyal S., Mukherjee A., Reddy M.S. Microbial healing of cracks in concrete: a review // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2017. V. 44. P. 1511–1525.
- Joshi S., Goyal S., Reddy M.S. Influence of biogenic treatment in improving the durability properties of waste amended concrete: a review // Constr. Build. Mater. 2020. V. 263. Art. 120170.
- Kalenov S.V., Belov A.A., Lyapkin E.I., Sachavskii A.A., Panfilov V.I. Problems of non-sterile cultivation of extremely halophilic microorganisms // Int. Multidisc. Sci. Geo-Conference: SGEM. 2020. V. 20. P. 105–112.
- Karplus P.A., Pearson M.A., Hausinger R.P. 70 years of crystalline urease: what have we learned? // Acc. Chem. Res. 1997. V. 30. P. 330–337.
- Leeprasert L., Chonudomkul D., Boonmak C. Biocalcifying potential of ureolytic bacteria isolated from soil for biocementation and material crack repair // Microorganisms. 2022. V. 10. Art. 963.
- Micklin P. The Aral Sea disaster // Annu. Rev. Earth Planet. Sci. 2007. V. 35. P. 47–72.
- Mutitu K.D., Munyao M.O., Wachira M.J., Mwirichia R., Thiong'o K.J., Marangu M.J. Effects of biocementation on some properties of cement-based materials incorporating *Bacillus* species bacteria – a review // J. Sustain. Cem. 2019. V. 8. P. 309–325.
- Omeregie A.I., Palombo E.A., Nissom P.M. Bioprecipitation of calcium carbonate mediated by ureolysis: a review // Environ. Engineer. Res. 2021. V. 26. Art. 200379.
- Osinubi K.J., Eberemu A.O., Ijimdiya T.S., Yakubu S.E., Gadzama E.W., Sani J.E., Yohanna P. Review of the use of microorganisms in geotechnical engineering applications // SN Applied Sciences. 2020. V. 2. № 2. P. 1–19.
- Pacheco V.L., Bragagnolo L., Reginatto C. et al. Microbially induced calcite precipitation (MICP): review from an engineering perspective // Geotech. Geol. Eng. 2022. V. 40. P. 2379–2396.
- Panosyan H., Hakobyan A., Birkeland N.K., Trchounian A. *Bacilli* community of saline-alkaline soils from the Ararat Plain (Armenia) assessed by molecular and culture-based methods // Syst. Appl. Microbiol. 2018. V. 41. P. 232–240.
- Vahabi A., Ramezani-pour A., Sharafi H., Zahiri H., Vali H., Noghabi K. Calcium carbonate precipitation by strain *Bacillus licheniformis* AK01, newly isolated from loamy soil: a promising alternative for sealing cement-based materials // J. Basic Microbiol. 2015. V. 55. P. 105–111.
- Ventosa A., Márquez M.C., Garabito M.J., Arahal D.R. Moderately halophilic Gram-positive bacterial diversity in hypersaline environments // Extremophiles. 1998. V. 2. P. 297–304.

Calcinating Bacteria in Extreme Ecosystems of the Southern Aral Region

K. V. Kondrasheva¹, A. A. Umruzokov¹, S. V. Kalenov², A. Yu. Merkel³, N. A. Chernykh³,
A. I. Slobodkin³, S. N. Gavrillov³, *, and K. D. Davranov¹

¹Institute of Microbiology, Uzbekistan Academy of Sciences, Tashkent, 100128 Uzbekistan

²Department of Biotechnology, Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow, 125480 Russia

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

*e-mail: sngavrillov@gmail.com

Received December 23, 2022; revised January 23, 2023; accepted January 23, 2023

Abstract—The processes of microbially induced precipitation of calcium carbonates are widespread in natural environments and are an important part of the biogeochemical carbon cycle. These processes comprised the basis of new “biocementation” technologies, which are extensively developing worldwide during the last decade. These technologies are aimed at the construction of novel “self-healing” construction materials, as well as at maintaining the strength of various buildings and structures. Since the optimal conditions for calcite formation are high salinity and alkalinity of the environment, the search for calcifying microorganisms in a va-

riety of ecosystems, including extreme ones, is of interest. At present, many strains of halophilic and halotolerant bacteria, that induce calcination, have already been isolated and tested in pilot industrial processes. Most of these bacteria possess urease activity, which is the main contributor to the binding of calcium ions to insoluble calcium carbonate. A wide variety of natural ecosystems with optimal conditions for the development of calcifying urobacteria, as well as the economic demand for biocementation technologies, stimulate interest in the search for more and more novel strains of these microorganisms. One of the promising resources to be screened for such organisms is the ecosystem of the drying Aral Sea and the adjacent desert and semi-desert Aral region. Here we present the results of screening various extreme ecosystems of the Aral region for the presence of calcifying microorganisms. We obtained 28 pure cultures of heterotrophic aerobic bacteria from samples of plant residues and soils of the Aral Sea region, 4 of which had urease and calcifying activities. Their activities were compared with those of the strains presently used to produce biocementing mixtures. We have identified the phlotypes of putative calcifying microorganisms in microbial communities of desert soil, thermal waters, and bottom sediments of a salt lake, and described the phylogenetic diversity of these communities. Our results indicated the wide distribution of calcifying microorganisms in the ecosystems of the South Aral region and highlighted the expediency of screening them for the new biotechnologically relevant strains of these organisms.

Keywords: microbially induced calcite precipitation, extreme ecosystems, Aral Sea, biocementation