

ISSN 0026-3656

Том 92, Номер 5

Сентябрь - Октябрь 2023



МИКРОБИОЛОГИЯ

www.sciencejournals.ru



СОДЕРЖАНИЕ

Том 92, номер 5, 2023

ОБЗОРЫ

Коллекции микроводорослей и цианобактерий в России: современное состояние, проблемы и перспективы развития

А. Д. Темралеева, М. А. Синетова

429

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Ancylobacter crimeensis sp. nov. — новый вид аэробных метилотрофных бактерий, выделенных из филлосферы дуба

А. А. Белова, Е. Н. Капарулина, Н. В. Агафонова, Д. С. Груздев, Д. С. Копицын, А. В. Мачулин, Н. В. Доронина

441

Семь новых видов актиномицетов рода *Kribbella* с уникальными полимерами клеточной стенки и дополненное и исправленное описание рода *Kribbella*

А. Н. Автух, Е. В. Арискина, Л. М. Барышникова, Е. М. Тульская, Н. В. Потехина, А. С. Шашков, Н. Е. Сузина, Н. В. Присяжная, И. П. Стародумова, О. В. Василенко, Л. В. Дорофеева, Л. И. Евтушенко

453

Молекулярно-генетический и функциональный анализ сигнальной системы Rap-Phg плазмиды pBS72 природных бактерий *Vacillus subtilis*

А. С. Гуринович, М. А. Титок

467

Образование метана в пресном озере умеренного пояса в период интенсивного цветения цианобактерий

А. Ю. Каллистова, А. И. Косякова, И. И. Русанов, В. В. Кадников, А. В. Белецкий, Д. Д. Коваль, С. К. Юсупов, И. Зеккер, Н. В. Пименов

477

Совместимые вещества, накапливаемые клетками штамма *Glutamicibacter* sp. SMB32 в ответ на действие абиотических факторов окружающей среды

Л. Н. Ананьина, А. А. Горбунов, Е. А. Шестакова, А. А. Пьянкова, Е. Г. Плотникова

490

Адаптационные свойства изолята *Arthrobacter agilis* wb28 из пшеничных отрубей

Н. Ю. Шарова, А. О. Причепя, О. П. Свердловя, А. А. Принцева

500

Особенности биодеструкции композитных материалов на основе полиэтилена высокой плотности и крахмала

Т. Н. Сулова, И. И. Салахов, В. Н. Никонова, Г. В. Гилаева, О. М. Трифонова

510

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

Высокая эффективность удаления патогенных микроорганизмов при очистке коммунальных сточных вод города Москвы

Ш. А. Бегматов, А. Г. Дорофеев, Н. В. Пименов, А. В. Марданов, Н. В. Равин

521

Особенности деструкции полилактида в присутствии представителей рода *Vacillus*

В. В. Миронов, Е. С. Трофимчук, В. В. Острикова, А. В. Плуталова, М. А. Москвина, А. А. Щелушкина, Е. В. Черникова, Д. Ш. Соколова

527

Contents

Vol. 92, No. 5, 2023

Reviews

- Collections of Microalgae and Cyanobacteria in Russia: Present State, Problems, and Prospects
A. D. Temraleeva and M. A. Sinetova 429
-

Experimental Articles

- Ancylobacter crimeensis* sp. nov., a New Species of Aerobic Methylophilic Bacteria Isolated from Oak Phyllosphere
A. A. Belova, E. N. Kaparullina, N. V. Agafonova, D. S. Grouzdev, D. S. Kopitsyn, A. V. Machulin, and N. V. Doronina 441
- Seven New Actinobacterial Species of the Genus *Kribbella* with Unique Cell Wall Glycopolymers, and Emended Description of the Genus *Kribbella*
A. N. Avtukh, E. V. Ariskina, L. M. Baryshnikova, E. M. Tul'skaya, N. V. Potekhina, A. S. Shashkov, N. E. Suzina, N. V. Prisyazhnaya, I. P. Starodumova, O. V. Vasilenko, L. V. Dorofeeva, and L. I. Evtushenko 453
- Molecular Genetic and Functional Analysis of the Rap-Phr Signal System of the Plasmid pBS72 of *Bacillus subtilis* Isolates
A. S. Gurinovich and M. A. Titok 467
- Methane Production in a Temperate Freshwater Lake during an Intense Cyanobacterial Bloom
A. Yu. Kallistova, A. I. Kosyakova, I. I. Rusanov, V. V. Kadnikov, A. V. Beletskii, D. D. Koval', S. K. Yusupov, I. Zekker, and N. V. Pimenov 477
- Compatible Solutes Accumulated by *Glutamicibacter* sp. Strain SMB32 in Response to Abiotic Environmental Factors
L. N. Anan'ina, A. A. Gorbunov, E. A. Shestakova, A. A. Pyankova, and E. G. Plotnikova 490
- Adaptive Properties of *Arthrobacter agilis* Strain wb28 Isolated from Wheat Bran
N. Yu. Sharova, A. O. Prichepa, O. P. Sverdlova, and A. A. Printseva 500
- Biodegradation Patterns of Composite Materials Based on High-Density Polyethylene and Starch
T. N. Suslova, I. I. Salakhov, V. N. Nikonorova, G. V. Gilaeva, and O. M. Trifonova 510
-

Short Communications

- High Efficiency of Removal of Pathogenic Microorganisms at Wastewater Treatment Plants in the City of Moscow
Sh. A. Begmatov, A. G. Dorofeev, N. V. Pimenov, A. V. Mardanov, and N. V. Ravin 521
- Poly lactide Degradation in the Presence of Members of the Genus *Bacillus*
V. V. Mironov, E. S. Trofimchuk, V. V. Ostrikova, A. V. Plutalova, M. A. Moskvina, A. A. Shchelushkina, E. V. Chernikova, and D. S. Sokolova 527
-
-

КОЛЛЕКЦИИ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ И ЦИАНОБАКТЕРИЙ В РОССИИ: СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ, ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ¹

© 2023 г. А. Д. Темралева^{а, *}, М. А. Синетова^б

^аФИЦ “Пушкинский научный центр биологических исследований РАН”, Пушкино, 142290 Россия

^бИнститут физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва, 127276 Россия

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

Поступила в редакцию 05.05.2023 г.

После доработки 29.05.2023 г.

Принята к публикации 30.05.2023 г.

Биологические коллекции являются систематизированными хранилищами живых культур или фиксированных препаратов и обеспечивают исследователей необходимым материалом как для фундаментальных и прикладных работ, так и для образовательной деятельности. Коллекционный образец — единственное достоверное подтверждение существования живого организма во времени и пространстве, многофункциональность которого позволяет изучать его и как часть биологического разнообразия, и как биоресурс для развития биотехнологий. Микроводоросли — это древняя экологическая группа различных в таксономическом плане организмов (цианобактерии, зеленые, диатомовые, желто-зеленые, харофитовые и др.), обладающих уникальной физиологией, широкой экологической валентностью и пластичностью, что позволяет им доминировать в различных экологических местообитаниях. Они стали не только эволюционно успешной группой микроорганизмов, но и коммерчески востребованы в мониторинге окружающей среды, сельском хозяйстве, биоэнергетике, фармацевтической и пищевой промышленности. В статье приводится анализ данных независимого анкетирования 21 российской коллекции микроводорослей и цианобактерий. Опрос включал информацию об основных характеристиках коллекции (фонд, профиль, методы, документооборот и др.), возникающих проблемах и путях их решений.

Ключевые слова: коллекции, микроводоросли, цианобактерии, биоресурсы, анкетирование

DOI: 10.31857/S0026365623600232, **EDN:** LAHZSR

Биологические коллекции, несомненно, являются надежной основой фундаментальной науки и служат, в первую очередь, для изучения биоразнообразия и разработки системы органического мира. Цианобактерии и микроводоросли являются не только неотъемлемым компонентом биоразнообразия различных экосистем и модельными организмами в экологии, физиологии растений, фотобиологии, геномной инженерии, но и широко применяются для решения ряда биотехнологических задач (аквакультура, биотопливо, биоремедиация, производство удобрений и биологически активных веществ противовирусного, антибактериального, фунгицидного действия и др.). Коллекции культур микроводорослей и цианобактерий — это организованные и систематизированные хранилища живых культур или фиксированных препаратов, позволяющие использовать разнообразие

этих организмов для фундаментальных и прикладных работ. Коллекции обеспечивают долгосрочное сохранение и распространение штаммов с известной идентичностью, предоставляют информацию для их успешного культивирования и предлагают разнообразные услуги промышленным, научным и образовательным организациям. Подобные депозитарии чрезвычайно важны для развития таких прикладных направлений как фармацевтика, медицина и персонализированные подходы к сохранению здоровья человека, генетические технологии, пищевая промышленность, биоэнергетика, экологичное земледелие.

Для обеспечения сохранения и развития коллекций в соответствии с мировыми стандартами, а также эффективного и рационального их использования в интересах реализации Стратегии научно-технологического и экономического развития России сегодня наблюдается тенденция к интеграции коллекций одинакового типа по сетевому принципу организации под эгидой создава-

¹ Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0026365623600232 для авторизованных пользователей.

емых крупных биоресурсных центров (Хлесткина и соавт., 2022). Однако эта идея совсем не нова. Координация деятельности отечественных альгологических коллекций началась в 1986 г. с совместной работы по созданию информационного банка данных по штаммам микроводорослей (Владимирова, 1991). В результате было опубликовано три сводных каталога: “Коллекции микроводорослей в СССР” (1988), “Index of cultures in the microalgal collections in the USSR, Bulgaria, Czechoslovakia, Germany, Mongolia and Vietnam” (1991) и “Каталог культур микроводорослей в коллекциях СССР” (1991). После распада Советского Союза данная деятельность была приостановлена. В новейшей истории России интерес к коллекционному делу возрос после утверждения Правительством Российской Федерации плана мероприятий (“дорожной карты”) “Развитие биотехнологий и геномной инженерии” (Распоряжение Правительства РФ от 18 июля 2013 г. № 1247-р), в котором значился пункт 8 “Утверждение комплекса мер по системной поддержке биологических коллекций микроорганизмов и режима доступа к ним”. В 2014 г. по Распоряжению ФАНО России была создана рабочая группа по подготовке предложений для реализации мероприятий данного пункта, в состав которой вошли и авторы данной статьи. В 2017 г. был создан информационный портал “Биоресурсные коллекции научных организаций” (www.biores.cytogen.ru), который в настоящее время перестал обновляться. В 2022 г. на VI Всероссийской научной конференции с международным участием “Водоросли: проблемы таксономии и экологии, использование в мониторинге и биотехнологии”, проходившей на Звенигородской биологической станции им. С.Н. Скадовского, был проведен тематический круглый стол, посвященный коллекциям микроводорослей и цианобактерий (куратор М.А. Синетова, ИФР РАН; докладчик А.Д. Темралеева, ИФХиБПП РАН). Руководители официальных и рабочих российских коллекций микроводорослей и цианобактерий обсудили проблемы их поддержания и развития и одобрили идею анкетирования в качестве первого шага по координации работы альгологических коллекций и возможного дальнейшего сотрудничества. Данная работа является личной инициативой авторов статьи, которые разработали анкету (табл. S1) и разослали ее всем давшим согласие на опрос респондентам. Подобранные вопросы позволили не только оценить текущее состояние коллекций микроводорослей и цианобактерий и перспективы их развития, но и выявить проблемы и пути улучшения коллекционной деятельности в России.

Всего было разослано в действующие официальные и рабочие коллекции микроводорослей и цианобактерий 27 приглашений к участию в опро-

се, из них не получено обратной связи от коллекции водорослей Сибири (АССС) Сибирского федерального университета и коллекции микроводорослей в ЦКП Ресурсная коллекция “Морской биобанк” Национального научного центра морской биологии Дальневосточного отделения РАН. Еще четыре коллекции по тем или иным причинам отказались участвовать в опросе (коллекции MSU_ALG_DMA, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова; BOROK, Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН; коллекция мутантных штаммов водорослей, Институт фундаментальных проблем биологии РАН и коллекция водорослей кафедры биологии растений, селекции и семеноводства, микробиологии Вятского государственного агротехнологического университета). В результате анкетирования прошли руководители или кураторы 21 коллекции микроводорослей и цианобактерий, часть из которых находится в одном учреждении (табл. 1). Последнее связано с оптимизацией и объединением многих научных институтов в более крупные федеральные исследовательские центры. Как правило, коллекции микроводорослей и цианобактерий учреждены в научных организациях, в вузах имеется только четыре коллекции микроводорослей и цианобактерий.

подавляющее большинство коллекций созданы за последние два десятилетия, и только четыре из них (BAC, CALU, IPPAS, LABIK) организованы еще в прошлом веке. Всего в каталоге Всемирной федерации коллекций культур (World Federation for Culture Collections, WFCC) по состоянию на 2023 г. зарегистрировано 29 коллекций из России, из них 6 – альгологические, принявшие участие в опросе (<https://ccinfo.wdcm.org/>). На портале “Научно-технологическая инфраструктура Российской Федерации” (<https://ckp-rg.ru/>) в качестве уникальных научных установок (УНУ) зарегистрированы 6 коллекций: IPPAS, ACSSI, СКСМ, SYKOA в составе УНУ “Научный гербарий Института биологии Коми научного центра Уральского отделения РАН (SYKO)”, коллекция цианопрокариот в составе УНУ “Гербарий Полярно-альпийского ботанического сада-института (КРАВГ)”, коллекция агрономически полезных цианобактерий в составе УНУ “Крымская коллекция микроорганизмов”. Еще две – в качестве центров коллективного пользования (ЦКП): IRK-A в составе ЦКП “Биоресурсный центр СИФИБР СО РАН” и IBSS в составе ЦКП “Коллекция гидробионтов мирового океана”. Почти поровну разделились мнения об учредителе коллекции: 10 респондентов считают учредителем организацию или подразделение, 9 – физическое лицо, остальные затруднились ответить на этот вопрос.

Наибольшим фондовым объемом (4558 штаммов) обладает коллекция лаборатории молеку-

Таблица 1. Российские коллекции микроводорослей и цианобактерий, принявшие участие в анкетировании (в алфавитном порядке)

Наименование, акроним	Наименование организации, город	Год образования	Номер коллекции при регистрации в WFCC, тип и номер коллекции при регистрации на https://ckp-rf.ru/	Ссылка на сайт коллекции
Альгологическая коллекция ИФХиБПП РАН, ACSSI	Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН, Пушкино	2016	WFCC 1132, УНУ 761664	http://acssi.org/
Байкальская альгологическая коллекция, ВАС	Лимнологический институт, Иркутск	1998	–	–
Коллекция агрономически полезных цианобактерий	ФГБУН «НИИ сельского хозяйства Крыма», Симферополь	2012	УНУ 507484	https://niishk.site/unikalnye-nauchnye-ustanovki/unu-kollekciya-mikroorganizmov/
Коллекция биотехнологически значимых микроводорослей, NAMSU	Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва	2018	–	–
Коллекция водорослей БИН РАН, LAVIK	Ботанический институт РАН им. В.Л. Комарова, Санкт-Петербург	1985	–	–
Коллекция водорослей и цианобактерий БГПУ, ВСАС	Башкирский государственный педагогический университет имени М. Акмуллы, Уфа	2012	WFCC 1023	https://bcac.site/
Коллекция диатомовых водорослей Евро-Арктического региона в составе гербария ИППЭС КНЦ РАН, INEP	Институт проблем промышленной экологии Севера КНЦ, Апатиты	2012	–	https://iner.ksc.ru/index.php/mega/others-features/article-formats
Коллекция диатомовых водорослей Мирового океана (World Ocean Diatoms Collection), WODC	Карадagsкая научная станция им. Т.И. Вяземского – природный заповедник РАН, филиал Федерального государственного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН», Феодосия	2022	–	https://ibss-ras.ru/about-ibss/structure-ibss/tsentry-kollektivnogo-polzovaniya/col-lection-of-diatoms-of-world-ocean/

Таблица 1. Продолжение

Наименование, акроним	Наименование организации, город	Год образования	Номер коллекции при регистрации в WFCC, тип и номер коллекции при регистрации на https://cfr-rg.ru/	Ссылка на сайт коллекции
Коллекция живых штаммов микроводорослей в составе научного гербария Института биологии Коми научного центра Уральского отделения РАН (SYKO), SYKOA	Институт биологии ФИЦ Коми НЦ УРО РАН, Сыктывкар	2010	WFCC 1125, УНУ 507466	https://ib.komisc.ru/sykoa
Коллекция культур водорослей в составе ЦКП "Биоресурсный центр СИФИБР СО РАН", IRK-A	Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск	2017	ЦКП 478196	http://www.sifibr.irk.ru/collec-tion.html
Коллекция культур микроводорослей и цианобактерий ЦКП "Коллекция гидробионтов Мирового океана", IBSS	ФИЦ "Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН", Севастополь	2000	WFCC 1201, ЦКП 466047	https://ibss-ras.ru/about-ibss/structure-ibss/tsentry-kollektivnogo-polzovaniya/col-lection-of-hydrobionts-of-world-ocean/index.php
Коллекция лаборатории молекулярной систематики водных растений ИФР РАН	Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва	2011	—	—
Коллекция микроводорослей и цианобактерий, IPPAS	Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва	1958	WFCC 596, УНУ 507532	http://cellreg.org/ecophysiology-of-microalgae/
Коллекция цианобактерий и водорослей лаборатории ботаники ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН, VSA	Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии ДВО РАН, Владивосток	2018	—	—
Коллекция цианобактерий, водорослей и паразитов водорослей в составе ресурсного центра "Культирование микроорганизмов", CALU	Научный парк Санкт-Петербургского государственного университета, Санкт-Петербург	1959	WFCC 461	https://researchpark.spbu.ru/col-lection-csem-rus/1628-csem-kollekciya-calu-rus

Таблица 1. Окончание

Наименование, акроним	Наименование организации, город	Год образования	Номер коллекции при регистрации в WFCC, тип и номер коллекции при регистрации на https://ckp-rg.ru/	Ссылка на сайт коллекции
Коллекция цианопрокариот лабораторий флоры и растительности в составе гербария Полярно-альпийского ботанического сада-института, КРАБГ	Полярно-альпийский ботанический сад-институт им. Н.А. Аврорина, Апатиты	2014	УНУ 499397	https://isling.org/cyano
Рабочая альтологическая коллекция научной лаборатории биотехнологий	Астраханский государственный университет им. В.Н. Тагичева, Астрахань	2010	–	–
Рабочая коллекция водорослей Е.С. Гусева	Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, Москва	2011	–	–
Рабочая коллекция галоалкалофильных цианобактерий лабораторий реликтовых микробных сообществ ИНМИ РАН	ФИЦ “Фундаментальные основы биотехнологий” РАН, Москва	2007	–	–
Рабочая коллекция живых культур каротиногенных микроводорослей ФИЦ ИнБЮМ в составе коллекции культур микроводорослей и цианобактерий (IBSS) ЦКП “Коллекция гидробионтов Мирового океана”, IBSSca	ФИЦ “Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН”, Севастополь	2002	–	–
Сетевая коллекция симбионтных микроорганизмов и их консорциумов, СКСМ	Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения РАН, Оренбург	2022	УНУ 3564372	https://ikvs.info/biobank/

Таблица 2. Характеристика фонда российских коллекций микроводорослей и цианобактерий

Общий фондовый объем			Количество типовых видов			Количество дублирующих образцов		Наличие каталога	
До 100 штаммов	От 100 до 500	Свыше 500	Нет	От 1 до 50	Более 50	Один	Два и более	Есть	Нет
8	9	4	11	7	3	0	21	16	5

лярной систематики водных растений ИФР РАН, но их оформление в виде каталога отсутствует. В целом, преобладают коллекции с небольшим (до 100 штаммов) или средним (до 500 штаммов) объемом фонда (табл. 2). При этом только 7 коллекций имеют более 50% фонда хранения, идентифицированного с помощью молекулярно-генетического анализа: ACSSI (78%), ВАС (60%), КРАВГ (61%), NAMSU (67%), VCA (77%), коллекция микроводорослей лаборатории молекулярной систематики водных растений ИФР РАН (55%) и рабочая коллекция Е.С. Гусева (100%). В большинстве коллекций типовые виды водорослей отсутствуют или представлены небольшим количеством штаммов. Дублирующие образцы в коллекциях представлены, как минимум, в двух повторностях. Развитие в учреждениях информационных технологий находится на недостаточно высоком уровне: только 12 коллекций из 21 имеют свой сайт, и 11 коллекций поддерживают информацию о коллекционных фондах в форме каталога в открытом доступе. Информацию о некоторых коллекциях также можно найти в виде отдельных статей в журналах или сборниках, например ACSSI (Москаленко и соавт., 2015), CALU (Pinevich et al., 2004), IBSSca (Данцюк и соавт., 2021), INEP (Боровичёв и соавт., 2018), IPPAS (Владимирова и соавт., 1991), КРАВГ (Melekhin et al., 2019), LABIK (Андреева, Лукницкая, 1991), SYKOA (Новаковская, Патова, 2012), WODC (Давидович и соавт., 2017).

Таксономический состав фондов опрошенных российских альгологических коллекций охватывает практически все известные группы водорослей, включая прокариотические цианобактерии и эукариотические зеленые, харофитовые, диатомовые, эустигматофитовые, желто-зеленые, золотистые, криптофитовые, эвгленовые, гаптофитовые, динофитовые и красные водоросли (табл. 3). Некоторые коллекции специализируются на определенных группах водорослей: IBSSca, LABIK – только на Chlorophyta; INEP, WODC – только на Bacillariophyta; КРАВГ, коллекция агрономическая коллекция цианобактерий, рабочая альгологическая коллекция научной лаборатории биотехнологий, рабочая коллекция галоалкалофильных цианобактерий лаборатории реликтовых микробных сообществ ИНМИ РАН – только на Суа-

nobacteria. Часть коллекций имеют в своем фонде представителей пяти и более отделов водорослей: ACSSI, CALU, IBSS, IPPAS, SYKOA, VCA и коллекция лаборатории молекулярной систематики водных растений ИФР РАН. Остальные занимают промежуточное положение. Кроме того, две из 21 коллекций – CALU и СКСМ – содержат в своих фондах помимо водорослей их паразитов (нефотосинтезирующих бактерий, протистов, микроскопических грибов и вирусов) и симбионтов (бактерий, архей и гетеротрофных протистов) соответственно.

Пресные водоемы являлись самым частым источником изоляции коллекционных культур водорослей (19 из 21 коллекций); далее шли почвы (15 из 21), биокорочки (13 из 21), морские водоемы (8 из 21) и снег и другие местообитания, например, лишайники, термальные источники, содовые и соленые озера, скальные ванны, обрастания камней, сок тополя и пр. (по 7 и 8 из 21 коллекции соответственно) (рис. 1.1). Две коллекции указали один профиль специализации, 8 коллекций – два, остальные – три и более, из них наиболее популярными были разнообразие и биотехнология – по 16 и 15 коллекций из 21 соответственно (рис. 1.2).

По данным анкетирования наиболее общепринятыми методами идентификации коллекционных экземпляров является морфологический и молекулярно-генетический анализы (20 и 18 коллекций соответственно), биохимический скрининг выполняют 8 коллекций из 21, ультраструктурный анализ – 2 из 21, и проверку на репродуктивную совместимость проводит только одна коллекция WODC (рис. 1.3). Результаты опроса подтвердили традиционный метод периодических пересевов в качестве основного и в большинстве случаев единственного метода поддержания коллекционных экземпляров (20 коллекций из 21). Это связано с простотой исполнения и дешевизной этого метода, хотя он достаточно времязатратный и не обеспечивает стабильного сохранения водорослей. Еще три российские коллекции микроводорослей и цианобактерий используют высушивание и две – приготовление постоянных препаратов. И только две коллекции (IPPAS и NAMSU) технически оснащены для реализации более современного и эффективного метода низкотемпературного хранения культур при $-70...-80^{\circ}\text{C}$ (рис. 1.4). Ни в

Таблица 3. Таксономический спектр фондов российских коллекций микроводорослей и цианобактерий по отделам

Коллекция	Bacillario	Charo	Chloro	Crypto	Cyano	Eugleno	Hapto	Mio	Ochro	Rhodo
ACSSI	1	12	303	0	97	0	0	0	11	0
Astr	0	0	0	0	8	0	0	0	0	0
BAC	0	0	20	0	30	0	0	0	0	0
CALU	3	0	473	0	510	3	0	0	0	3
Gusev	0	0	92	65	0	0	0	0	50	0
IBSS	16	0	62	0	16	0	6	11	2	2
IBSSca	0	0	87	0	0	0	0	0	0	0
IPPAS	0	0	214	0	187	1	0	0	8	20
INER	3700*	0	0	0	0	0	0	0	0	0
INMI	0	0	2	0	37	0	0	0	0	0
IRK-A	0	27	300	0	50	0	0	0	23	0
KPABG	0	0	0	0	310	0	0	0	0	0
LABIK	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0
Molsyst	4182	72	263	9	0	11	0	0	21	0
Simp	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0
SYKOA	0	57	307	26	50	1	0	0	44	0
VCA	122	11	158	0	78	0	0	0	10	0
WODC	500	0	0	0	0	0	0	0	0	0
СКСМ	2	0	29	0	3	0	0	0	0	0

Примечание. Bacillario – Bacillariophyta; Charo – Charophyta; Chloro – Chlorophyta; Crypto – Cryptista; Cyano – Cyanobacteria; Eugleno – Euglenozoa; Hapto – Haptophyta; Mio – Miozoa; Ochro – Ochrophyta, включая классы Chrysophyceae, Eustigmatophyceae и Xanthophyceae; Rhodo – Rhodophyta.

* Только постоянные препараты. BCAC, NAMSU – нет данных. Систематика водорослей дана согласно AlgaeBase (Guiry, Guiry, 2023).

Сокращения: Astr – рабочая альгологическая коллекция научной лаборатории биотехнологий, Астрахань; Gusev – рабочая коллекция водорослей Е.С. Гусева, Москва; INMI – рабочая коллекция галоалкалофильных цианобактерий лаборатории реликтовых микробных сообществ ИНМИ РАН, Москва; Molsyst – коллекция лаборатории молекулярной систематики водных растений ИФР РАН; Simp – коллекция агрономически полезных цианобактерий, Симферополь; в остальных случаях указаны акронимы коллекций.

одной коллекции не используется криоконсервация, самый эффективный, но и самый дорогостоящий метод длительного хранения культур.

Общий объем фондов всех опрошенных российских коллекций микроводорослей и цианобактерий составляет более 25 тыс. единиц хранения, включая живые культивируемые штаммы, постоянные препараты и высушенные гербарные образцы. При этом дублирование коллекций по поддержанию примерно одинаковых специализированных фондов маловероятно. Наоборот, уникальность коллекционных фондов абсолютна, т.к. все без исключения коллекции пополняют свои фонды за счет самостоятельных работ по выделению водорослей из природных источников (рис. 2.1). Так, например, штаммы, изолированные с территории Евро-Арктического региона, содержат в своих фондах сразу три коллекции, которые, тем не менее, имеют таксономическую специализацию: основная доля фонда коллекции КРАВГ представлена цианобактериями, SYKOA – зелеными водорослями и INER – диатомовыми. Байкальский регион изучают сотрудники коллекций

ВАС и IRK-A, причем первая коллекция – непосредственно озеро Байкал, а вторая – наземные экосистемы региона. Основной фонд коллекции LABIK собран с территории Северо-Запада России, ACSSI – с Европейской части России, VCA – с Дальнего Востока. Коллекции CALU, IPPAS и лаборатории молекулярной систематики водных растений ИФР РАН отличает широкий перечень мест изоляции штаммов водорослей, как из различных регионов страны, так и всего мира. Остальные коллекции имеют профильную специализацию: рабочая коллекция водорослей Е.С. Гусева состоит из штаммов редких золотистых и криптофитовых водорослей тропических регионов; BCAC включает штаммы из наземных экстремальных местобитаний; рабочая коллекция галоалкалофильных цианобактерий лаборатории реликтовых микробных сообществ ИНМИ РАН – экстремофильные галофильные и алкалофильные цианобактерии, изолированные из соленых и содовых озер; СКСМ – галофильные и галотолерантные микроводоросли. Часть коллекций используют штаммы микроводорослей в качестве модельных объектов при изучении репродуктивной биологии (WODC) и

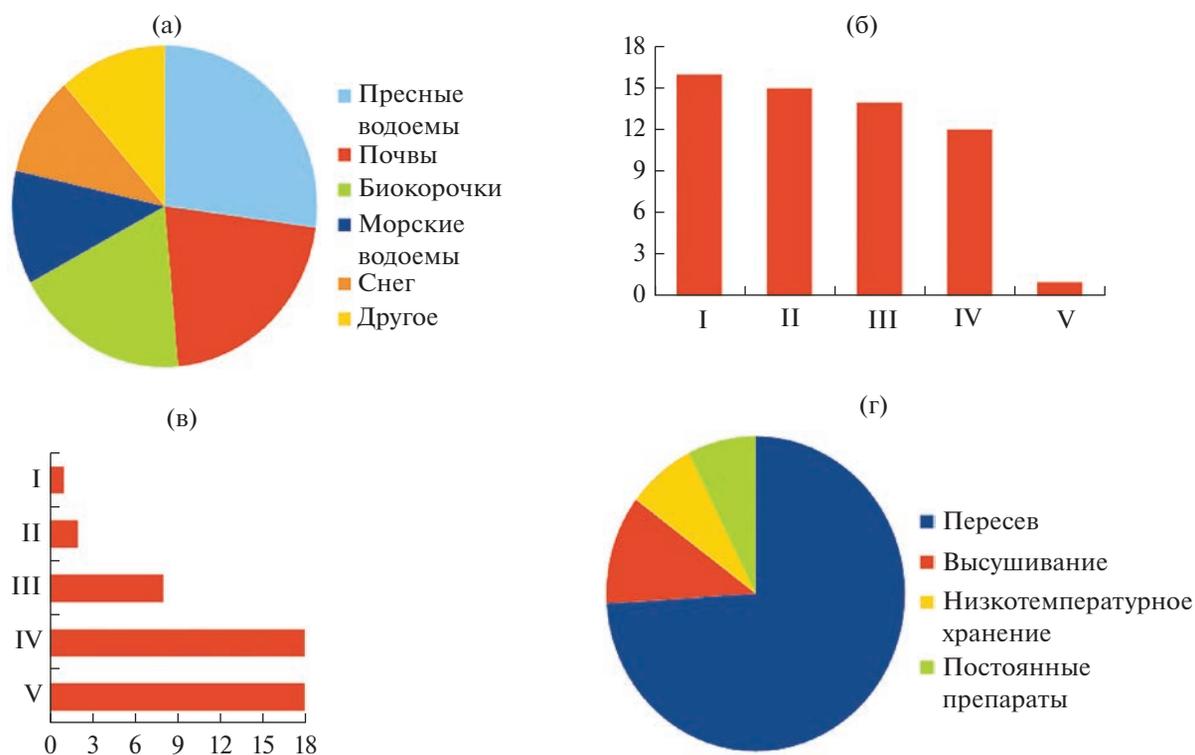


Рис. 1. Характеристика деятельности российских коллекций микроводорослей и цианобактерий. (а) – Биотопы, из которых выделены образцы хранения; (б) – специализация коллекции: I – разнообразие, II – биотехнология, III – экология, IV – систематика, V – репродуктивная биология; (в) – методы идентификации коллекционных экземпляров: I – репродуктивная совместимость, II – ультраструктурный анализ, III – биохимический скрининг, IV – молекулярно-генетический анализ, V – морфологический анализ; (г) – методы поддержания коллекционных экземпляров.

фотобиологии (IPPAS), а также в биотехнологических исследованиях (ACSSI, IBSS, IBSSca, IP-PAS, NAMSU, SYKOA, коллекция агрономически полезных цианобактерий, коллекция лаборатории молекулярной систематики водных растений ИФР РАН, рабочая альгологическая коллекция научной лаборатории биотехнологий).

Приведенные примеры, безусловно, свидетельствуют о важности альгологических коллекций для сохранения биологического разнообразия и изучения функциональных возможностей микроводорослей и цианобактерий при решении прикладных задач. В качестве критериев, используемых при оценке целесообразности включения новых объектов в фонд коллекции, респонденты указывали: принадлежность к редким или доминирующим таксонам; новым для флоры или науки и требующим ревизии; специфическое местобитание; уникальные функциональные свойства; биотехнологическая значимость; возможность использования в образовательном процессе.

Основными мероприятиями по повышению качества фонда респонденты отмечали проверку жизнеспособности и уточнение таксономического положения штаммов водорослей (рис. 2.2). Большинство российских коллекций микроводорос-

лей и цианобактерий (13 из 21) предоставляют открытый доступ к фонду (штаммы предоставляются для научного и коммерческого использования по запросу), 9 коллекций – ограниченный (штаммы доступны только для научного использования) и 5 коллекций – закрытый, при котором штаммы используются только для внутренних исследований и не передаются третьим лицам (рис. 2.3). 76% коллекций используют грантовые средства в качестве источника финансирования своей деятельности, 62% – субсидии по госзаданию, более половины коллекций поддерживаются за счет личных вложений (52%) и 43% – за счет хозяйственной деятельности (рис. 2.4). При этом 38% коллекций осуществляют депонирование образцов, 76% – выдачу штаммов для любых нужд, повышением квалификации сторонних сотрудников занимаются 38% коллекций и 10% коллекций – консультированием и исключительно научным сотрудничеством.

Перечисленные услуги коллекции оказывают бесплатно. Платные услуги оказывают 13 коллекций из 21; в их перечень входят морфологическая и молекулярно-генетическая идентификация (24% респондентов), научно-исследовательские работы (48%), предоставление образцов для коммер-

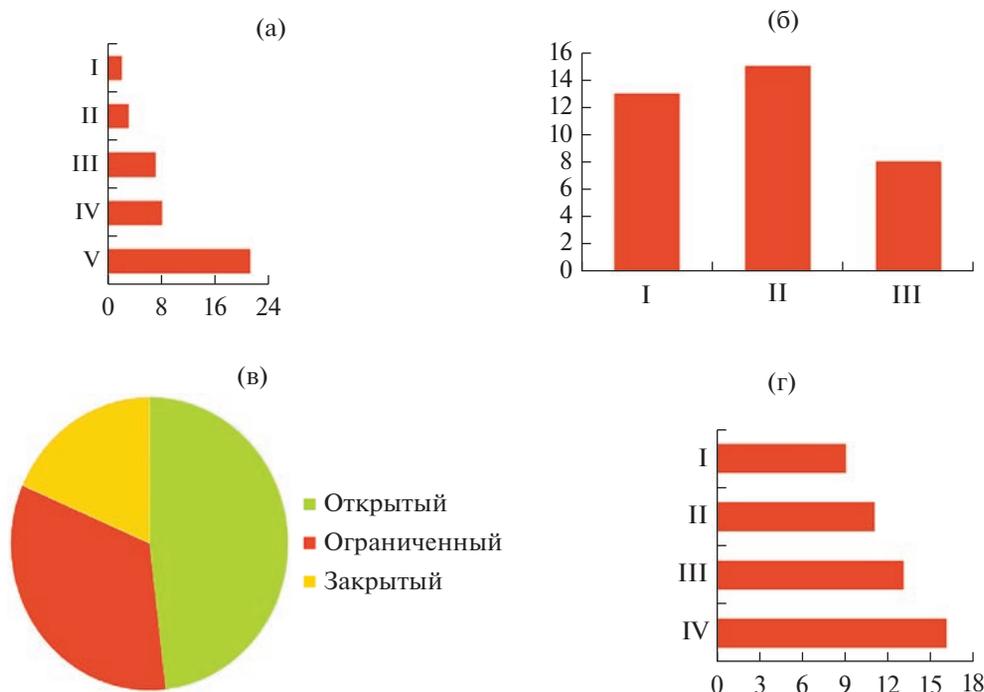


Рис. 2. Характеристика деятельности российских коллекций микроводорослей и цианобактерий. (а) – Основные источники формирования фонда коллекции: I – из коммерческих организаций, II – из других подразделений базовой организации, III – депонирование из других коллекций, IV – из других научных и образовательных организаций, V – из подразделения, поддерживающего коллекцию; (б) – типы работ по повышению качества фонда: I – проверка жизнеспособности, II – уточнение таксономического положения, III – проверка на аутентичность; (в) – варианты доступа к фонду коллекции; (г) – источники финансирования коллекции: I – хозяйственная деятельность, II – личные вложения, III – госзадание, IV – гранты.

ческого использования (52%) и биохимический скрининг (5%). При этом эффективными мерами по увеличению числа пользователей фондами и услугами коллекции респонденты считают увеличение количества сотрудников для работы со СМИ и повышения открытости и доступности информации о коллекции; разработку как индивидуальных сайтов коллекций, так и единой тематической информационной системы, включающей публикацию онлайн-каталогов коллекционных фондов и методических рекомендаций по работе биокolleкций, информацию об организации научных мероприятий, платформу для поиска потенциальных заказчиков со стороны инновационных предприятий и бизнес-структур; организацию и участие в тематических конференциях, написание статей, в том числе научно-популярных, патентование штаммов коллекций. 16 из опрошенных респондентов подтвердили обмен штаммами водорослей между коллекциями (рис. 3). Руководители Коллекции цианобактерий и водорослей лаборатории ботаники ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН (VCA), Коллекции диатомовых водорослей Евро-Арктического региона в составе гербария ИППЭС КНЦ РАН (INER), Коллекции диатомовых водорослей Мирового океана (WODC),

Коллекции лаборатории молекулярной систематики водных растений ИФР РАН и Сетевой коллекции симбионтных микроорганизмов и их консорциумов (СКСМ) указали в анкетах, что не осуществляют обмен штаммами с другими российскими коллекциями.

Основным направлением деятельности всех опрошенных коллекций являются научные исследования, меньше половины из них занимаются прикладными работами и участвуют в образовательном процессе. Штатная численность российских коллекций микроводорослей и цианобактерий составляет от 1 до 9 научных сотрудников (в среднем 2) и от 0 до 3 сотрудников технического персонала – лаборанты и инженеры (в среднем 0.4), в то время как для российских микробиологических коллекций этот показатель составляет 4.1 и 3.6 научных и технических сотрудников соответственно (Озерская и соавт., 2006). При этом почти половина коллекций не имеет собственного персонала, а только сотрудников-совместителей на долях ставки. Документооборот в коллекциях осуществляется при наличии следующих разработанных документов: Положение о коллекции – 48% коллекций, форма заявки на прием образцов – 29%, форма заявки на выдачу образцов – 38%,

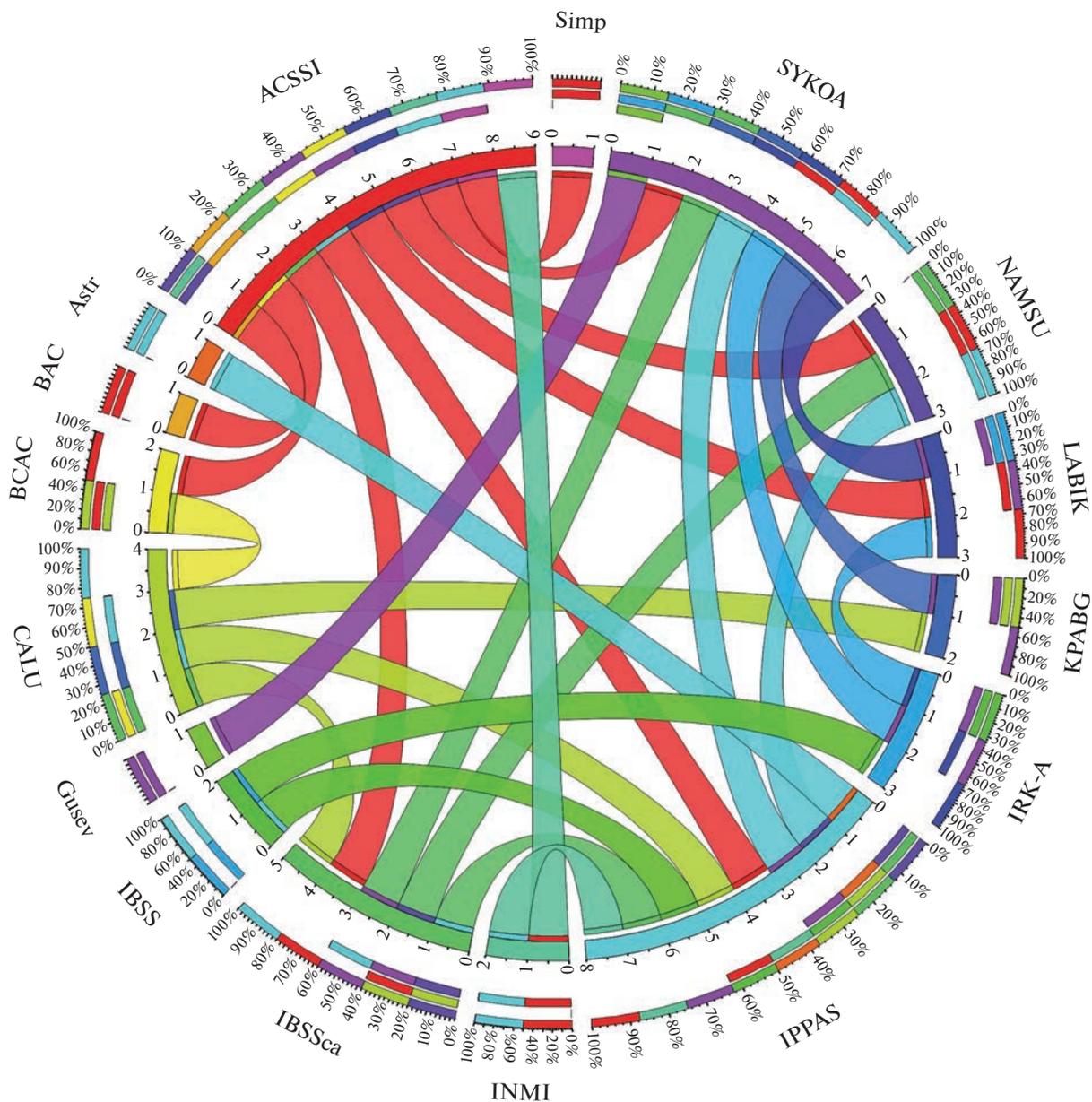


Рис. 3. Обмен образцами хранения между российскими коллекциями микроводорослей и цианобактерий. Цветовая гамма отображает исключительно взаимодействия между коллекциями. Сокращения: Astr – рабочая альгологическая коллекция научной лаборатории биотехнологий, Астрахань; Gusev – рабочая коллекция водорослей Е.С. Гусева, Москва; INMI – рабочая коллекция галоалкалофильных цианобактерий лаборатории реликтовых микробных сообществ ИНМИ РАН, Москва; Simp – коллекция агрономически полезных цианобактерий, Симферополь; в остальных случаях указаны акронимы коллекций.

паспорт образца хранения – 52%, технологический паспорт коллекции – 19%. Менее чем у трети официальных и рабочих коллекций отсутствуют или находятся в разработке документы, регламентирующие ее деятельность.

По данным анкетирования проблемы при работе коллекций, отмеченные 16 респондентами, можно разделить на несколько категорий, которые, несомненно, связаны между собой:

1) финансовые, такие как отсутствие целевого и постоянного государственного финансирования для поддержания деятельности коллекций и их развития; отсутствие системных масштабных конкурсов в рамках грантов Российского научного фонда или федеральных научно-технических программ Минобрнауки России по исследованию биологического разнообразия объектов с использованием биокolleкций, а также специальной программы грантов для научно-исследовательской

работы специалистов, включая молодых ученых, в биоресурсных центрах и фондах биокolleкций;

2) административные, такие как отсутствие и(или) нехватка помещений, специальных ставок для сотрудников коллекции (вместо работы по совместительству), отсутствие вспомогательного технического персонала (лаборанты, инженеры), отсутствие или критически малая доля молодых научных сотрудников (младше 39 лет);

3) юридические, такие как отсутствие федерального закона, полностью посвященного биологическим коллекциям, в частности, определяющего базовые юридические понятия, связанные с коллекциями, и их правовое положение, регулирующего создание, учет, хранение и ликвидацию биологических коллекций; сложные таможенные процедуры, используемые при ввозе биобъектов в Россию и их вывозе из России в целях межакадемического обмена;

4) организационные, такие как слабая координация работы коллекций как между собой, так и с руководящими организациями; подготовка в недостаточном объеме профильных специалистов-альгологов, изучающих конкретные группы микроводорослей; отсутствие финансовой и методической возможности молекулярно-генетической идентификации культур и использования омикс-технологий.

В качестве первоочередных мер для стабильного поддержания и развития коллекции их руководители и кураторы указывали: стабильное и регулярное бюджетное финансирование; увеличение штата сотрудников, включая как технический, так и научный персонал, в том числе подготовку квалифицированных специалистов по определенным таксонам микроводорослей; обновление приборной базы коллекций; обучение современным молекулярно-генетическим методам анализа; проведение методических исследований по борьбе с бактериальной и грибной контаминацией культур; освоение новых методов сохранения штаммов (криоконсервация, лиофилизация). Следует подчеркнуть, что 7 из 21 коллекций входят в состав более крупных подразделений, а именно: рабочая коллекция живых культур каротиногенных микроводорослей ФИЦ ИнБЮМ является частью коллекции живых культур планктонных микроводорослей (IBSS), которая, в свою очередь, является частью ЦКП “Коллекция гидробионтов Мирового океана”; коллекция цианобактерий, водорослей и паразитов водорослей (CALU) достояние ресурсного центра “Культивирование микроорганизмов”; коллекция цианопрокариот лаборатории флоры и растительности входит в состав гербария Полярно-альпийского ботанического сада-института; коллекция культур водорослей IRK-A принадлежит ЦКП “Биоресурсный центр СИФИБР СО РАН”; коллекция жи-

вых штаммов микроводорослей SYKOA – часть научного гербария Института биологии Коми научного центра Уральского отделения РАН (SYKO); коллекция диатомовых водорослей Евро-Арктического региона – гербария ИППЭС КНЦ РАН (INER). Остальные являются независимыми подразделениями и решают свои проблемы самостоятельно.

На вопрос “Согласны ли вы участвовать в конкурсе на предоставление грантов по созданию и развитию биоресурсных коллекций от Минобрнауки России (при его объявлении) в составе консорциума альгологических коллекций?” только один респондент ответил отрицательно. Подавляющее большинство готовы участвовать или допускают такую возможность в зависимости от условий конкурса. В качестве критической проблемы выделяется большой риск утраты авторских личных коллекций с уходом из профессии или жизни их кураторов. Материал в коллекциях накапливается десятилетиями, но без должной поддержки утрачивается в течение нескольких лет. В этой связи концепция биологических ресурсных центров остается чрезвычайно актуальной. Биоресурсные центры представляют сеть организаций, включая коллекции и базы данных, предоставляющих услуги по хранению живых клеток, геномов, биоинформации (Калакуцкий, Озерская, 2011). Создание таких центров обеспечит стабильность существования биокolleкций, вне зависимости от кадрового и финансового дефицита, позволит качественно управлять биоресурсами и соблюдать единые стандарты и протоколы в коллекционной работе в соответствии с мировым уровнем.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают глубочайшую признательность всем представителям российских коллекций микроводорослей и цианобактерий, принявшим участие в анкетировании.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Андреева В.М., Лукнищкая А.Ф. LABIK – коллекция культур зеленых водорослей в лаборатории альгологии Ботанического института им. В.Л. Комарова АН СССР // Каталог культур микроводорослей в коллекциях СССР / Отв. ред. Семенов В.Е. М.: ОНТИ Пушкинского научного центра РАН, 1991. С. 62–75.
- Боровичёв Е.А., Денисов Д.Б., Корнейкова М.В., Исаева Л.Г., Разумовская А.В., Химич Ю.Р., Мелехин А.В., Косова А.Л. Гербарий ИППЭС КНЦ РАН // Труды Кольского научного центра РАН. Прикладная экология Севера. 2018. Т. 9. № 6. С. 179–186.

Владимирова М.Г. Коллекции культур микроводорослей и их информационное обеспечение // Каталог культур микроводорослей в коллекциях СССР / Отв. ред. Семенов В.Е. М.: ОНТИ Пушчинского научного центра РАН, 1991. С. 3–7.

Владимирова М.Г., Барцевич Е.Д., Жолдаков И.А., Епифанова О.О., Маркелова А.Г., Маслова И.П., Купцова Е.С. IRPAS-коллекция культур микроводорослей Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева АН СССР // Каталог культур микроводорослей в коллекциях СССР / Отв. ред. Семенов В.Е. М.: ОНТИ Пушчинского научного центра РАН, 1991. С. 8–61.

Давидович Н.А., Давидович О.И., Подунай Ю.А. Коллекция культур диатомовых водорослей Карадагской научной станции (Крым) // Морской биологический журн. 2017. Т. 2. № 1. С. 18–28.

<https://doi.org/10.21072/mbj.2017.02.1.03>

Данцок Н.В., Челебиева Э.С., Минюк Г.С. Рабочая коллекция живых культур каротиногенных микроводорослей Института биологии южных морей имени А.О. Ковалевского // Морской биологический журн. 2021. Т. 6. № 4. С. 3–18.

<https://doi.org/10.21072/mbj.2021.06.4.01>

Калакуцкий Л.В., Озерская С.М. Биологические ресурсные центры: современное состояние в России и мире, проблемы организации, перспективы развития // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. 2011. Т. 7. № 1. С. 28–40.

Москаленко С.В., Темралеева А.Д., Дронова С.А., Пинский Д.Л. Альгологическая коллекция Института физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН (АСССИ): состояние и перспективы развития // Вопросы современной альгологии. 2015. Т. 1. № 8. URL: <http://algology.ru/659>

Новаковская И.В., Патова Е.Н. Коллекция живых штаммов микроводорослей Института биологии Коми НЦ УрО РАН и перспективы ее использования // Известия Коми Научного Центра Уральского отделения РАН. 2012. Т. 2. № 10. С. 36–41.

Озерская С.М., Кочкина Г.А., Иванушкина Н.Е., Запорожская К.М., Еремина С.С., Князева Е.В. Состояние коллекций микроорганизмов в России // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. 2006. Т. 2. № 3. С. 51–61.

Хлесткина Е.К., Захарова М.В., Нижников А.А., Гельтман Д.В., Чернецов Н.С., Михайлова Н.А., Глотов А.С., Хлесткин В.К., Заварзин А.А., Мохов А.А., Тихонович И.А. Первый научный форум “Генетические ресурсы России” – о правовом регулировании в сфере биоресурсов и биологических коллекций // Биотехнология и селекция растений. 2022. Т. 5. № 2. С. 48–54.

<https://doi.org/10.30901/2658-6266-2022-2-02>

Guiry M.D., Guiry G.M. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <https://www.algaebase.org>; searched on 27 February 2023.

Melekhin A.V., Davydov D.A., Borovichev E.A., Shalygin S.S., Konstantinova N.A. CRIS – service for input, storage and analysis of the biodiversity data of the cryptogams // Folia Cryptogamica Estonica. 2019. V. 56. P. 99–108.

<https://doi.org/10.12697/fce.2019.56.10>

Pinevich A.V., Mamkaeva K.A., Titova N.N., Gavrilova O.V., Ermilova E.V., Kvitko K.V., Pljusch A.V., Voloshko L.V., Averina S.G. St. Petersburg culture collection (CALU): four decades of storage and research with microscopic algae, cyanobacteria, and other microorganisms // Nova Hedwigia. 2004. V. 79. P. 115–126.

<https://doi.org/10.1127/0029-5035/2004/0079-0115>

Collections of Microalgae and Cyanobacteria in Russia: Present State, Problems, and Prospects

A. D. Temraleeva^{1, *} and M. A. Sinetova²

¹Pushchino Scientific Center for Biological Research, Russian Academy of Sciences, Pushchino, 142290 Russia

²Timiryazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 127276 Russia

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

Received May 5, 2023; revised May 29, 2023; accepted May 30, 2023

Abstract—Biological collections are systematic repositories of living cultures or fixed preparations and provide researchers with the material required both for basic and applied studies and for educational activities. A collection sample is the only reliable evidence of the existence of a living organism in time and space, whose multifunctionality allows it to be studied as a part of biodiversity and as a bioresource for the development of biotechnologies. Microalgae are an ancient ecological group of taxonomically diverse organisms (cyanobacteria, diatoms, charophytes, green and yellow-green algae, etc.), possessing unique physiology, broad ecological valency and plasticity, which results in their predominance in various habitats. This evolutionarily successful group is also in high demand for commercial applications in environmental monitoring, agriculture, bioenergetics, pharmacy, and the food industry. The analysis of data from an independent survey of 21 Russian collections of microalgae and cyanobacteria is provided. The survey included information on the main characteristics of the collections (funds, profile, methods, document management, etc.), emerging problems, and approaches to their solution.

Keywords: collections, microalgae, cyanobacteria, bioresources, survey

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИ**

ANCYLOBACTER CRIMEENSIS SP. NOV. – НОВЫЙ ВИД АЭРОБНЫХ МЕТИЛОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ФИЛЛОСФЕРЫ ДУБА

© 2023 г. А. А. Белова^а*, Е. Н. Капарулли^а, Н. В. Агафонова^а, Д. С. Груздев^б, Д. С. Копицын^с,
А. В. Мачулин^а, Н. В. Доронина^а

^аФИЦ ПНЦБИ РАН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина
Российской академии наук, Пушкино, 142290 Россия

^бSciBear OU, Таллинн, 10115 Эстония

^сФГАУ ВО РГУ нефти и газа (НИУ) им. И.М. Губкина, Москва, 119991 Россия

*e-mail: alina.belova2023@gmail.com

Поступила в редакцию 29.03.2023 г.

После доработки 20.04.2023 г.

Принята к публикации 22.04.2023 г.

Из филлосферы дуба пушистого (*Quercus pubescens* Willd.) на среде с метанолом выделен новый факультативный метилотроф – штамм бх-1^Т. Изолят представлен аэробными грамотрицательными неспорообразующими неподвижными короткими овоидными палочками, размножается бинарным делением. Оптимально растет при 25–29°C и рН 7.0–7.5, рост ингибируется при 1.5% NaCl. В жирнокислотном составе клеток преобладают C_{18:1ω7c} и C_{19:0cyclo} кислоты. Доминирующими фосфолипидами являются фосфатидилэтанолламин, фосфатидилмонометилэтанолламин и дифосфатидилглицерин. Основной убихинон – Q₁₀. Нуклеотидная последовательность гена 16S рРНК штамма бх-1^Т имеет наибольший уровень сходства с таковыми у представителей рода *Ancylobacter* (97.0–97.4%). Анализ геномов штамма бх-1^Т и ближайших представителей рода *Ancylobacter* показал, что уровни ANI (80.7–83.5%), dDDH (22.4–23.3%), AAI (72.0–78.0%) и РОСР (62.0–69.0%) ниже рекомендованных пороговых значений для разделения видов прокариот. Размер генома штамма бх-1^Т составляет 4.29 млн п.о., содержание (Г + Ц) в ДНК – 67.3%. На основании результатов филогенетического, филогеномного, фенотипического и хемотаксономического анализов штамм бх-1^Т (=VKM B-3256^Т=CCUG 72401^Т=KCTC 92567^Т) представляет новый вид рода *Ancylobacter*, для которого предложено название *Ancylobacter crimeensis* sp. nov.

Ключевые слова: *Ancylobacter crimeensis* sp. nov., факультативный метилотроф, новый вид, метанол

DOI: 10.31857/S0026365623600128, **EDN:** YGLVXG

Род *Ancylobacter*, входящий в семейство *Xanthobacteraceae* порядка *Hypomicrobiales* класса *Alphaproteobacteria*, предложен в 1983 г. Raj и соавт. (Raj et al., 1983). В настоящее время, согласно LPSN [https://lpsn.dsmz.de/genus/ancylobacter], этот род насчитывает 12 видов, имена которых были валидированы: *A. aquaticus* (Ørskov 1928; Raj 1983), *A. rudongensis* (Xin et al., 2004), *A. polymorphus* и *A. vacuolatus* (Xin et al., 2006), *A. oerskovii* (Lang et al., 2008), *A. dichloromethanicus* (Firsova et al., 2009), *A. defluvii* (Порошина и соавт., 2013), *A. sonchi* (Агафонова et al., 2017), *A. pratisalsi* (Suarez et al., 2017), *A. lacus* и *A. plantiphilus* (Чемодурова и соавт., 2020), *A. gelatini* (Wang et al., 2022). Представители рода *Ancylobacter* имеют высокий уровень сходства между собой и родами *Starkeya*, *Angulomicrobium* и *Methylorhabdus* по генам 16S рРНК, физиолого-биохимическим и хемотаксономиче-

ским свойствам. На основании этих признаков, а также анализа геномных данных недавно была проведена реклассификация родов *Starkeya*, *Angulomicrobium* и *Methylorhabdus*, представители которых отнесены к роду *Ancylobacter* (Doronina et al., 2023).

Представители рода *Ancylobacter* представлены аэробными аспорогенными грамотрицательными палочковидными/плеоморфными или бобовидными клетками, размножаются бинарным делением. Основными жирными кислотами являются C_{18:1ω7c}, C_{19:0cyclo}, C_{16:0} и/или C_{18:0}, доминирующий убихинон – Q₁₀, содержание Г + Ц в ДНК – 67.0–69.7%. Все представители рода – факультативные метилотрофы, использующие наряду с C₁-соединениями широкий спектр полиуглеродных субстратов в качестве источника углерода и энергии,

хемоорганотрофы, большинство H_2 -литотрофы (Staley et al., 2015). Представители данного рода широко распространены в различных природных эконизах (активные илы, водная среда, донные отложения, почвы), играют важную экологическую роль, участвуя в процессах биоремедиации различных соединений: дихлорметана (Firsova et al., 2009), сульфонилмочевины и мышьяка (Lu et al., 2011), галогенированных алифатических соединений в водных отложениях (van den Wijngaard et al., 1992, 1993), некоторые виды являются фитосимбионтами и положительно влияют на рост и развитие растений (Banik et al., 2016; Agafonova et al., 2017; Nie et al., 2022).

Целью настоящей работы являлась физиолого-биохимическая и таксономическая характеристика нового метилотрофного изолята – штамма бх-1^T, выделенного из филлосферы дуба пушистого.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования. Штамм бх-1^T изолирован с поверхности листьев дуба пушистого (*Quercus pubescens* Willd.), отобранных вблизи поселка городского типа Никита, Крым, Россия (44°30'40" с.ш., 34°14'05" в.д.).

Накопительную и чистую культуру выделяли на среде “К” с 0.5% (об./об.) метанола, как описано ранее (Чемодурова и соавт., 2020). Чистоту выделенной культуры контролировали световой микроскопией и по гомогенности колоний на агаризованных средах с метанолом и R2A (Reasoner’s 2A agar). В качестве референтных культур использовали *Ancylobacter aquaticus* DSM 101^T, *A. rudongensis* DSM 17131^T, *A. vacuolatus* DSM 1277^T, *A. polymorphus* DSM 2457^T, *A. dichloromethanicus* DM16^T (ВКМ В-2484^T), *A. lacus* F30L^T (ВКМ В-3280^T), *A. defluvii* SK15^T (ВКМ В-2789^T), *A. planthiphilus* 1TC^T (ВКМ В-3219^T), *A. sonchi* Osot^T (ВКМ В-3145^T).

Микроскопия. Морфологию клеток исследовали с помощью фазово-контрастной микроскопии с помощью микроскопа Nikon Eclipse Ci (“Nikon”, Япония), оснащенного камерой ProgRes SpeedXT core5 (“Jenoptik”, Германия). Электронную микроскопию осуществляли на сканирующем электронном микроскопе JSM-6510LV (“JEOL”, Япония), как описано ранее (Чемодурова и соавт., 2020).

Физиолого-биохимическая и хемотаксономическая характеристика. Температурный диапазон роста определяли, выращивая культуру на жидкой среде “К” с метанолом и среде R2A при температуре от 4 до 42°C. Рост при различных значе-

ниях pH исследовали на среде “К” в диапазоне pH 5.0–10.0.

Способность штамма бх-1^T использовать различные органические соединения (углеводы, органические кислоты, аминокислоты, метилированные амины) в качестве источника углерода и энергии проводили на минеральной среде “К”, в которую вместо метанола вносили 0.3% (в./об.) испытуемого вещества, инокулировали аликвотой культуры из логарифмической фазы роста на среде с метанолом (10% посевного) и инкубировали 14 сут при оптимальной температуре. Спирты вносили в количестве 0.2–0.5% (об./об.), контролем служила среда без источника углерода. Способность к росту на тиоцианате и тиосульфате оценивали, как описано ранее (Dogonina et al., 2023). Для определения спектра используемых субстратов и выявления некоторых биохимических свойств исследуемого штамма использовали также API тесты (API 20E, API 20NE; “Bio-Merieux”, Франция), следуя инструкции фирмы-производителя. Рост в атмосфере метана, дихлорметана или $H_2/CO_2/O_2$ анализировали, как описано ранее (Kaparullina et al., 2017).

Гидролиз крахмала оценивали по реакции с раствором Люголя после выращивания культуры на агаризованной среде “К” с добавлением 0.2% (в./об.) растворимого крахмала. Наличие оксидазы определяли, используя 1% (в./об.) раствор тетраметил-*p*-фенилендиамин дигидрохлорида. Активность каталазы выявляли, нанося 3%-ный раствор перекиси водорода на штрих исследуемой культуры, выращенной на агаризованной среде.

Устойчивость к антибиотикам определяли с помощью дисков (“Bioanalyse”, Турция), пропитанных антибиотиками на агаризованной среде “К” с 0.5% (об./об.) метанола.

Способность к синтезу индолпроизводных определяли, как описано ранее (Gordon, Weber, 1951). Фосфатсолюбилизирующую активность определяли в модифицированной среде “К” с нерастворимым $Ca_3(PO_4)_2$ (5 г/л) в качестве единственного источника фосфора по ранее описанной методике (Агафонова и соавт., 2013). Способность к синтезу сидерофоров проводили, используя универсальную методику с реактивом храмазуолом S (CAS-реактив) (Schwyn et al., 1987).

Фосфолипидный состав клеток анализировали двумерной тонкослойной хроматографией (Dogonina et al., 2012). Для определения жирнокислотного состава клетки выращивали на агаризованной среде R2A в течение 48 ч, анализ проводили с помощью ГХ-МС (Thermo Scientific Trace GC Ultra DSQ II, колонка HP-5MS, EI70 eV), как описано ранее (Härtig, 2008; Slobodkina et al., 2020).

Протеомный MALDI-TOF/MS анализ проводили с использованием времяпролетного Autoflex speed масс-спектрометра с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (“Bruker Daltonik GmbH”, Германия) как описано ранее (Doronina et al., 2023).

Секвенирование гена 16S рРНК и филогенетический анализ, основанный на сравнении генов 16S рРНК и НАД⁺-зависимых формиадегидрогеназ (НАД⁺-ФДГ). ДНК выделяли с использованием набора ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep kit (“Zymo Research”, США) согласно инструкции производителя. Ген 16S рРНК амплифицировали методом ПЦР с использованием универсальных праймеров для прокариот 27f и 1492r (Lane, 1991), секвенирование ПЦР – фрагментов проводили, как описано ранее (Doronina et al., 2023).

Поиск аминокислотных последовательностей НАД⁺-ФДГ штамма бх-1^T и референтных штаммов проводили в геномах, доступных в базах данных NCBI GenBank [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/] и JGI [https://img.jgi.doe.gov/]. Филогенетический анализ, основанный на сравнении нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК, а также аминокислотных последовательностей НАД⁺-ФДГ, осуществляли с помощью пакетов программ BLAST [https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/], ClustalW (Thompson et al., 1997) и MEGA5 (методы “maximum likelihood”, “neighbor-joining” и “maximum parsimony”) (Tamura et al., 2011), надежность построенных деревьев проверена значением “bootstrap” для 1000 деревьев.

Секвенирование генома, филогеномный анализ, расчет геномных индексов. ДНК штамма бх-1^T для секвенирования генома выделяли с использованием набора QIAamp DNA minikit (“Qiagen”). Геном секвенировали с использованием платформы DNBSEQ-G400 (“MGI Tech”, China) (в формате парных чтений 2 × 150 п.о.). Чтения низкого качества обрабатывали с помощью программы Trimmomatic v.0.39 (Bolger et al., 2014), сборку генома проводили с использованием программы SPAdes v.3.15.0 (Bankevich et al., 2012). На конечном этапе получено 26 контигов общим размером 4296055 п.о. (значение N50 – 389515 п.о.). Аннотация генома выполнена с использованием NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP; v.4.7) (Tatusova et al., 2016). Последовательность генома штамма бх-1^T депонирована в базе данных DDBJ/ENA/GenBank под номером JALKSN000000000.

Таксономическую принадлежность штамма бх-1^T определяли согласно таксономии GTDB с использованием программы GTDB-Tk v. 1.5.0 (Chaumeil et al., 2020). Филогеномный анализ, основанный на анализе 120 консервативных мар-

керных однокопийных белков, осуществляли с помощью программы IQ-TREE 2 (Nguyen et al., 2015) с быстрым выбором модели посредством ModelFinder (Kalyaanamoorthy et al., 2017), “bootstrap” оценивали с помощью UFBoot2 (Hoang et al., 2018), как описано ранее (Doronina et al., 2023).

Средние значения идентичности нуклеотидов (ANI) и ДНК–ДНК гибридизации *in silico* (dDDH) рассчитывали с помощью сервисов [https://ani.jgi.doe.gov/html/calc.php?] (Varghese et al., 2015) и GGDC 2.1 [https://ggdc.dsmz.de/ggdc.php] (Meier-Kolthoff et al., 2013) соответственно. Значения средней аминокислотной идентичности (AAI) и попарный процент консервативных белков (POCP) рассчитывали с использованием ресурса get_homologues [https://github.com/ead-csic-compbio/get_homologues].

Поиск генов и их аннотацию проводили с помощью сервиса RAST [https://rast.nmpdr.org/] с последующей проверкой аннотации в результате сравнения последовательностей предсказанных белков с базами данных NCBI (Aziz et al., 2008).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Морфология изолята. Штамм бх-1^T был представлен аэробными грамотрицательными неподвижными короткими овоидными палочками (0.5–0.6 × 1.0–1.2 мкм) (рис. 1а, 1б), которые не образовывали капсул, спор и простек и размножались бинарным делением. На 3 сут роста на агаризованной среде “К” с 0.5% метанола при 29°C колонии были точечные (<1 мм) кремовые, круглые, матовые, с выпуклым профилем, ровным краем, однородной структурой и гладкой поверхностью.

Физиолого-биохимическая и хемотаксономическая характеристика. Исследуемый штамм рос на жидкой среде “К” с 0.5% метанола без агрегации клеток, пигмент не образовывал. Строгий аэроб, уреазо-, каталазо- и оксидазоположительный. Рос на метаноле (удельная скорость роста при оптимальных условиях – 0.09 ч⁻¹), метиламине, этаноле, арабинозе, ксилозе, раффинозе, фруктозе, сукцинате, манните, сорбите, тиоцианате, тиосульфате, а также в газовой смеси Н₂/О₂/СО₂. Слабо рос на глюкозе, лактозе, мальтозе, сахарозе, малате, пирувате натрия, формиаде натрия, серине, инозите. Рост не наблюдался в атмосфере метана, на диметиламине, формальдегиде, диметилсульфоксиде, глицерине и α-кетоглутарате. Обладал активностью β-гликозидазы, триптофандеаминазы и β-галактозидазы. Желатин не разжижал, крахмал не гидролизировал, Н₂С не продуцировал.

Рос в диапазоне температур 17–37°C и рН 6.0–8.5. Оптимальный рост наблюдался при 25–29°C и рН 7.0–7.5 на среде с 0.5% метанола и

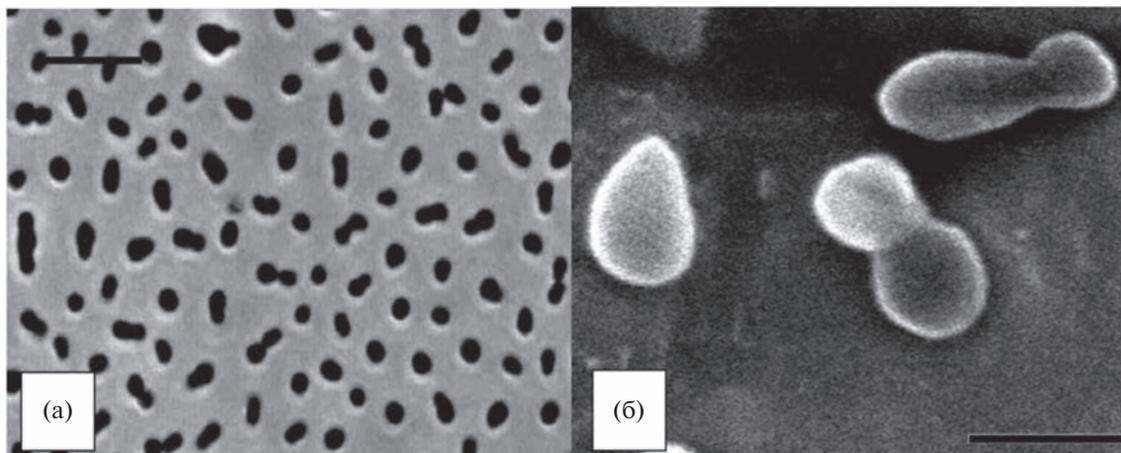


Рис. 1. Морфология клеток штамма 6x-1^T: (а) – фазовый контраст, длина масштабной метки 10 мкм; (б) – сканирующая электронная микроскопия, длина масштабной метки 1 мкм.

0.5% NaCl. Ингибировался 1.5% NaCl. Обладал устойчивостью к действию новобиоцина, налидиксовой кислоты, пенициллина, линкомицина, эритромицина и хлорамфеникола; был чувствителен к тетрациклину, стрептомицину, неомицину, канамицину и гентамицину.

В жирнокислотном составе клеток штамма 6x-1^T преобладали C_{18:1}ω7с (87.4%), C_{19:0}сусло (7.3%) и C_{16:0} (3.4%) кислоты. В целом профили жирных кислот, полученные в настоящем исследовании, согласуются с опубликованными ранее данными для представителей рода *Ancylobacter* (табл. 1) (Doronina et al., 2023).

Основной убихинон – Q₁₀. В фосфолипидном составе клеток доминировали фосфатидилэтаноламин, фосфатидилмонометилэтаноламин и дифосфатидилглицерин, что согласуется с доминирующими фосфолипидами большинства представителей рода *Ancylobacter*.

Филогенетический анализ, основанный на сравнении последовательностей генов 16S рРНК и НАД⁺–ФДГ. На филогенетическом дереве, основанном на сравнении генов 16S рРНК штамм 6x-1^T кластеризовался с представителями рода *Ancylobacter* (рис. 2). Сравнение нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК выявило наибольший уровень сходства с *A. lacus* F30L^T (97.4%), *A. plantiphilus* 1TC^T (97.2%) и *A. polymorphus* DSM 2457^T (97.0%), что ниже рекомендованного порогового значения (98.65%) для таксономического разделения прокариот на уровне вида (Kim et al., 2014).

Для филогенетического анализа метилотрофных бактерий рода *Ancylobacter* ранее нами предложено использовать также аминокислотные последовательности белка НАД⁺–ФДГ (Чемодуро-

ва и соавт., 2023). Отмечено, что штамм 6x-1^T кластеризовался с известными представителями рода *Ancylobacter*, филогенетическое положение исследуемого штамма представлено на рис. 3. Было показано, что наибольшее сходство по белку НАД⁺–ФДГ штамм 6x-1^T имел с *A. sonchi* Osot^T (97.8%), *A. polymorphus* DSM 2457^T (97.5%), *A. defluvii* SK15^T (96.5%) и *A. lacus* F30L^T (95.8%).

MALDI-TOF/MS анализ выявил высокое разрешение метода для предварительной идентификации представителей рода *Ancylobacter* на видовом уровне. Установлено, что штамм 6x-1^T четко обособлялся от других представителей данного рода (рис. 4), что согласовывалось с результатами филогенетического анализа.

Характеристика генома, филогеномный анализ, расчет геномных индексов. Геном штамма 6x-1^T имел длину 4.29 млн п.о., содержание (Г + Ц) в ДНК – 67.3% (табл. 1), в геноме было предсказано 3908 генов: 3801 белок-кодирующих, 3 гена рРНК, 47 тРНК и 53 псевдогена.

Геномный анализ выявил, что штамм 6x-1^T и ближайшие представители рода *Ancylobacter* имели уровень средней нуклеотидной идентичности (ANI) 80.7–83.5%. Расчет уровня ДНК–ДНК гибридизации *in silico* (dDDH) продемонстрировал, что штамм 6x-1^T имел 23.3% сходства с *A. lacus* F30L^T, 22.7% с *A. sonchi* Osot^T, 22.4% с *A. defluvii* SK15^T. Эти рассчитанные геномные индексы были ниже рекомендованных пороговых значений (ANI = 95–96%, dDDH = 70%) для разграничения видов прокариот. Значения средней аминокислотной идентичности (AAI) варьировали в пределах 72.0–78.0%, а значения попарного процента консервативных белков (POCP) в пределах 62.0–69.0% с ближайшими представителями рода

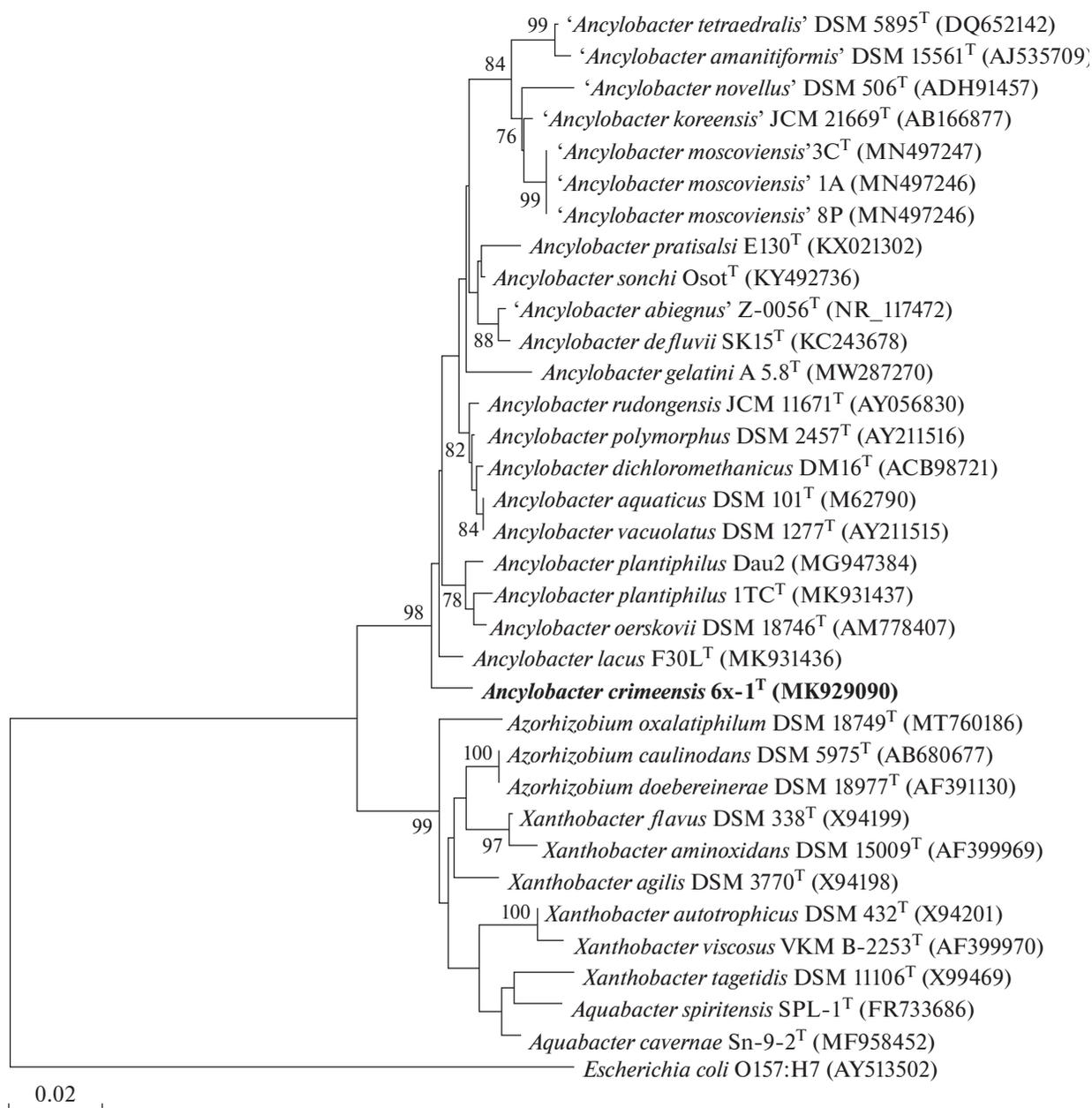


Рис. 2. Филогенетическое дерево, показывающее положение штамма 6x-1^T на основании сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК. Масштаб соответствует 2 нуклеотидным заменам на каждые 100 нуклеотидов (эволюционное расстояние). Показаны значения Bootstar >50%. Корень определен включением последовательности *Escherichia coli* O157:H7 (AY513502) в качестве внешней группы.

Ancylobacter. В соответствии с таксономическими стандартами (Konstantinidis et al., 2017; Chun et al., 2018), такие показатели геномного анализа указывают на принадлежность исследуемого штамма к новому виду. Полученные данные согласовывались с положением штамма 6x-1^T на филогенетическом дереве, основанном на анализе 120 конкатенированных последовательностей консерватив-

ных маркерных генов, где он кластеризовался с другими представителями рода *Ancylobacter* (рис. 5), но был достаточно удален от известных видов.

Как и другие известные представители рода *Ancylobacter*, штамм 6x-1^T являлся факультативным метилотрофом, который использовал метанол и метиламин, а также ряд полиуглеродных соединений в качестве источников углерода и

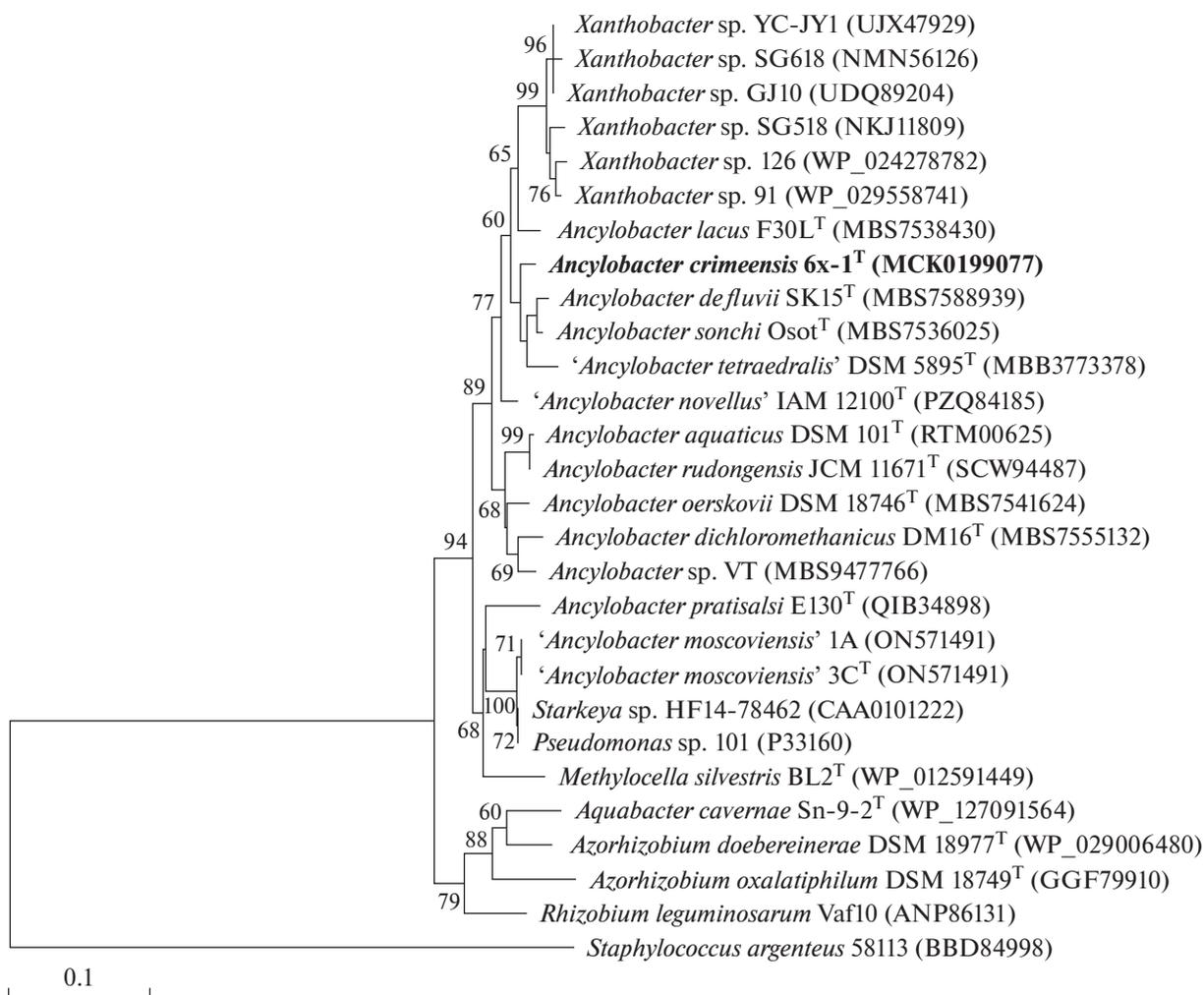


Рис. 3. Филограмма, показывающая филогенетическое положение штамма 6x-1^T на основании сравнения аминокислотных последовательностей белка НАД⁺-ФДГ. Масштаб соответствует 10 аминокислотным заменам на каждые 100 нуклеотидов (эволюционное расстояние). Показаны значения Bootstar >50%. Корень определен включением последовательности *Staphylococcus argenteus* 58113 в качестве внешней группы.

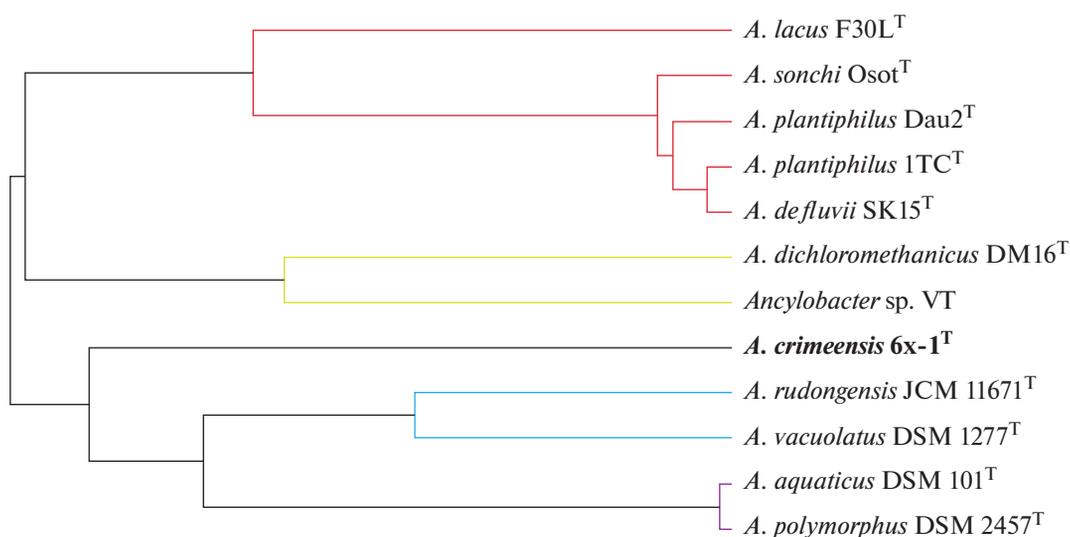


Рис. 4. Дендрограмма суммарных масс-спектров бактерий рода *Ancylobacter*, построенная с использованием программы BioTyper 2.0 ("Bruker Daltonics").

Таблица 1. Характеристика штамма 6x-1^T и ближайших представителей рода *Ancylobacter*

Характеристика	1	2	3	4
Морфология клеток	Палочковидные	Грушевидные	Палочковидные	Палочковидные
Размер клеток, мкм	0.5–0.6 × 1.0–1.2	1.0–1.5 × 2.0–2.2	0.4–0.5 × 0.6–1.0	0.6–0.7 × 0.8–1.0
Оптimum температуры, °C	25–29	25–29	22–29	29
Оптimum pH	7.0–7.5	7.0–7.5	7.5–8.0	7.0
Рост при 3% NaCl	–	–	–	+
Ассимиляция арабинозы	–	+	+	+
Ассимиляция глюкозата	–	–	+	+
Ассимиляция малата	–	+	–	+
Нитратредукция	–	–	–	+
Ростовые субстраты:				
формиаг	+/-	–	+/-	–
сахароза	+/-	+/-	+	–
мальтоза	+/-	+	–	–
малат	+/-	+/-	–	+
сукцинат	+	+	+	Н.о.
тиоцианат	+	Н.о.	+	+
тиосульфат	+	–	–	+/-
Доминирующие жирные кислоты	C _{18:1ω7c} , C _{19:0} суclo, C _{16:0}	C _{18:1ω7c} , C _{16:0} , C _{18:0}	C _{18:1ω7c} , C _{16:0} , C _{19:0} суclo, C _{18:0}	C _{18:1ω7c} , C _{16:0} , C _{19:0} суclo, C _{18:0}
Доминирующие фосфолипиды	PE, PME, DPG	PE, PC, PG, DPG	PE, PG, PC, DPG	PE, PC, DPG
Г + Ц, %	67.3	69.7	67.6	67.2
Размер генома, млн п.о.	4.29	4.63	5.80	5.28
Номер генома в GenBank	JANSCQH0000000000	GANBGE0000000000	JANBGF0000000000	JANBGGD0000000000

Штаммы: 1, 6x-1^T; 2, *A. lacus F30L^T* (Чемодурова и соавт., 2020); 3, *A. solchi Osot^T* (Agaonova et al., 2017); 4, *A. deflivi SK15^T* (Poroshina et al., 2013; Suarez et al., 2017). “+/-” – слабый рост; н.о. – не определяли, PE – фосфатидилэтаноламин, PME – фосфатидилмонометилэтаноламин, DPG – фосфатидилглицерин, PC – фосфатидилхоллин, PG – фосфатидилглицерин.

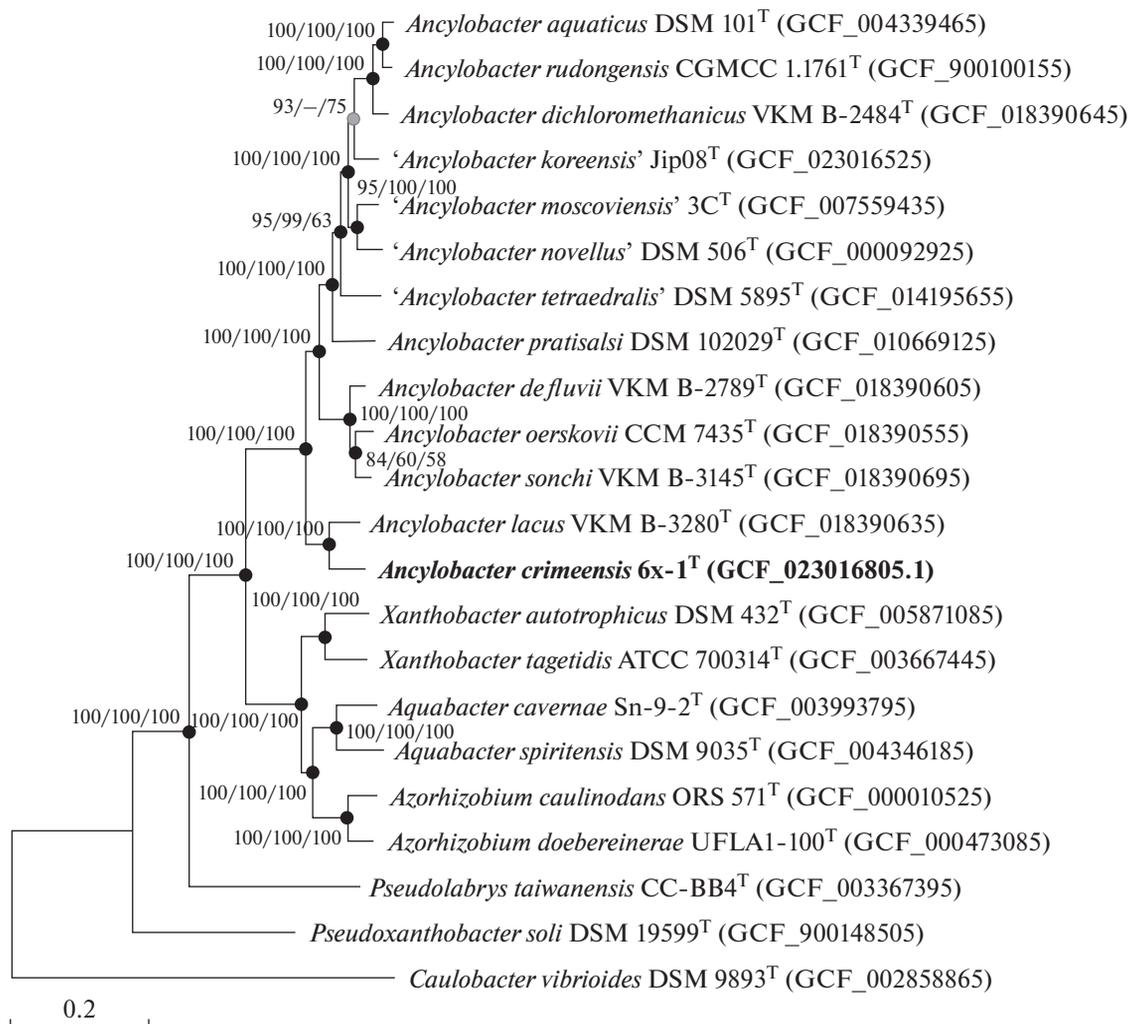


Рис. 5. Филогенетическое дерево, основанное на последовательностях 120 однокопийных маркерных белков, штамма 6x-1^T и других представителей семейства *Xanthobacteraceae*. Дерево реконструировано методом maximum likelihood с помощью эволюционной модели LG + F + I + G4. Достоверность ветвления (bootstrap, узлах ветвей >50%) указана на основании 1000 альтернативных деревьев, в точках ветвления указаны: черные – для ML/NJ/MP методов, серые – ML/MP соответственно. Масштабная линейка представляет собой 0,2 аминокислотных замены на позицию. Корень определен включением последовательности *Caulobacter vibrioides* CB51^T (GCF_002858865) в качестве внешней группы.

энергии. Метанол окислял до формальдегида двумя метанолдегидрогеназами (МДГ): идентифицирован полный оперон, кодирующий классическую Ca^{2+} -зависимую МДГ (*mxaHFJGIRSACKLDE*, MWN34_13685–13625), и 2 копии гена *хоxF* (MWN34_17935, MWN34_05090), кодирующие лантаноид-содержащую МДГ. Выявлены гены, кодирующие ферменты окисления формальдегида (*fae*, MWN34_05280) и формиата (MWN34_11060–11080, MWN34_09715–09730), в т.ч. НАД⁺-ФДГ (MWN34_19435). Штамм 6x-1^T реализовывал рибулозобисфосфатный (РБФ) путь C_1 -метаболизма. В геноме обнаружены гены, кодирующие ферменты цикла Кальвин–Бенсон–Бассем: фосфоррибулокиназа (MWN34_05225), рибулоз-

обисфосфаткарбоксилаза (*cbbLM*, MWN34_05240–MWN34_05245), фосфоглицераткиназа (MWN34_15400), глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа (MWN34_15390), триозофосфатизомерза (MWN34_12060), фруктозобисфосфатальдолаза (MWN34_15405), фруктозо-1,6-бисфосфатаза (MWN34_01135), транскетолаза (MWN34_15385, MWN34_05230), рибулозофосфат-3-эпимераза (MWN34_05255), рибузо-5-фосфатизомераза (MWN34_04520).

Обнаружены кластеры генов прямого окисления метиламина (*mauBDEACJGL*, MWN34_13425–13460), а также гены, кодирующие ферменты N-метилглутаматного пути: N-метилглутаматдегидрогеназа (*mgdABCD*, MWN34_15720–15735), N-ме-

тилглутаматсинтаза (*mgsABC*, MWN34_17350–17360) и γ -глутамилметиламидсинтаза (*gmaS*, MWN34_17345).

Экологическая роль. Изучение физиологических свойств и анализ генома штамма бх-1^T, свидетельствует о том, что новый метилотроф, вероятно, являлся фитосимбионтом, как и некоторые другие представители рода *Ancylobacter* (Agafonova et al., 2017; Чемодурова и соавт., 2020). Штамм синтезировал индолпроизводные (фитогормоны ауксины) (11 ± 0.2 мкг/мл) при добавлении в среду предшественника – триптофана. На среде с CAS-агаром была выявлена способность штамма к синтезу сидерофоров, а в геноме обнаружены гены, участвующие в биосинтезе сидерофора – фускахелина. Впервые данный вид сидерофоров охарактеризован у умеренного термофила *Thermobifida fusca* (Dimise et al., 2008), а среди известных представителей рода *Ancylobacter* данный сидерофор ранее описан только у *A. pratalsi* E130^T (Nie et al., 2022), при этом выявлено, что наличие генов биосинтеза фускахелина положительно влияло на способность штамма E130^T стимулировать рост растений. Подобно *A. pratalsi* E130^T, у штамма бх-1^T гены биосинтеза фускахелина также расположены единым кластером (MWN34_01655, MWN34_09905–09940).

Вместе с тем, исследуемый штамм обладал фосфатсолобилизирующей активностью: на минеральной агаризованной среде с метанолом и трикальцийфосфатом (в качестве единственного источника фосфора) вокруг колоний образовывались зоны просветления (гало). Анализ генома также выявил наличие генов синтеза экзополифосфатазы (MWN34_00825), неорганической дифосфатазы (MWN34_15200), пирофосфатазы (MWN34_06990), щелочной (MWN34_08415) и кислой фосфатаз (MWN34_06380) и *phn* оперон (*phnDEC/FGHIJKLMN*, MWN34_00030–00040, MWN34_06895–06935), кодирующий С-Р-лиазный комплекс, известный широким спектром разлагаемых фосфонатов.

Дифференцирующая характеристика штамма бх-1^T и ближайших представителей рода *Ancylobacter* представлена в табл. 1. Таким образом, по совокупности полученных данных – результатов физиолого-биохимического, филогенетического и филогеномного анализов, расчета геномных индексов (dDDH, ANI, AAI, POCP), использования МАЛДИ-МС анализа, выявлено, что штамм бх-1^T является представителем нового вида рода *Ancylobacter*, для которого предложено название *Ancylobacter crimeensis* sp. nov.

Диагноз нового вида – *Ancylobacter crimeensis* sp. nov.

Ancylobacter crimeensis (cri.me.en'sis N.L., adj. *crimeensis*, pertaining to Crimea, относящийся к Крыму).

Аэробные грамотрицательные неспорообразующие неподвижные короткие овоидные палочки ($0.5–0.6 \times 1.0–1.2$ мкм), размножаются бинарным делением. На минеральной среде с метанолом на 3–5 сут роста колонии точечные (<1 мм) кремовые, круглые, матовые, с выпуклым профилем, ровным краем, однородной структурой и гладкой поверхностью. Каталазо-, оксидазо- и уреазоположительны. Оптимально растет при 25–29°C и рН 7.0–7.5 в присутствии в среде 0.5% метанола и 0.5% NaCl, рост ингибируется при 1.5% NaCl. Растет на метаноле, метиламине, этаноле, арабинозе, ксилозе, раффинозе, фруктозе, сукцинате, манните и сорбите, тиоцианате, тиосульфате, а также в газовой смеси H₂/O₂/CO₂. Слабо растет на глюкозе, лактозе, мальтозе, сахарозе, малате, пирувате натрия, формиате натрия, серине, инозите. Рост не обнаружен в атмосфере метана, на диметиламине, формальдегиде, диметилсульфоксиде, глицерине и α -кетоглутарате. Растет на R2A, TSA и LB агаре. Обладает активностью β -глюкозидазы, триптофандеаминазы и β -галактозидазы. Не продуцирует H₂S. Синтезирует индолы. Желатин не разжижает. Не образует ацетоин. Крахмал не гидролизует. Устойчив к действию новобицилина, налидиксовой кислоты, пенициллина, линкомицина, эритромицина и хлорамфеникола, но чувствителен к тетрациклину, стрептомицину, неомицину, канамицину и гентамицину. Основными фосфолипидами являются фосфатидилэтаноламин, фосфатидилмонометилэтаноламин и дифосфатидилглицерин. В жирнокислотном составе клеток преобладают C_{18:1 ω 7c} (87.4%), C_{19:0cyclo} (7.3%) и C_{16:0} (3.4%) кислоты. Основной убихинон – Q₁₀. Размер генома 4.29 млн п.о., содержание Г + Ц в ДНК 67.3%.

Типовой штамм бх-1^T (=ВКМ В-3256^T=CCUG 72401^T=KCTC 92567^T) изолирован из филлосферы дуба пушистого (*Quercus pubescens* Willd.). Образец отобран вблизи пгт Никита, Республика Крым, Россия. Последовательность гена 16S рРНК штамма бх-1^T депонирована в базе данных GenBank под номером MK929090. Геном штамма бх-1^T депонирован в GenBank под номером JALKSN000000000.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность В.Э. Трубицыну (ФИЦ ПНЦБИ РАН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Пушино) за помощь в анализе геномных данных.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (грант № 075-15-2021-1051). Анализ жирных кислот выполнен Д.С. Копицыным в РГУ нефти и газа (НИУ) им. И.М. Губкина за счет гранта Российского научного фонда № 22-73-10224.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

А.А.Б., Е.Н.К., Н.В.А. – экспериментальные процедуры, филогенетический, биоинформационный анализ; Д.С.Г. – секвенирование генома, биоинформационный анализ; Д.С.К. – анализ жирных кислот; А.В.М. – световая и сканирующая микроскопия; Н.В.Д. – выделение чистой культуры, руководство работой; все авторы участвовали в написании и утверждении рукописи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Агафонова Н.В., Капаруллина Е.Н., Доронина Н.В., Троценко Ю.А. Фосфатсольбилизирующая активность аэробных метиловых бактерий // *Микробиология*. 2014. Т. 83. С. 28–32.
- Агафонова Н.В., Капаруллина Е.Н., Доронина Н.В., Троценко Ю.А. Phosphatesolubilizing activity of aerobic methylotrophic bacteria // *Microbiology (Moscow)*. 2013. V. 82. P. 864–867.
- Порошина М.Н., Доронина Н.В., Капаруллина Е.Н., Ковалевская Н.П., Троценко Ю.А. Галофильные и галотолерантные аэробные метиловых бактерии из техногенных биотопов // *Микробиология*. 2013. Т. 84. С. 473–482.
- Poroshina M.N., Doronina N.V., Kaparullina E.N., Kovalevskaya N.P., Trotsenko Y.A. Halophilic and halotolerant aerobic methylotrophic bacteria from the technogenic Solikamsk biotopes // *Microbiology (Moscow)*. 2013. V. 82. P. 490–498.
- Чемодурова А.А., Капаруллина Е.Н., Мачулин А.В., Спрößer С., Ланг Е., Доронина Н.В. *Ancylobacter lacus* sp. nov. и *Ancylobacter plantiphilus* sp. nov. – новые аэробные факультативно-метиловых бактерии, использующие метанол // *Микробиология*. 2020. Т. 89. С. 42–51.
- Chemodurova A.A., Kaparullina E.N., Machulin A.V., Sprößer C., Lang E., Doronina N.V. *Ancylobacter lacus* sp. nov. and *Ancylobacter plantiphilus* sp. nov. – novel aerobic facultative methylotrophic bacteria // *Microbiology (Moscow)*. 2020. V. 89. P. 35–43.
- Чемодурова А.А., Решетников А.С., Агафонова Н.В., Доронина Н.В. Гены, кодирующие НАД⁺-зависимые формилдегидрогеназы, в таксономии аэробных метиловых бактерий рода *Ancylobacter* // *Микробиология*. 2023. Т. 92. С. 98–102.
- Chemodurova A.A., Reshetnikov A.S., Agafonova N.V., Doronina N.V. Genes of NAD⁺-dependent formate dehydrogenases in taxonomy of aerobic methylotrophic bacteria of the genus *Ancylobacter* // *Microbiology (Moscow)*. 2022. V. 91. P. 834–838.
- Агафонова Н., Капаруллина Е., Троценко Ю., Доронина Н. *Ancylobacter sonchi* sp. nov., a novel methylotrophic bacterium from roots of *Sonchus arvensis* L. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2017. V. 67. P. 4552–4558.
- Aziz R.K., Bartels D., Best A.A., De Jongh M., Disz T., Edwards R.A., Zagnitko O. The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology // *BMC Genomics*. 2008. V. 9. P. 1–15.
- Banik A., Mukhopadhyaya S.K., Dangar T.K. Characterization of N₂-fixing plant growth promoting endophytic and epiphytic bacterial community of Indian cultivated and wild rice (*Oryza* spp.) genotypes // *Planta*. 2016. V. 243. P. 799–812.
- Bankevich A., Nurk S., Antipov D., Gurevich A., Dvorkin M., Kulikov A., Lesin V., Nikolenko S., Pham S., Prjibelski A., Pyshkin A., Sirotkin A., Vyahhi N., Tesler G., Alekseyev M., Pevzner P. SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing // *J. Comput. Biol.* 2012. V. 19. P. 455–477.
- Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data // *Bioinformatics*. 2014. V. 30. P. 2114–2120.
- Chaumeil P.A., Mussig A.J., Hugenholtz P., Parks D.H. GTDB-Tk: a toolkit to classify genomes with the Genome Taxonomy Database // *Bioinformatics*. 2020. V. 36. P. 1925–1927.
- Chun J., Oren A., Ventosa A., Christensen H., Arahal D.R., daCosta 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.
- Dimise E.J., Widboom P.F., Bruner S.D. Structure elucidation and biosynthesis of fuscachelins, peptide siderophores from the moderate thermophile *Thermobifida fusca* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008. V. 105. P. 15311–15316.
- Doronina N.V., Chemodurova A.A., Grouzdev D.S., Koziaeva V.V., Shi W., Wu L., Kaparullina E.N. *Ancylobacter moscoviensis* sp. nov., facultatively methylotrophic bacteria from activated sludge and the reclassification of *Starkeya novella* (Starkey 1934) Kelly et al. 2000 as *Ancylobacter novellus* comb. nov., *Starkeya koreensis* Im et al. 2006 as *Ancylobacter koreensis* comb. nov., *Angulomicrobium tetraedrale* Vasil'eva et al. 1986 as *Ancylobacter tetraedralis* comb. nov., *Angulomicrobium ammanitiforme* Fritz et al. 2004 as *Ancylobacter ammanitiformis* comb. nov. // *Antonie van Leeuwenhoek*. 2023. V. 116. P. 153–170.
- Doronina N.V., Gogleva A.A., Trotsenko Y.A. *Methylophilus glucosoxydans* sp. nov., a restricted facultative methylotroph from rice rhizosphere // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2012. V. 62. P. 196–201.

- Firsova J., Doronina N., Lang E., Spröer C., Vuilleumier S., Trotsenko Y. *Ancylobacter dichloromethanicus* sp. nov. – a new aerobic facultatively methylotrophic bacterium utilizing dichloromethane // Syst. Appl. Microbiol. 2009. V. 32. P. 227–232.
- Gordon S.A., Weber R.P. Colorimetric estimation of indoleacetic acid // Plant Physiol. 1951. V. 26. P. 192–195.
- Härtig C. Rapid identification of fatty acid methyl esters using a multidimensional gas chromatography–mass spectrometry database // J. Chromatogr. A. 2008. V. 1177. P. 159–169.
- Hoang D.T., Chernomor O., von Haeseler A., Minh B.Q., Vinh L.S. UFBoot2: improving the ultrafast bootstrap approximation // Mol. Biol. Evol. 2018. V. 35. P. 518–522.
- Kalyanamoorthy S., Minh B.Q., Wong T.K.F., von Haeseler A., Jermin L.S. ModelFinder: Fast model selection for accurate phylogenetic estimates // Nature Methods. 2017. V. 14. P. 587–589.
- Kaparullina E.N., Trotsenko Yu.A., Doronina N.V. *Methylobacillus methanolivorans* sp. nov., a novel non-pigmented obligately methylotrophic bacterium // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2017. V. 67. P. 425–431.
- 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.
- Konstantinidis K.T., Roselló-Móra R., Amann R. Uncultivated microbes in need of their own taxonomy // ISME J. 2017. V. 11. P. 2399–2406.
- Lane D.J. 16S/23S rRNA sequencing // Nucleic acid Techniques in Bacterial Systematics / Eds. Stackebrandt E., Goodfellow M. Chichester: John Wiley and Sons, 1991. P. 115–175.
- Lang E., Swiderski J., Stackebrandt E., Schumann P., Spröer C., Sahin N. Description of *Ancylobacter oerskovii* sp. nov. and two additional strains of *Ancylobacter polymorphus* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2008. V. 58. P. 1997–2002.
- Lu P., Jin L., Liang B., Zhang J., Li S., Feng Z., Huang X. Study of biochemical pathway and enzyme involved in met-sulfuronmethyl degradation by *Ancylobacter* sp. XJ-412-1 isolated from soil // Curr. Microbiol. 2011. V. 62. P. 1718–1725.
- Meier-Kolthoff J.P., Auch A.F., Klenk H.-P., Göker M. Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions // BMC Bioinform. 2013. V. 14. Art. 60.
- Nguyen L.T., Schmidt H.A., von Haeseler A., Minh B.Q. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies // Mol. Biol. Evol. 2015. V. 32. P. 268–274.
- Nie W., Zheng X., Wang S., Ahmad I., Zhu B. Genome resource of *Ancylobacter pratensis* E130T: a novel plant-growth-promoting bacterium isolated from the rhizosphere // Phytopathol. 2022. V. 112. P. 729–731.
- Ørskov J. Beschreibung eines neuen Mikroben, *Microcyclus aquaticus*, mit eigentümlicher Morphologie // Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. I. 1928. V. 107. P. 180–184 (in German).
- Raj H.D. Proposal of *Ancylobacter* gen. nov. as a substitute for the bacterial genus *Microcyclus* Ørskov 1928 // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 1983. V. 33. P. 397–398.
- Schwyn B., Neilands J.B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores // Anal. Biochem. 1987. V. 160. P. 47–56.
- Slobodkina G.B., Merkel A.Y., Novikov A.A., Bonch-Osmolovskaya E.A., Slobodkin A.I. *Pelomicrobium methylotrophicum* gen. nov., sp. nov. a moderately thermophilic, facultatively anaerobic, lithoautotrophic and methylotrophic bacterium isolated from a terrestrial mud volcano // Extremophiles. 2020. V. 24. P. 177–185.
- Staley J.T., Jenkins C., Konopka A.E. *Ancylobacter* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria / Eds. Trujillo M.E., Dedysch S., DeVos P., Hedlund B., Kämpfer P., Rainey F.A., Whitman W.B., 2015. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00811>
- Suarez Ch., Ratering S., Spröer J., Schnell S. *Ancylobacter pratensis* sp. nov. with plant growth promotion abilities from the rhizosphere of *Plantago winteri* Wirtg. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2017. V. 67. P. 4500–4506.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods // Mol. Biol. Evol. 2011. V. 28. P. 2731–2739.
- Tatusova T., DiCuccio M., Badretdin A., Chetvernin V., Nawrocki E.P. NCBI prokaryotic genome annotation pipeline // Nucl. Acids Res. 2016. V. 44. P. 6614–6624.
- Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D.G. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools // Nucl. Acids Res. 1997. V. 25. P. 4876–4882.
- van den Wijngaard A.J., Prins J., Smal A.J., Janssen D.B. Degradation of 2-chloroethylvinylether by *Ancylobacter aquaticus* AD25 and AD27 // Appl. Environ. Microbiol. 1993. V. 59. P. 2777–2783.
- van den Wijngaard A.J., van der Kamp K.W., van der Ploeg J., Pries F., Kazemier B., Janssen D.B. Degradation of 1,2-dichloroethane by *Ancylobacter aquaticus* and other facultative methylotrophs // Appl. Environ. Microbiol. 1992. V. 58. P. 976–983.
- Varghese N.J., Mukherjee S., Ivanova N., Konstantinidis K.T., Mavrommatis K., Kyrpides N.C., Pati A. Microbial species delineation using whole genome sequences // Nucl. Acids Res. 2015. V. 43. P. 6761–6771.
- Xin Y.H., Zhou Y.G., Chen W.X. *Ancylobacter polymorphus* sp. nov. and *Ancylobacter vacuolatus* sp. nov. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2006. V. 56. P. 1185–1188.
- Xin Y.H., Zhou Y.G., Zhou H.L., Chen W.X. *Ancylobacter ru-dongensis* sp. nov., isolated from roots of *Spartina anglica* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2004. V. 54. P. 385–388.
- Wang P., Sheng H., Hong Yi, Debnath S.Ch., Cen Yan, Li K., Chen G., Xu J., Wu F., Guo Zh., Zheng D. *Ancylobacter gelatini* sp. nov., isolated from beach sediment of Zhairuo Island, China // Arch. Microbiol. 2022. V. 204. Art. 430.

***Ancylobacter crimeensis* sp. nov., a New Species of Aerobic Methylophilic Bacteria Isolated from Oak Phyllosphere**

**A. A. Belova¹*, E. N. Kaparullina¹, N. V. Agafonova¹, D. S. Grouzdev², D. S. Kopitsyn³,
A. V. Machulin¹, and N. V. Doronina¹**

¹*Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Federal Research Center "Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences",*

Pushchino, Moscow region, 142290 Russia

²*SciBear OU, Tallinn, 10115 Estonia*

³*Gubkin University, Moscow, 119991 Russia*

*e-mail: alina.belova2023@gmail.com

Received March 29, 2023; revised April 20, 2023; accepted April 22, 2023

Abstract—A new facultative methylophilic, strain 6x-1^T, was isolated from the phyllosphere of oak (*Quercus pubescens* Willd.) on the medium with methanol. Cells were aerobic, gram-negative, not-spore-forming, non-motile short ovoids rods reproducing by binary fission. Growth optimum was at 25–29°C and pH 7.0–7.5; growth was inhibited by 1.5% NaCl. Predominant fatty acids were C_{18:1ω7c} and C_{19:0cyclo}. Predominant phospholipids were phosphatidylethanolamine, phosphatidylmonomethylethanolamine, and diphosphatidylglycerol. The major ubiquinone was Q₁₀. The 16S rRNA gene sequence of strain 6x-1^T exhibited the highest similarity to those of members of the genus *Ancylobacter* (97.0–97.4%). Genome analysis of strain 6x-1^T and most closely related *Ancylobacter* strains revealed that the values of ANI (80.7–83.5%), dDDH (22.4–23.3%), AAI (72.0–78.0%), and POCP (62.0–69.0%) were below the recommended threshold values for prokaryotic species. Genome size of strain 6x-1^T was 4.29 × 10⁶ Mb, and G + C content was 67.3%. According to the results of phylogenetic, phylogenomic, phenotypic, and chemotaxonomic analysis, strain 6x-1^T (=VKM B-3256^T = CCUG 72401^T) represents a new species of genus *Ancylobacter*, for which the name *Ancylobacter crimeensis* sp. nov. is proposed.

Keywords: *Ancylobacter crimeensis* sp. nov., facultative methylophilic, new species, methanol

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИ

СЕМЬ НОВЫХ ВИДОВ АКТИНОМИЦЕТОВ РОДА *KRIBBELLA*
С УНИКАЛЬНЫМИ ПОЛИМЕРАМИ КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ
И ДОПОЛНЕННОЕ И ИСПРАВЛЕННОЕ ОПИСАНИЕ РОДА *KRIBBELLA*¹

© 2023 г. А. Н. Автух^{а, *}, Е. В. Арискина^а, Л. М. Барышникова^а, Е. М. Тульская^б,
Н. В. Потехина^б, А. С. Пашков^с, Н. Е. Сузина^а, Н. В. Присяжная^а, И. П. Стародумова^а,
О. В. Василенко^а, Л. В. Дорофеева^а, Л. И. Евтушенко^а

^аВсероссийская коллекция микроорганизмов (ВКМ), Институт биохимии и физиологии микроорганизмов
им. Г.К. Скрыбина РАН, ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пущино, Московская обл., 142290 Россия

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

^сИнститут органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, Москва, 119991 Россия

*e-mail: avtukh@rambler.ru

Поступила в редакцию 02.05.2023 г.

После доработки 20.05.2023 г.

Принята к публикации 22.05.2023 г.

Семь изученных штаммов актиномицетов, отнесенных к новым видам рода *Kribbella*, были выделены из почв различных регионов России. Уровень сходства новых штаммов между собой и с типовыми штаммами известных видов этого рода по генам 16S рРНК 98.2–99.3 и 96.2–99.7% соответственно. Эволюционные расстояния на основе конкатенированных фрагментов генов *gyrB–rpoB–recA–relA–atpD* (4108 п.н.) для изученных штаммов и типовых штаммов известных видов были в диапазоне значений, вычисленных для описанных видов *Kribbella* (0.014–0.101). Значения dDDH и ANI между изученными и типовыми штаммами известных видов, для которых имеются данные по последовательностям геномов, не превышали 49.8 и 92.6% соответственно, что ниже границ прокариотных видов. Представители выявленных новых видов характеризуются индивидуальными фенотипическими профилями. У отдельных видов обнаружены (впервые у криббелл) спорангиеподобные структуры, до 4 мкм в диаметре. Клеточные стенки изученных штаммов содержат специфичные для видов или групп видов тейхуроновые и/или тейхулозоновые кислоты, структуры которых ранее не были описаны у прокариот. У всех изученных штаммов обнаружен уникальный разветвленный α-маннан. На основании результатов настоящего исследования и ранее опубликованных данных предложены описания семи новых видов: *Kribbella orskensis* sp. nov. (типовой штамм ВКМ Ac-2538^T), *Kribbella rubisoli* sp. nov. (типовой штамм ВКМ Ac-2540^T), *Kribbella antiqua* sp. nov. (типовой штамм ВКМ Ac-2541^T), *Kribbella kalugense* sp. nov. (типовой штамм ВКМ Ac-2570^T), *Kribbella steppae* sp. nov. (типовой штамм ВКМ Ac-2572^T), *Kribbella pratae* sp. nov. (типовой штамм ВКМ Ac-2574^T), *Kribbella voronezhensis* sp. nov. (типовой штамм ВКМ Ac-2575^T), а также дополненное и исправленное описание рода *Kribbella*.

Ключевые слова: род *Kribbella*, новые виды, геном, хемотаксономия, гликополимеры клеточной стенки

DOI: 10.31857/S0026365623600220, **EDN:** JRFOKA

Род *Kribbella* (семейство *Kribbellaceae*, порядок *Actinomycetales*) в настоящее время включает 33 валидно описанных вида, выделенных преимущественно из почв и растений (<https://lpsn.dsmz.de/genus/kribbella>). Криббеллы формируют ветвящиеся вегетативные и воздушные гифы, распадающиеся на неподвижные фрагменты различных размеров, на концевых участках воздушных гиф встре-

чаются короткие цепочки спор. Содержат LL-диаминопимелиновую кислоту (LL-ДАП) в клеточной стенке, доминирующие жирные кислоты – *anteiso-C*_{15:0}, *iso-C*_{16:0} и *anteiso-C*_{17:0}, фосфолипиды III типа (фосфатидилхолин в качестве диагностического компонента) и преобладающий менахинон МК-9(H₄) (Park et al., 1999; Sohn et al., 2003). Виды рода имеют высокий уровень сходства нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК – до 99.7%. Последовательности геномов определены для 16 из 33 признанных видов (Curtis et al., 2020; Meyers, 2021).

¹ Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0026365623600220 для авторизованных пользователей.

Для обоснования принадлежности штаммов прокариот к новым видам и их описания в качестве новых видов в настоящее время рекомендуется определять значения показателей общего сходства геномов (overall genome related indices), таких как уровень ДНК–ДНК гибридизации *in silico* (dDDH) и величина средней идентичности нуклеотидных последовательностей (average nucleotide identity, ANI) (Chun et al., 2018). Вместе с тем, для идентификации на уровне вида бактерий ряда родов и, в частности, рода *Kribbella*, используются значения генетических расстояний на основе структурных генов или их комбинаций (мультилокусный анализ) (Kirbi et al., 2010; Curtis, Meyers, 2012; Curtis et al., 2020). У криббелл межвидовые значения генетических расстояний были рассчитаны, в частности, для конкатенированной последовательности генов *gyrB–rpoB–recA–relA–atpD* (4099 п.н.) (Curtis, Meyers, 2012; Meyers, 2021).

С развитием молекулярных таксономических методов и выявлением видов, очень близких филогенетически или происходящих из сходных биотопов, исследователи все чаще сталкиваются с проблемой низкой разрешающей способности морфологических и физиолого-биохимических признаков, традиционно используемых для разграничения видов на уровне фенотипа. С другой стороны, было установлено, что состав и структура гликополимеров клеточной стенки могут быть специфичными для видов и таксонов более высокого ранга и использоваться в качестве хемотаксономических маркеров (Naumova et al., 2001; Nouioui et al., 2018; Потехина и соавт., 2021; Шашков и соавт., 2021).

Целью настоящей работы было таксономическое изучение 7 штаммов актинобактерий рода *Kribbella*, выделенных из почв, и оценка таксономической значимости признака “состав и структура гликополимеров клеточных стенок” для организмов этого рода.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Штаммы рода *Kribbella* (ВКМ Ас-2538^T, ВКМ Ас-2540^T, ВКМ Ас-2541^T, ВКМ Ас-2570^T, ВКМ Ас-2572^T, ВКМ Ас-2574^T и ВКМ Ас-2575^T) получены из Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ). Штаммы были выделены из современных и погребенных почв различных регионов России в 2002–2003 гг., предварительно идентифицированы с использованием метода МАЛДИ масс-спектрометрии и анализа фрагментов генов 16S рРНК (Автух, 2012).

Культурально-морфологические характеристики изучали у 5–10-суточных культур, выращенных на ISP-средах (Shirling, Gottlieb, 1966) при 28°C. Используемые методы световой и электронной

(трансмиссионной и сканирующей) микроскопии описаны Сузиной и соавт. (2011). Физиолого-биохимические признаки определяли по описанным методикам (Методы общей бактериологии, 1984). Утилизацию различных источников углерода проверяли на среде ISP 9. Рост при различных температурах и начальных значениях pH определяли на среде ПДА (г/л): пептон – 5; дрожжевой экстракт – 3; глюкоза – 5; КН₂РO₄ – 0.2; агар – 15.0; pH 7.2. Устойчивость к различным концентрациям соли определяли на среде ПДА без добавления агара.

Биомассу для анализов выращивали при 28°C на той же среде ПДА без добавления агара в течение 1 сут. Клетки отделяли центрифугированием и хранили до анализа при –18°C. Хемотаксономические характеристики (состав жирных кислот, фосфолипидов, менахинонов, наличие LL-ДАП и состав сахаров в клеточных стенках) определяли, как описано ранее (Sorokin et al., 2021). Гликополимеры клеточных стенок штаммов ВКМ Ас-2570^T и ВКМ Ас-2574^T исследовали химическими и ЯМР-спектроскопическими методами согласно Шашкову и соавт. (Shashkov et al., 2009).

ДНК выделяли по методу Уилсона (Wilson, 1997). Фрагменты генов 16S рРНК амплифицировали с использованием универсальных бактериальных праймеров 27f и 1492r (Lane, 1991). Последовательности нуклеотидов определяли на автоматическом секвенаторе 3730 DNA Analyzer (“Applied Biosystems”, США). Анализ сходства полученных нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК с последовательностями типовых штаммов известных видов проводили на сайте EzBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net>; Yoon et al., 2017).

Нуклеотидные последовательности генов *gyrB*, *rpoB*, *relA*, *recA* и *atpD* были получены из аннотированных геномов, депонированных в базе данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>): SLWM00000000 (ВКМ Ас-2538^T), SHKR00000000 (ВКМ Ас-2540^T), SLWR00000000 (ВКМ Ас-2541^T), SODF00000000 (ВКМ Ас-2570^T), SLWN00000000 (ВКМ Ас-2572^T), SODU00000000 (ВКМ Ас-2574^T) и SOCE00000000 (ВКМ Ас-2575^T). Конкатенированные последовательности составляли из фрагментов генов *gyrB* (1108 п.н.), *rpoB* (891 п.н.), *relA* (1017 п.н.), *recA* (519 п.н.) и *atpD* (573 п.н.). Эволюционные расстояния для пар конкатенированных последовательностей рассчитывали по двухпараметрической модели Кимуры с исключением делеций и утраченных данных (Kimura, 1980). Филогенетические деревья на основе анализа последовательностей гена 16S рРНК (~1400 п.н.) и конкатенированных генов *gyrB–rpoB–recA–relA–atpD* (4108 п.н.) реконструировали в программе MEGA7 (Kumar et al., 2016), используя методы “neighbour-joining”, “maximum likelihood” и “minimum evolution”. Значения dDDH рассчитывали с

Таблица 1. Сходство (%) нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК, значений dDDH и ANIb и показатели генетических расстояний (*gyrB-rpoB-recA-relA-atpD*; 4108 п.н.) между изученными штаммами и типовыми штаммами филогенетически близких видов рода *Kribbella*

Сравниваемые пары штаммов	16S рРНК	dDDH	ANIb	ГР
ВКМ Ac-2538 ^T – <i>K. qitaiheensis</i> JCM 30343 ^T	99.3	Нд	Нд	0.016
ВКМ Ac-2538 ^T – <i>K. catacumbae</i> DSM 19601 ^T	99.1	27.5	81.9	0.047
ВКМ Ac-2540 ^T –ВКМ Ac-2570 ^T	98.8	32.3	86.1	0.046
ВКМ Ac-2540 ^T – <i>K. jiaoazuonensis</i> NEAU-THZ 27 ^T	99.4	42.0	90.2	0.030
ВКМ Ac-2541 ^T – <i>K. swartbergensis</i> HMC25 ^T	97.9	Нд	Нд	0.045
ВКМ Ac-2541 ^T – <i>K. turkmenica</i> 16K104 ^T	99.3	29.7	83.9	0.042
ВКМ Ac-2541 ^T –ВКМ Ac-2572 ^T	98.6	32.8	86.4	0.048
ВКМ Ac-2570 ^T – <i>K. jiaoazuonensis</i> NEAU-THZ 27 ^T	99.0	33.6	86.6	0.037
ВКМ Ac-2572 ^T – <i>K. turkmenica</i> 16K104 ^T	98.2	Нд	Нд	0.039
ВКМ Ac-2572 ^T – <i>K. swartbergensis</i> HMC25 ^T	99.4	48.7	91.7	0.028
ВКМ Ac-2574 ^T – <i>K. soli</i> FMN22 ^T	99.7	41.8	90.1	0.033
ВКМ Ac-2574 ^T – <i>K. speibonae</i> YM55 ^T	98.8	42.3	89.8	0.030
ВКМ Ac-2574 ^T – <i>K. sindirgiensis</i> FSN23 ^T	99.3	49.8	92.6	0.027
ВКМ Ac-2575 ^T – <i>K. monticola</i> NEAU-SW 521 ^T	99.3	Нд	Нд	0.016

Примечание. ГР – генетическое расстояние; Нд – нет данных.

использованием калькулятора геномных дистанций (формула (2), <http://ggdc.dsmz.de/ggdc.php/>; Meier-Kolthoff et al., 2013). Для расчета ANIb использовали веб-сервер JSpeciesWS (Richter et al., 2015).

Филогеномное дерево на основе однокопийных генов геномов изученных штаммов и имеющих геномов типовых штаммов рода *Kribbella* строили на сайте BV-BRC (Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center, <https://www.bv-brc.org/>) методом Codon Tree с использованием глобальных семейств белков PATRIC (PGFams) в качестве гомологичных групп (Olson et al., 2023). Для каждого из выбранных однокопийных генов использовалась белковая и нуклеотидная последовательности, которые выравнивали, соответственно, с помощью MUSCLE и функции BioPython. Наборы выравниваний объединяли в матрицу данных и анализировали с помощью RAxML (версия 8.2.11) и Fast Bootstrapping (Olson et al., 2023).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Генотипические характеристики. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей фрагментов генов 16S рРНК выявил 96.2–99.7% сходства изученных штаммов с типовыми штаммами описанных видов рода *Kribbella* и 98.2–99.3% изученных штаммов между собой. Положение штаммов на древе, построенном на основе фрагментов генов 16S рРНК, представлено на рис. 1а.

Штаммы группировались с известными видами с низкими “bootstrap”-показателями (максимальное значение 62% для пары ВКМ Ac-2540^T–*K. jiaoazuonensis* NEAU-THZ27^T). На древе, построенном на основе последовательностей *gyrB-rpoB-recA-relA-atpD* (4108 п.н.), изученные штаммы группировались с типовыми штаммами известных видов с высокими значениями “bootstrap” (84–100%), за исключением ВКМ Ac-2570^T (рис. 1б). Топология этого древа хорошо согласуется с результатами филогеномного анализа (рис. S1).

Значения dDDH и ANIb между изученными штаммами и ближайшими к ним типовыми штаммами описанных видов криббелл, для которых имеются данные по последовательностям геномов, не превышали 49.8 и 92.6% соответственно (табл. 1), что существенно ниже границ видов прокариот, 70 и 95–96% (Meier-Kolthoff et al., 2013; Ciufu et al., 2018).

Генетические расстояния, вычисленные на основе последовательностей конкатенированных генов (4108 п.н.) между изученными штаммами и типовыми штаммами известных видов (0.016–0.092) и непосредственно между изученными штаммами (0.042–0.076) были в диапазоне значений, определенных между известными видами рода *Kribbella* (0.014–0.095) (табл. S1).

Фенотипические характеристики. На всех агаризованных ISP-средах культуры формировали характерные для криббелл колонии: бесцветные

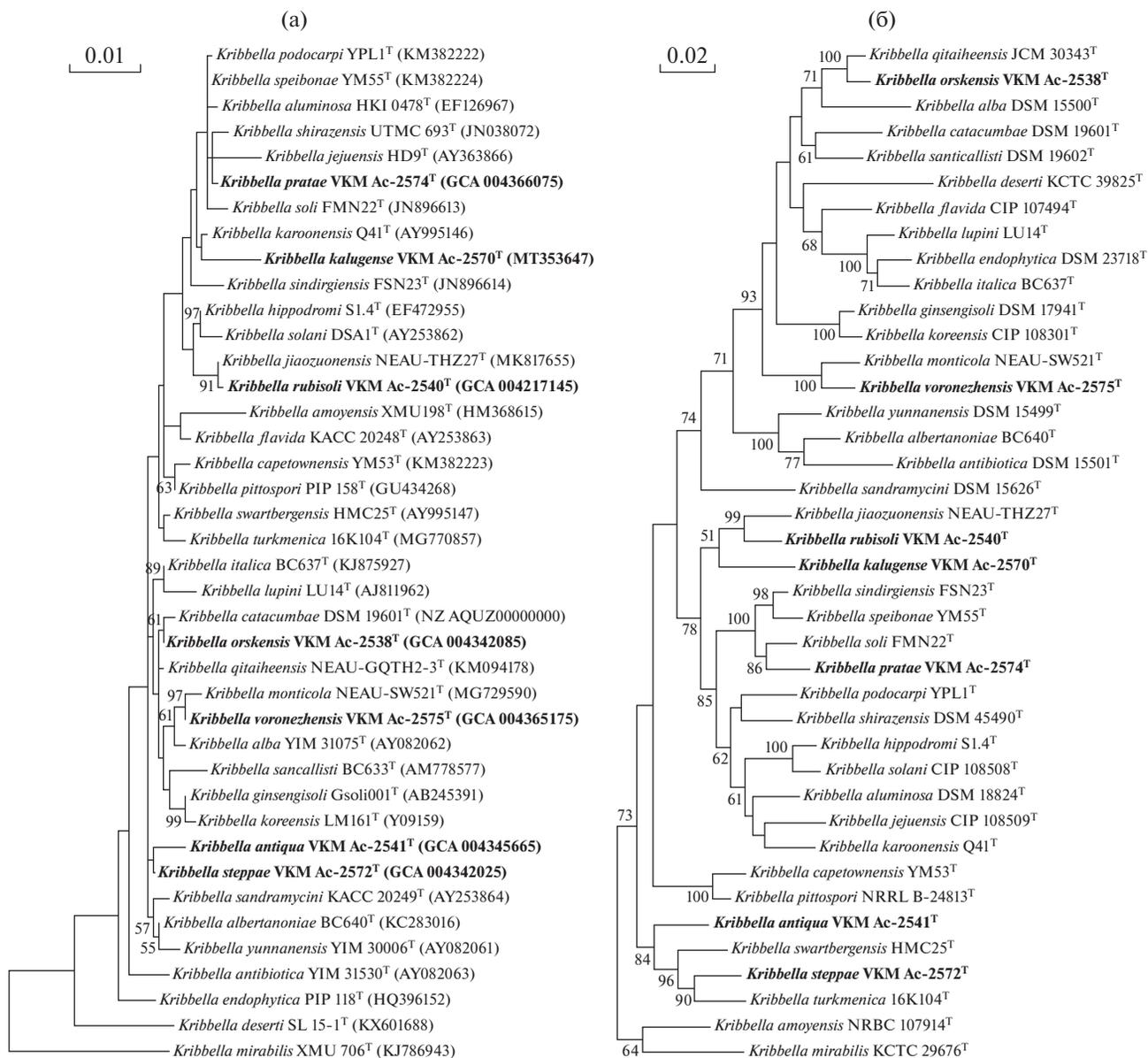


Рис. 1. Филогенетическое положение штаммов рода *Kribbella* на основе анализа нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК (а) и конкатенированных генов *gyrB-rpoB-recA-relA-atpD* (б); группировка по методу “maximum-likelihood”. Указаны значения статистической достоверности порядка ветвления для 1000 альтернативных деревьев (выше 50%). Внешняя группа – *Microlunatus phosphovorius* NM-1^T (AP012204).

или слегка желтоватые, плотные или пастообразные, обычно выросшие в агар, без выраженных отличий между штаммами (видами). На ряде сред на 5–7 сут развивался белый воздушный мицелий. При росте на жидкой и агаризованных средах в молодой культуре образовывались разветвленные гифы, которые фрагментировались с возрастом (рис. 2а, 2б). У ряда штаммов формировались не описанные ранее у криббелл спорангиеподобные структуры, достигающие 4 мкм в диаметре (рис. 2б, 2в), которые делились септами в продольном и поперечном направлениях (рис. 2г). В результате образовывались конгломераты клеток разной величины

и формы, которые при переносе на свежую питательную среду прорастали и давали начало новым гифам. Физиолого-биохимические признаки изученных штаммов характерны для рода *Kribbella* (приведены в табл. 2 и в описаниях новых видов).

У всех изученных штаммов выявлен доминирующий менахинон МК-9(Н₄). В составе жирных кислот преобладали *anteiso*-C_{15:0}, *iso*-C_{16:0} и *anteiso*-C_{17:0}. В минорных количествах (менее 2%) у штаммов ВКМ Ас-2538^T и ВКМ Ас-2541^T обнаружены кислоты 2-ОН-*iso*-C_{17:0} и 11Ме-C_{18:1}, у ВКМ Ас-2570^T найдена 10Ме-C_{17:0}. Полярные липиды

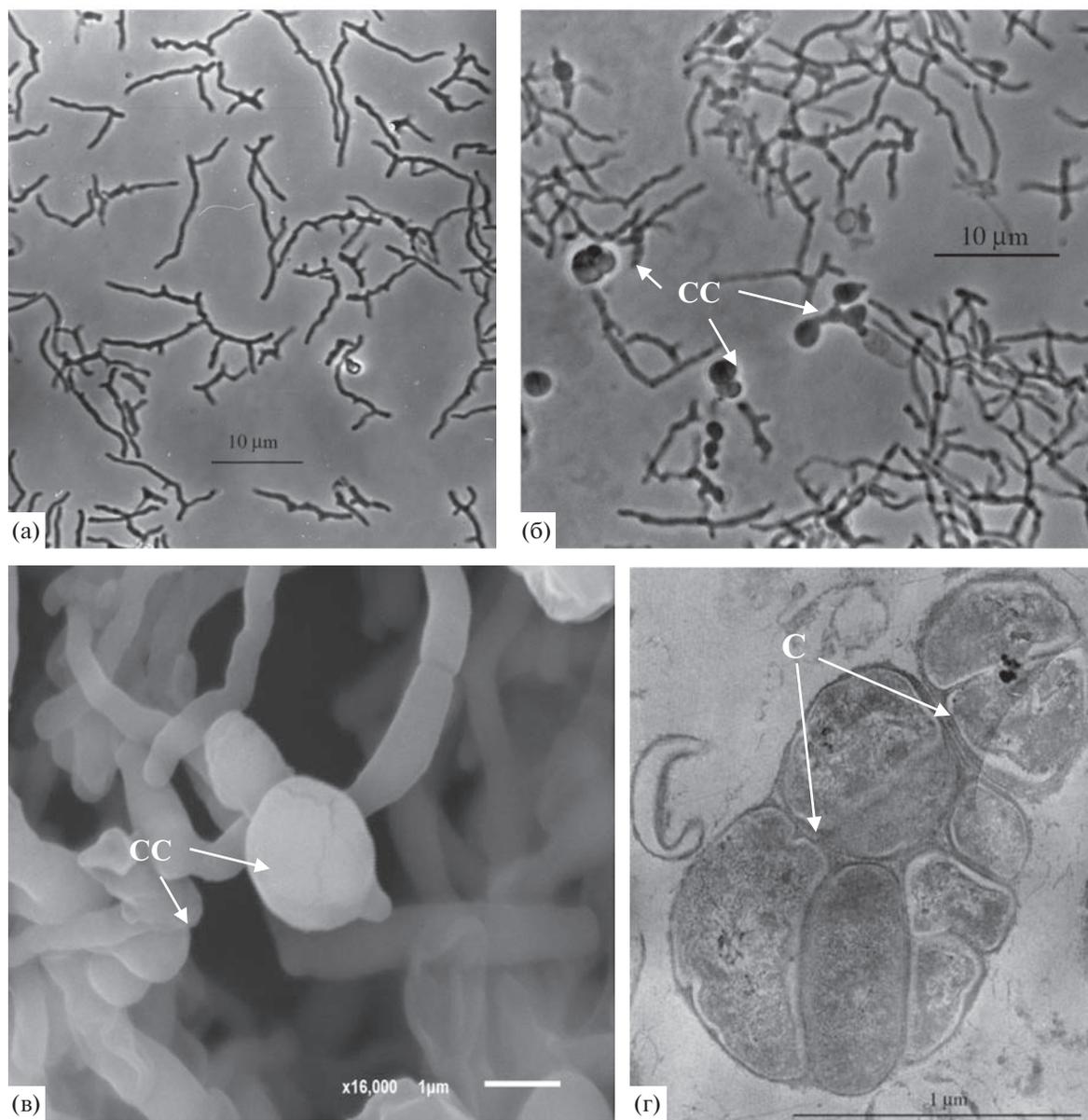


Рис. 2. Морфология штамма ВКМ Ас-2538^T: гифы и спорангиеподобные структуры (а, б) – световая микроскопия, в – сканирующая электронная микроскопия); (г) – полиморфные клетки, образованные в результате деления спорангиеподобных структур множественными септами (электронная микроскопия срезов). Обозначения: СС – спорангиеподобные структуры, С – начало формирования септы.

включали преобладающие фосфолипиды – фосфатидилхолин, фосфатидилинозит, фосфатидилглицерин и дифосфатидилглицерин, а также минорные неидентифицированные липиды, фосфо- и гликолипиды (Автух и соавт., 2011). Клеточные стенки всех исследованных штаммов содержали LL-ДАП и маннозу, а также галактозу и глюкозу или их следы. У штаммов ВКМ Ас-2541^T, ВКМ Ас-2572^T и ВКМ Ас-2575^T обнаружены 3-О-метилгалактоза (мадуроза) и 2,3-ди-О-метилгалактоза. Рибоза, найденная в гидролизатах целых

клеток большинства ранее описанных видов рода *Kribbella*, не была обнаружена.

Отличия на уровне фенотипа были обнаружены между всеми изученными нами штаммами и типовыми штаммами филогенетически близких к ним видов (табл. 2), в том числе между ВКМ Ас-2538^T и *K. qitaiheensis* JCM 30343^T (сходство последовательностей генов *gyrB-rpoB-recA-relA-atpD* – 0.016). В отличие от *K. qitaiheensis*, штамм ВКМ Ас-2538^T формировал, в частности, спорангиеподобные структуры, рос при 4% NaCl и не рос при 37°C, характеризовался наличием оксидазной,

Таблица 2. Некоторые дифференцирующие признаки изученных штаммов и ближайших видов рода *Kribbella*

Характеристики	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Г + Ц, мол. % (геном)	68.0	Нд	68.5	68.6	67.5	67.5	67.5	68.0	67.5	68.0	69.0	Нд	68.0	68.0	68.0	67.5
Размер генома, млн. п.о.	9.2	Нд	8.9	8.9	9.6	8.6	8.3	8.7	8.1	9.1	7.4	Нд	8.4	8.8	8.0	8.0
Число генов, кодирующих белки	8926	Нд	8451	8436	8775	8227	7977	8181	7760	8806	6877	Нд	7955	8271	7379	7350
Сахара целых клеток	Нд	Rib, Glc	Glc, Rib, Man	Нд	Нд	Нд	Нд	Rib, Glc	Нд	Нд	Rib, Glc	Man, Rib	Нд	Rib, Glc, Man	Нд	Rib, Glc, Gal
Жирные кислоты	<i>iC</i> _{16:0}	<i>iC</i> _{15:0}	<i>aC</i> _{15:0}	<i>aC</i> _{15:0}	<i>iC</i> _{15:0}	<i>aC</i> _{15:0}	<i>iC</i> _{16:0}	<i>iC</i> _{16:0}	<i>aC</i> _{15:0}	<i>aC</i> _{15:0}	<i>iC</i> _{16:0}	<i>aC</i> _{15:0}	<i>aC</i> _{15:0}	<i>aC</i> _{15:0}	<i>aC</i> _{15:0}	<i>iC</i> _{16:0}
	<i>aC</i> _{15:0}	<i>iC</i> _{16:0}	<i>iC</i> _{16:0}	<i>iC</i> _{16:0}	<i>iC</i> _{17:1}	<i>iC</i> _{16:0}	<i>aC</i> _{15:0}	<i>iC</i> _{14:0}	<i>iC</i> _{16:0}	<i>iC</i> _{16:0}	<i>iC</i> _{15:0}	<i>iC</i> _{16:0}	<i>iC</i> _{16:0}	<i>iC</i> _{16:0}	<i>aC</i> _{17:0}	<i>aC</i> _{15:0}
	<i>iC</i> _{15:0}	<i>C</i> _{17:1}	<i>aC</i> _{15:0}	<i>aC</i> _{15:0}	<i>aC</i> _{15:0}	<i>aC</i> _{17:0}	<i>aC</i> _{17:0}	<i>aC</i> _{15:0}	<i>iC</i> _{17:1}	<i>iC</i> _{17:0}	<i>aC</i> _{15:0}	<i>iC</i> _{15:0}	<i>aC</i> _{15:0}	<i>aC</i> _{16:0}	<i>iC</i> _{16:0}	<i>aC</i> _{15:0}
$\Sigma(iC_{14:0}, iC_{16:0}, iC_{18:0})$	43.8	22.9	16.7	11.2	Нд	23.6	33.6	58.4	23.2	21.1	24.8	19.9	21.3	14.1	14.4	39.2
$\Sigma(iC_{15:0}, iC_{17:0})$	15.8	30.8	8.2	17.1	20.5	10.1	7.2	5.4	14.2	15.9	29.7	20.3	13.2	7.1	13.0	8.0
$\Sigma(aC_{15:0}, aC_{17:0})$	26.4	5.2	37.2	49.3	22.4	43.0	35.4	19.0	37.0	40.0	23.4	30.7	49.7	37.0	46.0	29.8
Рост при:																
37°C	–	+	+	+	–	+	–	+	+	+	+	+	+	–	+	+
42°C	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
NaCl _{max} , %	4	2	3	3–5	3	4	4	3	4	4	6	4	5	3	4	2
Образование каталазы	+	–	+	+	+	+	+	Нд	+	+	Нд	+	+	Нд	+	Нд
Образование оксидазы	+	–	–	+	+	+	+	Нд	+	+	Нд	Нд	+	Нд	+	Нд
Деградация:																
крахмал	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
мочевина	+	–	+	+	–	+	+	–	+	+	–	–	+	+	–	–
твин-80	+	+	+	+	+	+	–	+	–	+	+	+	+	–	+	–
L-тирозин	–	–	+	+	+	+	–	–	–	–	+	+	+	+	+	–
эскулин	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–	+
Образование H ₂ S	+	–	Нд	+	–	–	–	–	–	–	–	+	+	Нд	+	–

Примечание. 1 – ВКМ Ac-2538^T; 2 – *K. qitaiheensis* JCM 30343^T; 3 – *K. sindirgintensis* FSN23^T; 4 – *K. speitboae* YM55^T; 5 – *K. cataractae* DSM 19601^T; 6 – ВКМ Ac-2540^T; 7 – ВКМ Ac-2570^T; 8 – *K. jiaozhouensis* NEAU-THZ 27^T; 9 – ВКМ Ac-2541^T; 10 – ВКМ Ac-2572^T; 11 – *K. turkmenica* 16K104^T; 12 – *K. swarbergensis* HMC25^T; 13 – ВКМ Ac-2574^T; 14 – *K. soli* FMN22^T; 15 – ВКМ Ac-2575^T; 16 – *K. monticola* NEAU-SW 521^T; “+” – присутствует или положительный результат теста; “–” – отсутствует или отрицательный результат теста; “±” – следовые количества; Нд – нет данных; Gal – галактоза; Glc – глюкоза; Man – манноза; Rib – рибоза. Данные для известных видов рода *Kribbella* взяты из публикаций с описанием соответствующих видов (Kirby et al., 2006; Guo et al., 2015; Ozdemir-Kocak et al., 2017; Song et al., 2018; Saygin et al., 2019; Zhao et al., 2019; Curtis et al., 2020) и базы данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Таблица 3. Гликополимеры и сахара клеточных стенок изученных штаммов рода *Kribbella*

Штаммы	ВКМ Ac-2538 ^T	ВКМ Ac-2540 ^T	ВКМ Ac-2541 ^T	ВКМ Ac-2570 ^T	ВКМ Ac-2572 ^T	ВКМ Ac-2574 ^T	ВКМ Ac-2575 ^T
Гликополимеры:							
маннан	+	+	+	+	+	+	+
ТУК1	+	+	–	+	–	+	–
ТУК2	–	–	–	–	+	–	–
ТУЛК1	–	–	+	–	–	–	–
ТУЛК2	–	–	–	–	+	–	+
Сахара:							
манноза	+	+	+	+	+	+	+
галактоза	±	±	±	±	+	±	+
глюкоза	±	±	±	+	–	±	±
3-О-метилгалактоза	–	–	+	–	+	–	+
2,3-ди-О-метилгалактоза	–	–	+	–	+	–	+
β-псевдаминная кислота	–	–	+	–	+	–	+

Примечание. ТУК – тейхуроновая кислота; ТУЛК – тейхулозоновая кислота; “+” – присутствует; “–” – отсутствует; “±” – следовые количества (структуры гликополимеров представлены на рис. 3).

катализной и уреазной активностями, не разлагал эскулин и был способен образовывать сероводород. Кроме того, штаммы выделены из биотопов с разными физико-химическими условиями: штамм ВКМ Ac-2538 – из чернозема (Оренбургская обл., РФ), а штамм *K. qitaiheensis* JCM 30343^T – из илистой почвы ручья (северо-восток Китая).

Состав и структура гликополимеров клеточных стенок и их таксономическая значимость. Гликополимеры, выявленные у криббелл в настоящей работе (у штаммов ВКМ Ac-2570^T и ВКМ Ac-2574^T) и описанные ранее (у ВКМ Ac-2538^T, ВКМ Ac-2540^T, ВКМ Ac-2541^T, ВКМ Ac-2572^T, ВКМ Ac-2575^T) (Shashkov et al., 2009; Tul'skaya et al., 2011), представляли собой маннан, тейхуроновые и тейхулозоновые кислоты, которые присутствовали в клеточных стенках исследованных штаммов в разных комбинациях (табл. 3).

¹³C ЯМР-спектры гликополимеров штаммов ВКМ Ac-2570^T и ВКМ Ac-2574^T были идентичны и сходны с полученными ранее спектрами для штаммов ВКМ Ac-2538^T и ВКМ Ac-2540^T, что свидетельствовало и об идентичности и самих полимеров. Нейтральный полимер, идентифицированный у всех штаммов криббелл, изученных в настоящей работе и ранее (Shashkov et al., 2009; Tul'skaya et al., 2011), представлял собой (1 → 6)-связанный α-маннан, несущий по О-2 боковые остатки α-маннозы (рис. 3а).

Штаммы ВКМ Ac-2570^T и ВКМ Ac-2574^T (а также ВКМ Ac-2538^T и ВКМ Ac-2540^T) содержали второй полимер – тейхуроновою кислоту (ТУК1; рис. 3б), построенную из чередующихся остатков

N-ацетилированных производных диаминоманнуриновой кислоты и диаминоглюкозы – моносахарида, редко встречающегося в гликополимерах грамположительных бактерий (Shashkov et al., 2009). Тейхуроновою кислота штамма ВКМ Ac-2572^T (ТУК2; рис. 3б) включала остатки N-ацетилированных производных аминманнуриновой кислоты и другого редко встречающегося в гликополимерах моносахарида – ацетилированной по О-4 диаминоглюкозы, а также тейхулозоновую кислоту (ТУЛК2; рис. 3в) (Tul'skaya et al., 2011).

Основная цепь тейхулозоновых кислот штаммов ВКМ Ac-2541^T, ВКМ Ac-2572^T и ВКМ Ac-2575^T содержала остатки β-псевдаминной кислоты (Tul'skaya et al., 2011). При этом в полимере штамма ВКМ Ac-2541^T (имеющем регулярную структуру) β-псевдаминная кислота присутствовала в виде 4-гидроксипутирата (ТУЛК1; рис. 3в) и несла боковые остатки 3-О-метилгалактозы (мадуросы, α-Galp3OMe) и/или 2,3-ди-О-метилгалактозы (α-Galp2,3OMe) (Shashkov et al., 2009). Тейхулозоновая кислота штаммов ВКМ Ac-2572^T и ВКМ Ac-2575^T (ТУЛК2; рис. 3в) имела нерегулярную структуру и включала два типа фрагментов – А и Б. Фрагменты А (преобладающие) состояли из остатков галактозил-4-гидроксипутирата β-псевдаминной кислоты, несущей боковые заместители α-Galp3OMe или α-Galp2,3OMe. Фрагменты Б (минорные) идентичны по структуре ТУЛК1, обнаруженной у штамма ВКМ Ac-2541^T.

На основе вышеизложенных данных можно заключить, что разветвленный α-маннан, присутствующий у всех изученных представителей рода и не описанный у других прокариотных мик-

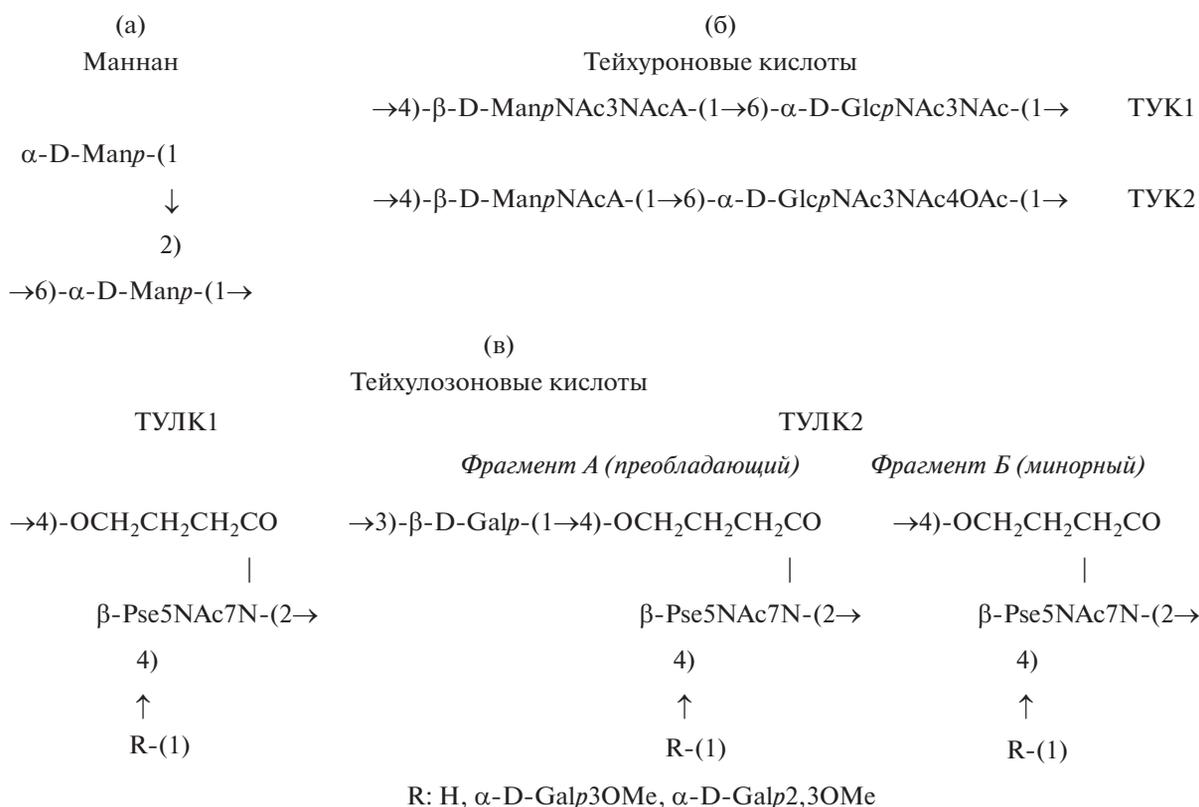


Рис. 3. Структуры гликополимеров клеточных стенок изученных штаммов. Обозначения: ТУК1 – тейхуроновая кислота клеточной стенки штаммов ВКМ Ас-2538^T, ВКМ Ас-2540^T, ВКМ Ас-2570^T и ВКМ Ас-2574^T; ТУК2 – тейхуроно-вая кислота клеточной стенки штамма ВКМ Ас-2572; ТУЛК1 – тейхулозоновая кислота с регулярной структурой штамма ВКМ Ас-2541^T; ТУЛК2 – тейхулозоновая кислота с нерегулярной структурой штаммов ВКМ Ас-2572^T и ВКМ Ас-2575^T; Pse – псевдааминовая кислота; OCH₂CH₂CH₂CO – остаток 4-гидроксипутирата; α-D-Galp3OMe – 3-О-метилгалактоза, α-D-Galp2,3OMe – 2,3-ди-О-метилгалактоза.

роорганизмов, может служить в качестве хемотаксономического маркера рода *Kribbella*, а комбинации разных по структуре тейхуроновых и тейхулозоновых кислот (также известных к настоящему времени только у криббелл), специфичны для отдельных видов или групп видов рода. Кроме того, диагностическими хемотаксономическими признаками отдельных видов или групп видов рода *Kribbella* могут являться и выявляемые хроматографическими методами при анализе состава сахаров клеточных стенок компоненты гликополимеров, в частности, 3-О-метилгалактоза (мадуроза), 2,3-ди-О-метилгалактоза, а также галактоза и глюкоза (манноза присутствует у всех изученных штаммов). Интересно отметить, что сходный состав гликополимеров и их структурных компонентов могут иметь как близкородственные, так и филогенетически удаленные виды криббелл.

Таким образом, показатели сходства геномов (таксогеномные показатели) dDDH и ANIb, а также значения эволюционных расстояний на основе конкатенированных генов *gyrB-rpoB-recA*–

relA-atpD, согласующиеся с обособленным положением изученных штаммов на филогенетических и филогеномном деревьях, с одной стороны, и отличия штаммов друг от друга и от типовых штаммов ближайших видов на фенотипическом уровне, с другой стороны, позволяют описать семь изученных штаммов в качестве семи новых видов рода *Kribbella*.

С учетом полученной новой информации и ранее опубликованных данных (Lee et al., 2000; Kirby et al., 2006; Shashkov et al., 2009; Evtushenko, Krauzova, 2010; Tul'skaya et al., 2011; Everest et al., 2013; Nouioui et al., 2018; Meyers, 2021) предлагается также дополненное и исправленное описание рода.

**Дополненное и исправленное описание рода
Kribbella Park et al. 1999 emend. Sohn et al.
2003 emend. Everest et al. 2013**

Описание рода как опубликовано Park et al. (1999) и исправлено и дополнено позже Sohn et al.

(2003), Everest et al. (2013), со следующими изменениями.

Представители рода могут образовывать спорангиеподобные структуры до 4 мкм в диаметре, делящиеся септами в продольном и поперечном направлениях с образованием конгломератов полиморфных клеток. Аэробы, возможен слабый анаэробный рост. Остатки мурамовой кислоты пептидогликана N-ацетилованы. Гликополимеры клеточных стенок включают α -маннан, а также комбинации различных по структуре тейхуроновых и/или тейхулозоновых кислот. В составе сахаров клеточных стенок присутствует манноза, у ряда видов обнаруживается 3-O-метилгалактоза (мадуроза) и 2,3-ди-O-метилгалактоза. Преобладают насыщенные *iso*- и *anteiso*-разветвленные жирные кислоты. Диагностический полярный липид – фосфотидилхолин, дополнительно обнаруживаются фосфатидилинозит, фосфатидилглицерин и дифосфатидилглицерин, а также различные минорные компоненты. Содержание Г + Ц пар в ДНК в пределах 65.3–71.6% (определено по температуре плавления, $T_{пл}$) и 67.0–70.6 мол. % (вычислено на основе доступных последовательностей геномов представителей рода). Род принадлежит к семейству *Kribbellaceae* Nouioui et al. 2018.

Описание *Kribbella orskensis* sp. nov.

Kribbella orskensis (orsk.en'sis. N.L. neut. adj. *orskensis*, относящийся к Орску, городу в Оренбургской области, месту отбора почвы – источника выделения типового штамма).

Пастообразные, складчатые или гладкие, матовые, бесцветные или желтоватые колонии формируются на поверхности и проникают в агар на всех ISP-средах. Воздушный мицелий белого цвета. Растворимые пигменты отсутствуют. Тонкие разветвленные вегетативные и воздушные гифы фрагментируются с возрастом на палочковидные и кокковидные элементы. На гифах образуются спорангиеподобные структуры до 4 мкм в диаметре, делящиеся септами в продольном и поперечном направлении; в результате образуются плотные конгломераты полиморфных клеток, которые прорастают при переносе на свежие питательные среды. Оптимум роста 28°C, рост отсутствует при 6 и 37°C. Растет на ПДА в присутствии 1–4% NaCl и при исходных значениях pH 5–11 (оптимум – pH 7).

Аэроб. Каталазо-, оксидазо- и уреазоположительен. Использует в качестве источника углерода и энергии L-арабинозу, D-глюкозу, D-ксилозу, D-лактозу, D-мальтозу, D-маннозу, L-рамнозу, D-фруктозу, раффинозу, сахарозу, глицерин, инозит и маннит на среде ISP 9; не использует дульцит, сорбит и целлюлозу. Гидролизует желатин, крахмал и твин-80. Не разлагает гипоксан-

тин, казеин, ксантин, L-тирозин и эскулин. Образует H_2S .

Клеточная стенка содержит LL-ДАП, маннозу, следы галактозы и глюкозы. Гликополимеры клеточной стенки – разветвленный α -маннан и тейхуроновая кислота, основная цепь которой состоит из чередующихся остатков N-ацетил-диаминоманнуриновой кислоты и N-ацетил-диамноглокозы.

Доминирующий менахинон – МК-9(H_4). Полярные липиды – фосфатидилхолин, дифосфатидилглицерин, фосфатидилглицерин, фосфатидилинозит и ряд неидентифицированных компонентов. В составе жирных кислот преобладают *iso*- $C_{16:0}$, *anteiso*- $C_{15:0}$ и *iso*- $C_{15:0}$. Содержание Г + Ц пар в геноме типового штамма 68%, размер генома ≈ 9.2 млн п.н.

Типовой штамм ВКМ Ас-2538^T выделен из чернозема (Оренбургская обл., РФ).

Последовательность гена 16S рРНК штамма ВКМ Ас-2538^T депонирована в GenBank под номером MT525347. Последовательность генома штамма ВКМ Ас-2538^T депонирована в GenBank под номером SLWM00000000.

Описание *Kribbella rubisoli* sp. nov.

Kribbella rubisoli (ru.bi.so'li. L. n. *rubus* малина; L. n. *solum* почва; N.L. *rubisoli*, относящийся к источнику выделения штамма).

Пастообразные, складчатые или гладкие, матовые, бесцветные или желтоватые колонии формируются на поверхности и проникают в агар на всех ISP-средах. Растворимые пигменты отсутствуют. Воздушный мицелий белого цвета. Тонкие разветвленные вегетативные и воздушные гифы слабо или интенсивно фрагментируются с возрастом на палочковидные и кокковидные элементы. Растет на ПДА при 37°C, не растет при 6 и 42°C (оптимум – 28°C). Растет на ПДА в присутствии 1–4% NaCl и при исходных значениях pH 5–11 (оптимум – pH 7).

Аэроб. Каталазо-, оксидазо- и уреазоположительен. Способен использовать в качестве источника углерода и энергии D-глюкозу, D-ксилозу, D-лактозу, D-мальтозу, D-маннозу, L-рамнозу, D-фруктозу, раффинозу, сахарозу, инозит и маннит на среде ISP 9; не использует L-арабинозу, глицерин, дульцит, сорбит и целлюлозу. Гидролизует гипоксантин, желатин, казеин, крахмал, ксантин, твин-80, L-тирозин и эскулин. Не образует H_2S .

Клеточная стенка содержит LL-ДАП, маннозу, следы галактозы и глюкозы. Гликополимеры клеточной стенки – разветвленный α -маннан и тейхуроновая кислота, основная цепь которой состоит из чередующихся остатков N-ацетил-диами-

номаннуриновой кислоты и N-ацетил-диаминоглюкозы.

Доминирующий менахинон – МК-9(H₄). Полярные липиды – фосфатидилхолин, дифосфатидилглицерин, фосфатидилглицерин, фосфатидилинозит и несколько неидентифицированных компонентов. В составе жирных кислот преобладают *anteiso*-C_{15:0}, *iso*-C_{16:0} и *anteiso*-C_{17:0}. Содержание Г + Ц пар в геноме типового штамма 67.5 %, размер генома ≈8.6 млн п.н.

Типовой штамм ВКМ Ас-2540^T выделен из почвы посадок малины (Мордовия, РФ).

Последовательность гена 16S рРНК штамма ВКМ Ас-2540^T депонирована в GenBank под номером MT525349. Последовательность генома штамма ВКМ Ас-2540^T депонирована в GenBank под номером SHKR00000000.

Описание *Kribbella antiqua* sp. nov.

Kribbella antiqua (an'ti.qu.a. L. neut. adj. *antiqua*, древний, указывающий на древний возраст почвы, из которой выделен типовой штамм).

Пастообразные, складчатые или гладкие, матовые бесцветные или желтоватые колонии формируются на поверхности и проникают в агар на всех ISP-средах. Растворимые пигменты отсутствуют. Воздушный мицелий белого цвета. Тонкие разветвленные вегетативные и воздушные гифы слабо или интенсивно фрагментируются с возрастом на палочковидные и кокковидные элементы. Растет на ПДА при 42°C, не растет при 6 и 50°C (оптимум – 28°C). Растет на ПДА в присутствии 1–4% NaCl и при исходных значениях pH 5–11 (оптимум – pH 7).

Аэроб. Каталазо-, оксидазо- и уреазоположительен. Способен использовать в качестве источника углерода и энергии L-арабинозу, D-глюкозу, D-ксилозу, D-лактозу, D-мальтозу, D-маннозу, L-рамнозу, D-фруктозу, раффинозу, сахарозу, глицерин, инозит, маннит и сорбит на среде ISP; не использует дульцит и целлюлозу. Гидролизует гипоксантин, желатин, казеин, крахмал, ксантин и эскулин. Не разлагает твин-80 и L-тирозин. Не образует H₂S.

Клеточная стенка содержит LL-ДАП, маннозу, 3-О-метилгалактозу, 2,3-ди-О-метилгалактозу, следы галактозы и глюкозы. Гликополимеры клеточной стенки – разветвленный α-маннан и тейхуроновая кислота, основная цепь которой содержит остатки 4-гидроксипутирата β-псевдаминовой кислоты с боковыми заместителями – 3-О-метилгалактозой или 2,3-ди-О-метилгалактозой.

Доминирующий менахинон – МК-9(H₄). Полярные липиды – фосфатидилхолин, дифосфатидилглицерин, фосфатидилглицерин, фосфатидилинозит и несколько неидентифицированных

компонентов. В составе жирных кислот преобладают *anteiso*-C_{15:0}, *iso*-C_{16:0}, *iso*-C_{17:1} и *anteiso*-C_{17:0}. Содержание Г + Ц пар в геноме типового штамма 67.5 %, размер генома ≈8.1 млн п.н.

Типовой штамм ВКМ Ас-2541^T выделен из образца погребенной почвы, отобранного при археологических раскопках (Волгоградская обл., РФ).

Последовательность гена 16S рРНК штамма ВКМ Ас-2541^T депонирована в GenBank под номером MT525350. Последовательность генома штамма ВКМ Ас-2541^T депонирована в GenBank под номером SLWR00000000.

Описание *Kribbella kalugense* sp. nov.

Kribbella kalugense (ka.lug.en'se. N.L. neut. adj. *kalugense*, относящийся к Калуге, областному центру территории, на которой отобран образец почвы – источник выделения типового штамма).

Пастообразные, складчатые или гладкие, матовые, бесцветные или желтоватые колонии формируются на поверхности и проникают в агар на всех ISP-средах. Воздушный мицелий белого цвета. Растворимые пигменты отсутствуют. Тонкие разветвленные вегетативные и воздушные гифы слабо или интенсивно фрагментируются с возрастом на палочковидные и кокковидные элементы. Оптимум роста 28°C, не растет при 6 и 37°C. Растет на ПДА в присутствии 1–4% NaCl и при исходных значениях pH 5–11 (оптимум – pH 7).

Аэроб. Каталазо-, оксидазо- и уреазоположительен. Способен использовать в качестве источника углерода и энергии L-арабинозу, D-глюкозу, D-мальтозу, D-фруктозу, раффинозу, инозит и целлюлозу на среде ISP 9; не использует D-ксилозу, D-лактозу, D-маннозу, L-рамнозу, сахарозу, глицерин, дульцит, маннит и сорбит. Гидролизует желатин, казеин, крахмал и эскулин. Не разлагает гипоксантин, твин-80 и L-тирозин. Не образует H₂S.

Клеточная стенка содержит LL-ДАП, маннозу, глюкозу и следы галактозы. Гликополимеры клеточной стенки – разветвленный α-маннан и тейхуроновая кислота, основная цепь которой включает чередующиеся остатки N-ацетил-диаминоманнуриновой кислоты и N-ацетил-диаминоглюкозы.

Доминирующий менахинон – МК-9(H₄). Полярные липиды – фосфатидилхолин, дифосфатидилглицерин, фосфатидилглицерин, фосфатидилинозит и несколько неидентифицированных компонентов. В составе жирных кислот преобладают *iso*-C_{16:0}, *anteiso*-C_{15:0} и *anteiso*-C_{17:0}. Содержание Г + Ц пар в геноме типового штамма 67.5%, размер генома ≈8.3 млн п.н.

Типовой штамм ВКМ Ас-2570^T выделен из почвы луга (Калужская обл., РФ).

Последовательность гена 16S рРНК штамм ВКМ Ас-2570^T депонирована в GenBank под номером MT353647. Последовательность генома штамма ВКМ Ас-2570^T депонирована в GenBank под номером SODF00000000.

Описание *Kribbella steppae* sp. nov.

Kribbella steppae (stepp.a'e. L. n. *steppe* степь; N.L. *steppae*, относящийся к степи, месту обнаружения типового штамма).

Пастообразные, складчатые или гладкие, матовые, бесцветные или желтоватые колонии формируются на поверхности и проникают в агар на всех ISP-средах. Воздушный мицелий белого цвета. Тонкие разветвленные вегетативные и воздушные гифы слабо или интенсивно фрагментируются с возрастом на палочковидные и кокковидные элементы. Растворимые пигменты отсутствуют. Растет на ПДА при 37°C, не растет при 6 и 42°C (оптимум – 28°C). Растет на ПДА в присутствии 1–4% NaCl и при исходных значениях pH 5–10 (оптимум – pH 7).

Аэроб. Каталазо-, оксидазо- и уреазоположительен. Способен использовать в качестве источника углерода и энергии L-арабинозу, D-глюкозу, D-ксилозу, D-лактозу, D-мальтозу, D-маннозу, L-рамнозу, D-фруктозу, раффинозу, сахарозу, глицерин, дульцит, инозит, маннит и сорбит на среде ISP 9; не использует целлюлозу. Гидролизует гипоксантин, желатин, казеин, крахмал, ксантин, твин-80 и эскулин. Не разлагает L-тирозин. Не образует H₂S.

Клеточная стенка содержит LL-ДАП, маннозу, 3-О-метилгалактозу, 2,3-ди-О-метилгалактозу и галактозу. Гликополимеры клеточной стенки включают разветвленный α-маннан, тейхуроновую кислоту, основная цепь которой состоит из чередующихся остатков N-ацетил-аминоманнуриновой кислоты и N-ацетил-диаминоглюкозы (ацетилированной по О-4), и тейхулозоновую кислоту – гетерополимер, в котором остатки галактозил-4-гидроксibuтирата β-псевдаминовой кислоты нерегулярно чередуются с остатками 4-гидроксibuтирата β-псевдаминовой кислоты. В обоих случаях остатки β-псевдаминовой кислоты имеют боковые заместители – 3-О-метилгалактозу или 2,3-ди-О-метилгалактозу.

Доминирующий менахинон – МК-9(H₄). Полярные липиды – фосфатидилхолин, дифосфатидилглицерин, фосфатидилглицерин, фосфатидилинозит и несколько неидентифицированных компонентов. В составе жирных кислот преобладают *anteiso*-C_{15:0}, *iso*-C_{16:0}, *iso*-C_{17:0} и *iso*-C_{15:0}. Содержание Г + Ц пар в геноме типового штамма 68%, размер генома ≈9.1 млн п.н.

Типовой штамм ВКМ Ас-2572^T выделен из чернозема (Белгородская обл., РФ).

Последовательность гена 16S рРНК штамма ВКМ Ас-2572^T депонирована в GenBank под номером MT525355. Последовательность генома штамма ВКМ Ас-2572^T депонирована в GenBank под номером SLWN00000000.

Описание *Kribbella pratensis* sp. nov.

Kribbella pratensis (prat.en'sis. L. *pratium* луг; N.L. neut. adj. *pratensis* относящийся к лугу, месту обнаружения типового штамма).

Пастообразные, складчатые или гладкие, матовые, бесцветные или желтоватые колонии формируются на поверхности и проникают в агар на всех ISP-средах. Воздушный мицелий белого цвета. Тонкие разветвленные вегетативные и воздушные гифы слабо или интенсивно фрагментируются с возрастом на палочковидные и кокковидные элементы. Растворимые пигменты отсутствуют. Растет на ПДА при 42°C, не растет при 6°C (оптимум – 28°C). Растет на ПДА в присутствии 1–5% NaCl и при исходных значениях pH 5–11 (оптимум – pH 7).

Аэроб. Каталазо-, оксидазо- и уреазоположительен. Способен использовать в качестве источника углерода и энергии L-арабинозу, D-глюкозу, D-ксилозу, D-лактозу, D-мальтозу, D-маннозу, L-рамнозу, D-фруктозу, раффинозу, сахарозу, глицерин, инозит и маннит на среде ISP 9; не использует дульцит, целлюлозу и сорбит. Гидролизует желатин, казеин, крахмал, ксантин, твин-80, L-тирозин и эскулин. Не разлагает гипоксантин. Образует H₂S.

Клеточная стенка содержит LL-ДАП, маннозу, следы галактозы и глюкозы. Гликополимеры клеточной стенки – разветвленный α-маннан, тейхуроновая кислота, основная цепь которой состоит из чередующихся остатков N-ацетил-диаминоманнуриновой кислоты и N-ацетил-диаминоглюкозы.

Доминирующий менахинон – МК-9(H₄). Полярные липиды – фосфатидилхолин, дифосфатидилглицерин, фосфатидилглицерин, фосфатидилинозит и несколько неидентифицированных компонентов. В составе жирных кислот преобладают *anteiso*-C_{15:0}, *iso*-C_{16:0} и *anteiso*-C_{17:0}. Содержание Г + Ц пар в геноме типового штамма 68%, размер генома ≈8.4 млн п.н.

Типовой штамм ВКМ Ас-2574^T выделен из почвы луга (п. Третьяки Воронежской обл., РФ).

Последовательность гена 16S рРНК штамма ВКМ Ас-2574^T депонирована в GenBank под номером MT525357. Последовательность генома штамма ВКМ Ас-2574^T депонирована в GenBank под номером SODU00000000.

Описание *Kribbella voronezhensis* sp. nov.

Kribbella voronezhensis (vo.ro.nezh.e'n.sis. N.L. neut. adj. *voronezhensis* относящийся к названию города Воронежу, месту отбора почвы, из которой выделен типовой штамм).

Пастообразные, складчатые или гладкие, матовые, бесцветные или желтоватые колонии формируются на поверхности и проникают в агар на всех ISP-средах. Воздушный мицелий белого цвета. Тонкие разветвленные вегетативные и воздушные гифы слабо или интенсивно фрагментируются с возрастом на палочковидные и кокковидные элементы. Растворимые пигменты отсутствуют. Растет на ПДА при 37°C, не растет при 6 и 42°C (оптимум – 28°C). Растет на ПДА в присутствии 1–4% NaCl и при исходных значениях pH 5–11 (оптимум – pH 7).

Аэроб. Каталазо- и оксидазоположителен. Способен использовать в качестве источника углерода и энергии L-арабинозу, D-глюкозу, D-ксилозу, D-лактозу, D-мальтозу, D-маннозу, L-рамнозу, D-фруктозу, раффинозу, сахарозу, глицерин, инозит, маннит и сорбит на среде ISP 9; не использует дульцит и целлюлозу. Гидролизует желатин, казеин, крахмал, ксантин, твин-80 и L-тирозин. Не разлагает гипоксантин и эскулин. Образует H₂S.

Клеточная стенка содержит LL-ДАП, маннозу, галактозу, 3-О-метилгалактозу, 2,3-ди-О-метилгалактозу и следы глюкозы. Гликополимеры клеточной стенки – разветвленный α-маннан и тейхулозоновая кислота – гетерополимер, в котором остатки галактозил-4-гидроксibuтирата β-псевдааминовой кислоты нерегулярно чередуются с остатками 4-гидроксibuтирата β-псевдааминовой кислоты. Остатки β-псевдааминовой кислоты в обоих случаях имеют боковые заместители – 3-О-метилгалактозу или 2,3-ди-О-метилгалактозу.

Доминирующий менахинон – МК-9(H₄). Полярные липиды – фосфатидилхолин, дифосфатидилглицерин, фосфатидилглицерин, фосфатидилинозит и несколько неидентифицированных компонентов. В составе жирных кислот преобладают *anteiso*-C_{15:0}, *anteiso*-C_{17:0} и *iso*-C_{16:0}. Содержание Г + Ц пар в геноме типового штамма 68%, размер генома ≈8.0 млн п.н.

Типовой штамм ВКМ Ас-2575^T выделен из почвы луга (п. Третьяки Воронежской обл., РФ).

Последовательность гена 16S рРНК штамма ВКМ Ас-2575^T депонирована в GenBank под номером MT525358. Последовательность генома штамма ВКМ Ас-2575^T депонирована в GenBank под номером SOCE00000000.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (соглашение № 075-15-2021-1051).

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

- Автух А.Н. Систематика актиномицетов рода *Kribbella*. Автореферат дис. ... канд. биол. наук, 29.06.2012. Пушкино: Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, 2012. 24 с.
- Автух А.Н., Винокурова Н.Г., Арискина Е.В., Дорофеева Л.В., Барышникова Л.М. Состав полярных липидов как хемотаксономический маркер видов рода *Kribbella* // Вестник Уральской медицинской академической науки. 2011. № 4/1. С. 71.
- Методы общей бактериологии. Пер. с англ. / Под ред. Герхардта Ф. и др. М.: Мир, 1984. 264 с.
- Manual of Methods for General Bacteriology // Edited by Gerhardt P. American Society for Microbiology, 1981. 524 p.
- Потехина Н.В., Шапков А.С., Тульская Е.М., Арискина Е.В., Дорофеева Л.В., Евтушенко Л.И. Галактофуранан клеточной стенки актинобактерий рода *Paenarthrobacter* // Микробиология. 2021. Т. 90. С. 122–128.
- Potekhina N.V., Shashkov A.S., Tul'skaya E.M., Ariskina E.V., Dorofeeva L.V., Evtushenko L.I. Cell wall galactofuranan of the *Paenarthrobacter* actinobacteria // Microbiology (Moscow). 2021. V. 90. P. 106–111.
- Сузина Н.Е., Дуда В.И., Есикова Т.З., Шорохова А.П., Гафаров А.Б., Олейников Р.Р., Акимов В.Н., Абашина Т.Н., Полищева В.Н., Боронин А.М. Новые ультрамикробактерии из рода *Chryseobacterium*, штаммы NF4 и NF5 факультативные эпibiонты *Bacillus subtilis* // Микробиология. 2011. Т. 80. С. 529–542.
- Suzina N.E., Duda V.I., Esikova T.Z., Shorokhova A.P., Ga-farov A.B., Oleinikov R.R., Abashina T.N., Boronin A.M., Akimov V.N., Polivtseva V.N. Novel ultramicrobacteria, strains NF4 and NF5, of the genus *Chryseobacterium*: facultative epibiotes of *Bacillus subtilis* // Microbiology (Moscow). 2011. V. 80. P. 535–548.
- Шапков А.С., Тульская Е.М., Потехина Н.В., Дмитренко А.С., Сенченкова С.Н., Зайчиков В.А., Дорофеева Л.В., Евтушенко Л.И. D-рамнан и пируватсодержащая тейхуроносовая кислота клеточной стенки *Rathayibacter* sp. ВКМ Ас-2759 // Биохимия. 2021. Т. 86. С. 595–606.
- Shashkov A.S., Tul'skaya E.M., Potekhina N.V., Dmitrenok A.S., Senchenkova S.N., Zaychikov V.A., Dorofeeva L.V., Evtushenko L.I. D-Rhamnan and pyruvate-containing teichuronic acid from the cell wall of *Rathayibacter* sp. VKM Ac-2759 // Biochemistry (Moscow). 2021. V. 86. P. 506–516.

- 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.
- Ciufo S., Kannan S., Sharma S., Badretin A., Clark K., Turner S., Brover S., Schoch C.L., Kimchi A., DiCuccio M. Using average nucleotide identity to improve taxonomic assignments in prokaryotic genomes at the NCBI // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2018. V. 68. P. 2386–2392.
- Curtis S.M., Meyers P.R. Multilocus sequence analysis of the actinobacterial genus *Kribbella* // *Syst. Appl. Microbiol.* 2012. V. 35. P. 441–446.
- Curtis S.M., Norton I., Everest G.J., Pelsler J.G., de Kock M.C., Meyers P.R. Development of a *Kribbella*-specific isolation medium and description of *Kribbella capetownensis* sp. nov. and *Kribbella speibonae* sp. nov., isolated from soil // *Antonie van Leeuwenhoek*. 2020. V. 113. P. 617–628.
- Evtushenko L.I., Krausova V.I. Genus *Kribbella* Park et al. 1999 emend. Sohn et al. 2003 // *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. V. 5. The Actinobacteria. New York: Springer, 2012. P. 1264–1280.
- Everest G.J., Curtis S.M., De Leo F., Urzi C., Meyers P.R. *Kribbella albertanoniae* sp. nov., isolated from a Roman catcomb, and emended description of the genus *Kribbella* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2013. V. 63. P. 3591–3596.
- Guo L., Zhao J., Liu C., Han C., Bai L., Sun P., Li J., Wang X., Xiang W. *Kribbella qitaiheensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from soil // *Antonie van Leeuwenhoek*. 2015. V. 6. P. 1533–1539.
- Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences // *J. Mol. Evol.* 1980. V. 16. P. 111–120.
- Kirby B.M., Le Roes M., Meyers P.R. *Kribbella karonensis* sp. nov. and *Kribbella swartbergensis* sp. nov., isolated from soil from the Western Cape, South Africa // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2006. V. 56. P. 1097–1101.
- Kirby B.M., Everest G.J., Meyers P.R. Phylogenetic analysis of the genus *Kribbella* based on the *gyrB* gene: proposal of a *gyrB*-sequence threshold for species delineation in the genus *Kribbella* // *Antonie van Leeuwenhoek*. 2010. V. 97. P. 131–142.
- Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets // *Mol. Biol. Evol.* 2016. V. 33. P. 1870–1874.
- Lane D.J. 16S/23S rRNA sequencing // *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics* / Eds. Stackebrandt E., Goodfellow M. Chichester: Wiley, 1991. P. 115–175.
- Lee S.D., Kang S.O., Hah Y.C. *Hongia* gen. nov., a new genus of the order Actinomycetales // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2000. V. 50. P. 191–199.
- Meier-Kolthoff J.P., Auch A.F., Klenk H.-P., Göker M. Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions // *BMC Bioinform.* 2013. V. 14. P. 60.
- Meyers P. Genus *Kribbella* // *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* / Ed. Carro L. Wiley: 2021. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00157.pub2>
- Naumova I.B., Shashkov A.S., Tul'skaya E.M., Streshinskaya G.M., Kozlova Y.I., Potekhina N.V., Evtushenko L.I., Stackebrandt E. Cell wall teichoic acids: structural diversity, species specificity in the genus *Nocardioopsis*, and chemotaxonomic perspective // *FEMS Microbiol. Rev.* 2001. V. 25. P. 269–283.
- Nouioui I., Carro L., Garcia-Lopez M., Meier-Kolthoff J.P., Woyke T., Kyrpides N.C., Pukall R., Klenk H.P., Goodfellow M., Göker M. Genome-based taxonomic classification of the phylum Actinobacteria // *Front. Microbiol.* 2018. V. 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02007>
- Olson R.D., Assaf R., Brettin T., Conrad N., Cucinell C., Davis J.J., Dempsey D.M., Dickerman A., Dietrich E.M., Kenyon R.W., Kuscuoglu M., Lefkowitz E.J., Lu J., Machi D., Macken C., Mao C., Niewiadomska A., Nguyen M., Olsen G.J., Overbeek J.C., Parrello B., Parrello V., Porter J.S., Pusch G.D., Shukla M., Singh I., Stewart L., Tan G., Thomas C., VanOeffelen M., Vonstein V., Wallace Z.S., Warren A.S., Wattam A.R., Xia F., Yoo H., Zhang Y., Zmasek C.M., Scheuermann R.H., Stevens R.L. Introducing the Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center (BV-BRC): a resource combining PATRIC, IRD and ViPR // *Nucleic Acids Res.* 2023. V. 51. I. D. P. D678–D689.
- Ozdemir-Kocak F., Saygin H., Saricaoglu S., Cetin D., Guven K., Spröer C., Schumann P., Klenk H.P., Sahin N., Isik K. *Kribbella soli* sp. nov., isolated from soil // *Antonie van Leeuwenhoek*. 2017. V. 110. P. 641–649.
- Park Y.-H., Yoon J.-H., Shin Y.K., Suzuki K.-I., Kudo T., Seino A., Kim H.-J., Lee J.-S., Lee S.T. Classification of “*Nocardioides fulvus*” IFO (now NBRC) 14399 and *Nocardioides* sp. ATCC 39419 in *Kribbella* gen. nov., as *Kribbella flavida* sp. nov. and *Kribbella sandramycini* sp. nov. // *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1999. V. 49. P. 743–752.
- Richter M., Rosselló-Móra R., Glöckner F.O., Peplies J. JSpeciesWS: a web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison // *Bioinformatics*. 2015. V. 32. P. 929–931.
- Saygin H., Ay H., Guven K., Sahin N. *Kribbella turkmenica* sp. nov., isolated from the Karakum Desert // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2019. V. 69. P. 2533–2540.
- Shashkov A.S., Tul'skaya E.M., Streshinskaya G.M., Senchenkova S.N., Avtukh A.N., Evtushenko L.I. New cell wall glycopolymers of the representatives of the genus *Kribbella* // *Carb. Res.* 2009. V. 344. P. 2255–2262.
- Shirling E.B., Gottlieb D. Methods for characterization of *Streptomyces* species // *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1966. V. 16. P. 313.
- Sohn K., Hong S.G., Bae K.S., Chun J. Transfer of *Hongia koreensis* Lee et al. 2000 to the genus *Kribbella* Park et al. 1999 as *Kribbella koreensis* comb. nov. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2003. V. 53. P. 1005–1007.
- Song W., Duan L., Zhao J., Jiang S., Guo X., Xiang W., Wang X. *Kribbella monticola* sp. nov., a novel actinomycete isolated from soil // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2018. V. 68. P. 3441–3446.
- Sorokin D.Y., Khijniak T.V., Zakharycheva A.P., Elcheninov A.G., Hahnke R.L., Boueva O.V., Ariskina E.V., Bunk B., Kublanov I.V., Evtushenko L.I. *Natronoglycomyces albus* gen. nov., sp. nov., a haloalkaliphilic actinobacterium from a soda solonchak soil // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2021. V. 71. Art. 004804.
- Tul'skaya E.M., Streshinskaya G.M., Shashkov A.S., Senchenkova S.N., Avtukh A.N., Baryshnikova L.M., Evtushenko L.I. Novel teichulosonic acid from cell walls of some representatives of the genus *Kribbella* // *Carb. Res.* 2011. V. 346. P. 2045–2051.

Wilson K. Preparation of genomic DNA from bacteria // Current Protocols in Molecular Biology. New York: Wiley, 1997. P. 241–245.

Yoon S.H., Ha S.M., Kwon S., Lim J., Kim Y., Seo H., Chun J. Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database

of 16S rRNA and whole genome assemblies // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2017. V. 67. P. 1613–1617.

Zhao J., Duan L., Qian L., Cao P., Tian Y., Ju H., Xiang W., Wang X. *Kribbella jiaoziuonensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from soil // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2019. V. 69. P. 3500–3507.

Seven New Actinobacterial Species of the Genus *Kribbella* with Unique Cell Wall Glycopolymers, and Emended Description of the Genus *Kribbella*

A. N. Avtukh¹, *, E. V. Ariskina¹, L. M. Baryshnikova¹, E. M. Tul'skaya², N. V. Potekhina², A. S. Shashkov³, N. E. Suzina¹, N. V. Prisyazhnaya¹, I. P. Starodumova¹, O. V. Vasilenko¹, L. V. Dorofeeva¹, and L. I. Evtushenko¹

¹ All-Russian Collection of Microorganisms (VKM), Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Pushchino Scientific Center for Biological Research, Russian Academy of Sciences, Pushchino, 142290 Russia

² Faculty of Biology, Moscow State University, Moscow, 119234 Russia

³ Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: avtukh@rambler.ru

Received May 2, 2023; revised May 20, 2023; accepted May 22, 2023

Abstract—Seven actinomycete strains assigned to seven new species of the genus *Kribbella* were isolated from soils of different regions in Russia. The strains exhibited 98.2–99.3% similarity of the 16S rRNA gene sequences to each other and 96.2–99.7% similarity to the type strains of the known *Kribbella* species. The evolutionary distances calculated on the basis of concatenated gene sequences (*gyrB*–*rpoB*–*recA*–*relA*–*atpD*, 4108 nt) for the studied organisms and type strains of the known species were within the range reported for *Kribbella* species (0.014–0.101). The dDDH and ANI_b values for the strains studied and the type strains of validly described species with available genomes were below the threshold (49.8 and 92.6%, respectively) for prokaryote specie delineation. Members of the putative new species possessed individual phenotypic profiles; some species were found (for the first time in *Kribbella*) to produce sporangium-like structures, up to 4 μm in diameter. The cell walls of the studied strains contained the teichuronic and/or teichulosonic acids specific for the species or species groups and not described previously for other prokaryotes. The unique branched α-mannan occurred in all studied strains of the genus. Based on the data obtained and the previously published data, the following new species are proposed: *Kribbella orskensis* sp. nov. (type strain BKM Ac-2538^T), *Kribbella rubisoli* sp. nov. (type strain VKM Ac-2540^T), *Kribbella antiqua* sp. nov. (type strain VKM Ac-2541^T), *Kribbella kalugense* sp. nov. (type strain VKM Ac-2570^T), *Kribbella steppae* sp. nov. (type strain BKM Ac-2572^T), *Kribbella pratae* sp. nov. (type strain BKM Ac-2574^T), and *Kribbella voronezhensis* sp. nov. (type strain VKM Ac-2575^T) with emended description of the genus *Kribbella*.

Keywords: genus *Kribbella*, novel species, genome, chemotaxonomy, cell wall glycopolymers

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СИГНАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ Rap-Phr ПЛАЗМИДЫ pBS72 ПРИРОДНЫХ БАКТЕРИЙ *BACILLUS SUBTILIS*

© 2023 г. А. С. Гуринович^{а, *}, М. А. Титок^{а, **}

^аКафедра микробиологии, биологический факультет, Белорусский государственный университет,
Минск, 220030 Республика Беларусь

*e-mail: nastia.gurinovich96@gmail.com

**e-mail: m_titok@bsu.by

Поступила в редакцию 08.04.2023 г.

После доработки 26.05.2023 г.

Принята к публикации 28.05.2023 г.

В результате проведенного исследования установлено, что сигнальная система чувства кворума Rap–Phr плазмиды pBS72 обладает функциональными особенностями. Показано филогенетическое родство фосфатазы Rap, кодируемой плазмидой pBS72, с гомологичными полипептидами RapP и RapI, детерминированными плазмидой pBS32 (идентичность составила 68.4%) и конъюгативным транспозоном ICEBs1 (идентичность составила 36.9%). Подобно филогенетически родственным фосфатазам исследуемый белок Rap негативно влиял на процесс споруляции. В отличие от известных сигнальных систем, выявлено влияние белков Rap–Phr на жизнеспособность плазмидсодержащих донорных бактерий при конъюгационном переносе плазмиды pBS72 в изогенной системе скрещивания. При нарушении генов *rap–phr* через 3 и 4 ч скрещивания количество жизнеспособных клеток донора с мутантной плазмидой уменьшалось в 10 раз, а через 24 ч скрещивания – в 100 раз. При этом количество образующихся трансконъюгантов практически не менялось. Полученные результаты являются основой для изучения механизмов, обеспечивающих влияние внехромосомных генетических элементов на содержащих их донорных бактерий, обеспечивающих распространение pBS72-подобных плазмид в природной среде обитания.

Ключевые слова: *Bacillus subtilis*, плазида, Rap-фосфатаза, Phr-феромон, спорообразование, конъюгационный перенос, компетентность

DOI: 10.31857/S0026365623600189, **EDN:** KXAQMP

Повсеместно распространенные бактерии *Bacillus subtilis* широко используются в биотехнологии в качестве продуцентов ферментов, антибиотиков, стимуляторов роста растений и животных (Harwood et al., 2018). Большой практический и теоретический интерес представляют хромосомные и внехромосомные генетические структуры данных микроорганизмов, определяющие их способность адаптироваться к стрессовым факторам внешней среды. В первую очередь, это генетические системы, обеспечивающие процессы клеточной дифференцировки (в частности, образование спор и биопленок) и горизонтального переноса генов посредством трансформации и конъюгации (Neiditch et al., 2017). Ключевая роль в регуляции этих процессов принадлежит феромонам, которые координируют экспрессию генов и поведение клеток при возрастании плотности бактериальной популяции с помощью механизма, известного как чувство кворума. Наиболее распространенной у бактерий *B. subtilis* является сигнальная си-

стема Rap–Phr, представленная Rap-фосфатазой и Phr-феромоном. Гены, кодирующие данные белки, как правило, образуют одну транскрипционную единицу (ген *phr* расположен за геном *rap* и частично с ним перекрывается) и имеют хромосомную и внехромосомную локализацию (Gallegos-Monterrosa et al., 2021). Основную функциональную роль в данной системе выполняют цитоплазматические Rap-фосфатазы, являющиеся негативными регуляторами многих клеточных процессов. В частности, они опосредованно подавляют процессы, определяющие компетентность (попадание чужеродной ДНК путем трансформации), образование биопленок и спор (Mirouze et al., 2013). При достижении высокой плотности бактериальной популяции регуляторная активность Rap-фосфатаз подавляется специфическими феромонами Phr. Первоначально белки Phr синтезируются в клетке в неактивной форме, экспортируются во внеклеточное пространство, расщепляются с образованием зрелых пептидов из пяти–шести аминокислот и

импортируются обратно в клетку (Neiditch et al., 2017). Связываясь с соответствующей Rap-фосфатазой, они подавляют ее функциональную активность (Gallegos-Monterrosa et al., 2021). Отличительной особенностью системы Rap–Phr бактерий рода *Bacillus* является ее избыточность. Данные белки кодируются большим числом генов (в среднем 11 копий генов *rap–phr* на геном *B. subtilis*), многие из которых обладают сходной функциональной активностью (Even-Tov et al., 2016). Например, фосфатазы RapA, B, E, H, J опосредованно инактивируют ключевой транскрипционный фактор Spo0A, влияющий на все процессы клеточной дифференцировки (компетентность, образование биопленок, “каннибализм” и спорообразование). Фосфатазы RapC, D, F, H, K негативно регулируют активность регуляторного белка ComA, необходимого для поглощения чужеродной ДНК путем трансформации. Негативная регуляция белка DegU, определяющего компетентность и образование биопленок, осуществляется фосфатазой RapG (Mirouze, Dubnau, 2013; Bendori et al., 2015; Neiditch et al., 2017). Предполагается, что такая избыточная регуляция ключевых факторов транскрипции Spo0A, ComA и DegU обеспечивает гетерогенность клеток в бактериальной популяции и, как следствие, быструю адаптацию в изменяющихся условиях внешней среды (Gallegos-Monterrosa et al., 2021). В этом плане весьма показательным является клеточный состав биопленок, формирующихся в стационарной фазе роста. Часть клеток активно синтезируют белки и экзополисахариды, образующие матрикс биопленки, другие соединяются в неподвижные цепочки. Некоторые – выделяют летальные токсины, разрушающие клетки, тем самым обеспечивая часть бактериальной популяции питательными веществами и замедляя спорообразование (“каннибализм”). И, наконец, часть клеток трансформируется в спору, защищающую их от перепада температур, высыхания, ионизирующего излучения и других стрессовых факторов (Lopez et al., 2009; Mirouze, Dubnau, 2013).

Не меньший интерес представляют сигнальные системы Rap–Phr мобильных генетических элементов (плазмид, транспозонов, бактериофагов). Подобно Rap-белкам, кодируемым хромосомными генами, они подавляют компетентность и спорообразование (например, Rap60-Phr60 плазмиды pTA1060) (Boguslawski et al., 2015), образование спор и биопленок (например, RapP–PhrP плазмиды pBS32) (Bendori et al., 2015). В то же время Rap-фосфатаза, синтез которой определяется плазмидой pLS20 и транспозоном ICEBs1, обладает противоположным действием. Она опосредованно активирует конъюгационный перенос данных мобильных генетических элементов (Singh et al., 2013; Neiditch et al., 2017). Гомологичные белки, детерминируемые некоторыми уме-

ренными бактериофагами бактерий рода *Bacillus*, активирует литический цикл их развития (Erez et al., 2017).

Ранее в клетках бактерий *B. subtilis* была выявлена плазида pBS72, характеризующаяся уникальной системой конъюгации, в составе которой присутствовали детерминанты, определяющие синтез белков Rap–Phr (*orf130–orf131*). Было установлено, что плазмиды, подобные pBS72, широко распространены в природной среде обитания и выявляются в клетках бактерий *B. subtilis*, выделенных из разных географических регионов. Отличительной особенностью плазмиды pBS72 являлась независимость частоты ее конъюгационного переноса от плотности бактериальной популяции (Gurinovich et al., 2022). Это обосновывает необходимость изучения роли данных внехромосомных генетических элементов в жизнедеятельности содержащих их бактерий, а также механизмов их распространения в природных популяциях. В этом плане определенный интерес представляет сигнальная система Rap–Phr.

В связи с этим, целью настоящей работы являлся молекулярно-генетический и функциональный анализ сигнальной системы Rap–Phr плазмиды pBS72 бактерий *B. subtilis*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Штаммы, плазмиды и условия культивирования бактерий. В работе использовались коллекционные штаммы *B. subtilis* 168, *E. coli* TG1, *E. coli* XL1-Blue, а также плазида pMTL21C, плазида pCB16, определяющая устойчивость к тетрациклину, плазида rKS1, определяющая устойчивость к канамицину и эритромицину и маркированная геном эритромицинрезистентности плазида pBS72 (Gurinovich, Titok, 2020). Бактерии выращивали при 37°C в полноценной среде LB (Molecular Biological Methods..., 1991). Агаризованные среды содержали 1.5% агара, источником углерода служила глюкоза в концентрации 0.2%. В работе использовали коммерческие препараты антибиотиков: ампициллина – 100 мкг/мл, хлорамфеникола – 10 мкг/мл, эритромицина – 10 мкг/мл, стрептомицина – 50 мкг/мл, тетрациклина – 25 мкг/мл и канамицина – 50 мкг/мл. Изопропилтио-β-D-галактозид (IPTG) и 5-бromo-4-хлоро-3-индоил-β-D-галактопиранозид (X-Gal) производства “ThermoScientific” (ЕС) готовили в соответствии с рекомендациями изготовителя и использовали в концентрации 0.5 мМ и 50 мкг/мл соответственно.

Выделение и анализ ДНК. Тотальную ДНК выделяли саркозильным методом (te Riele et al., 1986). Плазмидную ДНК выделяли с использованием набора реактивов Fast-n-EasyPlasmidMini-PrepKit (“JenaBioscience”, Германия). Рестрикционный анализ проводили с использованием ферментов

производства “ThermoScientific” (ЕС), согласно рекомендациям производителя. Электрофоретический анализ ДНК осуществляли общепринятыми методами, приведенными в руководстве (Sambrook et al., 1989). Размер фрагментов ДНК устанавливали на основании их электрофоретической подвижности в агарозном геле, в качестве реперной ДНК использовали GeneRuler™ DNA LadderMix (“ThermoScientific”, ЕС).

Аmplификация и клонирование. Для амплификации использовали Phusion HF ДНК-полимеразу (“ThermoScientific”, ЕС) и праймеры производства ОДО “Праймтех”. Реакционная смесь для ПЦР (50 мкл) содержала около 100 нг ДНК-матрицы, 0,2 ммоль/л каждого дНТФ, 0,5 мкмоль/л каждого праймера, 2,5 ед. ДНК-полимеразы и соответствующий буфер.

Для амплификации фрагмента гена *rap* плазмиды рBS72 размером 498 п.н. использовали праймеры F_{rap} (5'-AGA GAA ATG GTT CAA TGC CAG-3') и R_{rap} (5'-GAA CTC AGC GAC TGA AAT GG-3') при режиме: 98°C – 30 с (1 цикл); 98°C – 10 с, 58°C – 30 с, 72°C – 15 с (25 циклов); 72°C – 3 мин (1 цикл).

Полученный продукт ПЦР очищали с помощью набора AgaroseGelExtractionKit (“JenaBioscience”, Германия). Очищенный продукт лигировали с суицидальным вектором рMTL21C, предварительно обработанным рестриктазой *Sma*I. С использованием ПЦР и рестрикционного анализа установлено, что фрагмент гена *rap* клонирован в состав вектора в ориентации 3' → 5' относительно промотора *lac*-оперона.

Введение плазмид в клетки бактерий. Трансформацию бактерий *E. coli* и *B. subtilis* осуществляли согласно методам, приведенным в работах (Sambrook et al., 1989; Molecular Biological Methods..., 1991).

Отбор плазмиды рBS72 с инактивированными генами *rap-phr*. Гибридной плазмидой рMTL21C с фрагментом гена *rap* трансформировали бактерии *B. subtilis* 168, содержащие плазмиду рBS72. Поскольку вектор рMTL21C не может копироваться в клетках бактерий этой таксономической группы, устойчивость к хлорамфениколу могла возникнуть за счет гомологичной рекомбинации между идентичными последовательностями гена *rap*, локализованными в плазмиде рBS72 и векторе рMTL21C. Интеграцию гибридного вектора рMTL21C, содержащего фрагмент гена *rap*, в состав плазмиды рBS72, устанавливали с помощью полимеразной цепной реакции. С использованием праймеров M13F (5'-GTA AAA CGA CGG CCA GTG-3') и M13R (5'-CAC ACA GGA AAC AGC TAT GAC-3'), отжигающихся на последовательности вектора рMTL21C, и, соответственно, праймеров R_{rap-out} (5'-GCT GCT CTA TCT GCC ATT TTG-3') и F_{rap-out} (5'-GAA CTG TTG GAT GAT ACG GC-3'),

комплементарно связывающихся вне области встраивания гибридной плазмиды (соответственно, 3'-конец гена *phr* и 5'-конец гена *rap*), были получены фрагменты искомого размера 738 и 761 п.н. при режиме амплификации: 94°C – 5 мин (1 цикл); 94°C – 30 с, 52°C – 30 с, 72°C – 45 с (25 циклов); 72°C – 3 мин (1 цикл).

Скрещивание бактерий. В качестве донорных использовали бактерии *B. subtilis* 168, содержащие маркированную геном эритромицинрезистентности плазмиду рBS72 и бактерии *B. subtilis* 168, содержащие плазмиду рBS72 с инактивированными генами *rap-phr*, детерминирующую устойчивость к хлорамфениколу. В качестве реципиентов использовали штамм *B. subtilis* 168 устойчивый к стрептомицину (спонтанный мутант). Культуру донора и реципиента в логарифмической фазе роста смешивали (1 : 1) и скрещивали в жидкой среде LB с аэрацией в течение 1, 2, 3, 4 или 24 ч с последующим высевом на селективные среды. Для установления переноса исходной и мутантной плазмид использовали полноценный агар, содержащий стрептомицин и, соответственно, эритромицин или хлорамфеникол. На основании трех независимых экспериментов проводили статистическую обработку данных с использованием программы Microsoft Excel. Достоверность различий между вариантами определяли с учетом коэффициента Стьюдента (*t*) для принятого уровня значимости ($p \leq 0.05$). Статистически достоверными считались различия между показателями при $p \leq 0.05$.

Эффективность спорообразования определяли согласно методу, описанному в работе (Gastelum et al., 2020). Для оценки эффективности спорообразования ночные культуры разводили до ОП₆₀₀ нм равной 0.1 и инкубировали в течении 48 ч. Эффективность спорообразования определяли в процентах путем соотношения количества термоустойчивых бактерий, подвергавшихся термической обработке при 80°C в течение 20 мин к общему количеству жизнеспособных бактерий. На основании трех независимых экспериментов проводили статистическую обработку данных с использованием программы Microsoft Excel. Достоверность различий между вариантами определяли с учетом коэффициента Стьюдента (*t*) для принятого уровня значимости ($p \leq 0.05$). Статистически достоверными считались различия между показателями при $p \leq 0.05$.

Биоинформатический анализ. Для анализа нуклеотидных последовательностей генов и детерминируемых ими полипептидов плазмиды рBS72 (регистрационный номер в ГенБанке NCBI – KX711616), плазмиды рLS20 (регистрационный номер в ГенБанке NCBI – AB615352), плазмиды рBS32 (регистрационный номер в ГенБанке NCBI – KF365913) и транспозона ICEBs1 (реги-

страционный номер в ГенБанке NCBI – NC_000964 (529505–548557) использовали программу BLASTN.10.0 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

Построение филогенетических деревьев полноразмерных аминокислотных последовательностей белков Rap и Phg осуществляли методом ближайших соседей (1000 бутстрепов) в программе MEGA7.

Аминокислотные последовательности гомологичных белков выравнивали с помощью программы ClustalOmega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/COMMON/TOOLS/HELP/INDEX.HTML?TOOL=CLUSTALO>).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее было установлено, что плазмиды, подобные pBS72 выявляются в клетках бактерий рода *Bacillus*, выделенных на территории Беларуси, Пакистана, Китая, Нидерландов, Индии, США, Австралии и Южной Кореи (Gurinovich, Titok, 2020). На основании молекулярно-генетического и функционального анализа отдельных детерминант *tra*-области система конъюгации плазмиды pBS72 отнесена к новой систематической группе Mpf₅ (Gurinovich, Titok, 2022). В составе плазмиды pBS72 локализованы детерминанты, определяющие синтез белков Rap–Phg (*orf130–orf131*). Учитывая функциональную значимость сигнальной системы Rap–Phg для процессов жизнедеятельности бактерий *B. subtilis*, представлялось важным изучить роль данных белков, кодируемых плазмидой pBS72. Для этого на первом этапе был проведен филогенетический анализ данных полипептидов в сравнении с известными белками бактерий *B. subtilis*, синтез которых детерминирован генами хромосомного (типы А, В, С, D, Е, F, Н, I, J и К) и внехромосомного происхождения (Rap60–Phr60 плазмиды pTA1060, RapP–PhrP плазмиды pBS32, а также Rap–Phg плазмиды pLS20). В результате проведенного анализа было установлено, что сигнальные системы бактерий *B. subtilis* образуют три филогенетические группы, отличающиеся по набору, входящих в них белков (рис. 1). При этом исследуемая Rap-фосфатаза проявляла наибольшее сходство с гомологичными белками RapP (идентичность составила 68.38%) и RapI (идентичность составила 36.91%), кодируемыми, соответственно, неконоготивной плазмидой pBS32 и транспозоном ICEBs1. Данная филогенетическая группа, включающая белки Rap только мобильных генетических элементов, не обнаруживала близкого родства с гомологичными полипептидами, кодируемыми плазмидами pTA1060 и pLS20, проявляющими сходство с гомологичными белками хромосомного происхождения (рис. 1). Следует отметить, что для белков RapP и RapI достаточно полно охарактеризованы функциональные свойства. В частности, показано, что белок RapI опосредованно активировал

конъюгационный перенос транспозона ICEBs1 и ингибировал спорообразование. Подобные эффекты наблюдали и при множественных повреждениях хромосомной ДНК, индуцирующих SOS ответ (например, после обработки клеток митохондрином С), при котором белок RecA проявлял протеазную активность. В обоих случаях происходила активация протеазы ImmA, которая расщепляла репрессор ImmR, подавляющий транскрипцию генов, продукты которых необходимы для конъюгационного переноса транспозона ICEBs1, и гена *devI*, кодирующего репрессор регуляторного белка Spo0A, играющего ключевую роль в клеточной дифференцировке (Neiditch et al., 2017). Для белка RapP достаточно подробно изучено негативное влияние на формирование биопленок, а также установлена роль в подавлении спорообразования (Bendori et al., 2015).

Все известные Rap-белки бактерий *B. subtilis* имеют достаточно консервативную структуру, представленную тремя спиральными участками на N-конце аминокислотной последовательности, образующими поверхность связывания с белками Spo0F и ComA, и тетраатрикопептидными повторами (TPR) на C-конце, определяющими взаимодействие с феромоном Phg. Для белков RapF и RapH на основании функционального анализа выявлены ключевые аминокислоты, входящие в состав данных функционально значимых участков (Baker, Neiditch, 2011; Parashar et al., 2011). Однако сравнительный анализ большого числа белков Rap бактерий рода *Bacillus* позволил установить, что аминокислотные остатки, определяющие их связывание с мишенью ComA, не являются консервативными, несмотря на их способность взаимодействовать с данным регуляторным белком. Напротив, аминокислотные остатки, определяющие взаимодействие с регуляторным белком Spo0F, высоко консервативны и присутствуют в охарактеризованных белках Rap, независимо от того, обеспечивают ли они дефосфорилирование Spo0F или нет (Even-Tov et al., 2016).

Несмотря на высокую специфичность взаимодействия фосфатаз Rap с белками Phg, достаточно консервативными являются домены, определяющие их связывание. Для белка RapP выявлена замена аминокислоты в одном из таких доменов (в положении 235 аспарагин заменен на треонин). В результате белок RapP утратил способность взаимодействовать с феромоном Phg и, как следствие, полностью ингибировал образование биопленок (Bendori et al., 2015).

Сравнительный анализ аминокислотной последовательности Rap белка, кодируемого плазмидой pBS72, с близкородственными (RapP и RapI) и хорошо изученными в этом отношении (RapH и RapF) выявил те же закономерности, которые были установлены при анализе большого числа

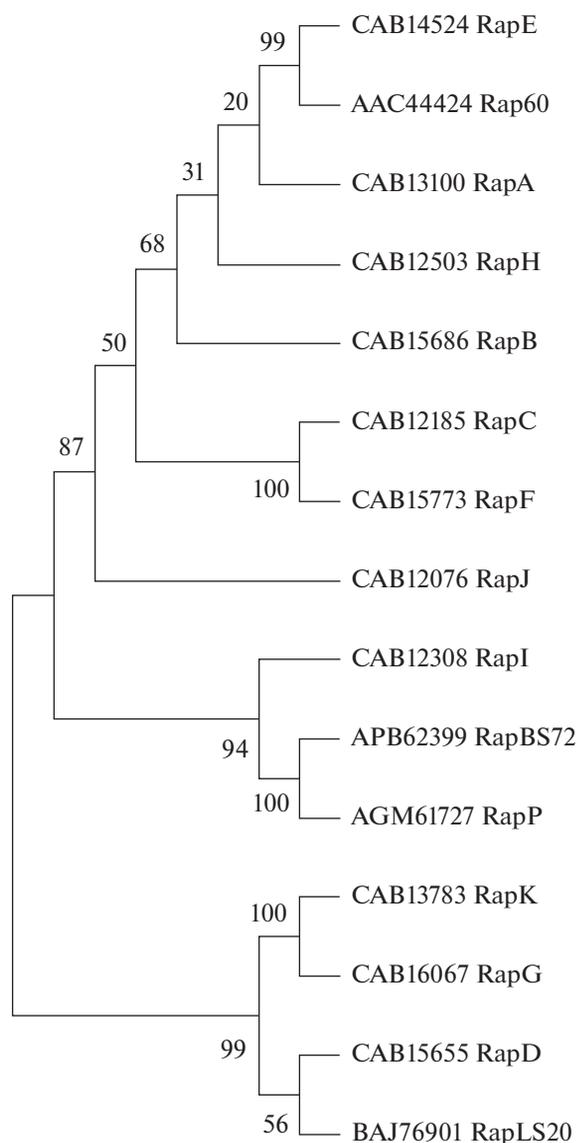


Рис. 1. Филогенетическое дерево белков Rap бактерий *B. subtilis*.

фосфатаз бактерий *B. subtilis*. Данные белки содержали ряд значимых несинонимических замен в функциональных доменах, влияющих на компетентность. В то же время аминокислотные последовательности, играющие ключевую роль в процессах спорообразования, характеризовались большим сходством и отличались отдельными функционально незначимыми заменами (Even-Tov et al., 2016). Кроме того, белок Rap, кодируемый плазмидой rBS72, не отличался от других белков по ключевым аминокислотам, входящим в участки связывания с феромоном Phr (за исключением RapP) (рис. 2).

Анализ феромона, кодируемого исследуемой плазмидой, позволил установить, что он входил в одну филогенетическую группу с белками PhrP

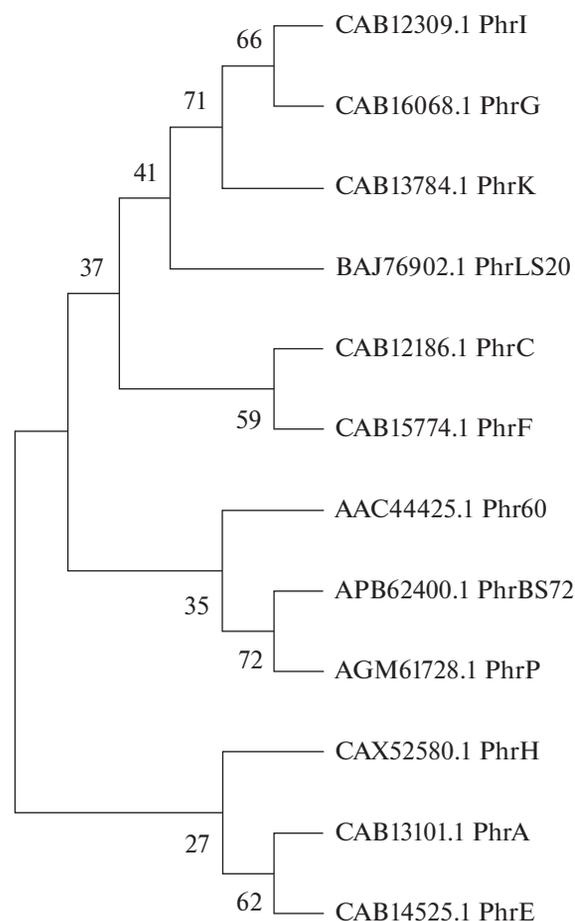


Рис. 2. Филогенетическое дерево белков Phr бактерий *B. subtilis*.

(плазмида rBS32) и Phr60 (плазмида rTA1060) и содержал, соответственно, 44 и 43% идентичных аминокислот, тогда как с белком PhrI имел лишь отдаленное филогенетическое родство (рис. 3). Следует отметить, что основная роль феромонов заключается в подавлении активности соответствующих Rap-фосфатаз за счет специфического взаимодействия (специфичность является ключевым фактором, определяющим тонкую регуляцию экспрессии генов), а функциональные свойства сигнальной системы Rap-Phr определяются Rap-белками.

Поскольку биоинформатический анализ не позволяет в полной мере судить о функциональной значимости белков, было изучено влияние мутации в генах *rap-phr* плазмиды rBS72 на эффективность спорообразования, конъюгационный перенос и компетентность, т.е. способность воспринимать чужеродную ДНК.

В результате установлено, что при наличии исходной плазмиды rBS72 в клетках бактерий *B. subtilis* эффективность спорообразования снижалась в 4 раза. Присутствие в клетках мутантного плазмиды

Таблица 1. Частота трансформации плазмид в бактерии *B. subtilis* 168

Трансформируемый штамм	Частота трансформации плазмиды	
	pBC16	pKS1
<i>B. subtilis</i> 168 без плазмиды	2.4×10^3	2.1×10^2
<i>B. subtilis</i> 168, содержащие исходную pBS72	—	—
<i>B. subtilis</i> 168, содержащие мутантную pBS72	—	—

Примечание. “—” — отсутствие трансформантов. Частоту трансформации определяли в пересчете на 1 мкг плазмидной ДНК.

Таблица 2. Частота переноса исходной и мутантной плазмиды pBS72 между бактериями *B. subtilis* 168

Время, ч	Исходная плаزمида pBS72			Мутантная плазмида pBS72		
	количество жизнеспособных клеток, КОЕ/мл			количество жизнеспособных клеток, КОЕ/мл		
	донор	реципиент	трансконъюганты**	донор	реципиент	трансконъюганты**
1	$(3.1 \pm 0.01) \times 10^6$	$(3.5 \pm 2.1) \times 10^8$	$(9.7 \pm 1.1) \times 10^4$	$(6.1 \pm 5.34) \times 10^5$	$(3.8 \pm 1.0) \times 10^8$	$(4.1 \pm 1.7) \times 10^4$
2	$(7.8 \pm 0.8) \times 10^6$	$(4.8 \pm 3.3) \times 10^8$	$(9.3 \pm 3.5) \times 10^4$	$(5.4 \pm 4.7) \times 10^6$	$(4.9 \pm 0.5) \times 10^8$	$(3.8 \pm 0.9) \times 10^4$
3	$(1.5 \pm 0.6) \times 10^{7*}$	$(3.3 \pm 2.1) \times 10^8$	$(9.9 \pm 0.6) \times 10^4$	$(1.2 \pm 0.27) \times 10^{6*}$	$(5.8 \pm 3.6) \times 10^8$	$(2.5 \pm 0.4) \times 10^4$
4	$(6.8 \pm 0.3) \times 10^{6*}$	$(6.2 \pm 3.9) \times 10^8$	$(5.5 \pm 7.5) \times 10^4$	$(4.1 \pm 3.3) \times 10^{5*}$	$(2.1 \pm 1.8) \times 10^9$	$(2.5 \pm 3.1) \times 10^4$
24	$(2.0 \pm 1.4) \times 10^{6*}$	$(4.3 \pm 4.4) \times 10^8$	$(1.0 \pm 1.3) \times 10^4$	$(1.6 \pm 1.4) \times 10^{4*}$	$(6.6 \pm 5.9) \times 10^8$	$(3.1 \pm 2.3) \times 10^4$

* Различия между жизнеспособностью клеток доноров, содержащих исходную и мутантную плазмиду, через 3, 4 и 24 ч статистически достоверны ($p \leq 0.05$).

** Различия между количеством клеток трансконъюгантов, образующихся при переносе исходной и мутантной плазмиды, статистически не достоверны. Представленные результаты получены на основании трех независимых экспериментов.

в табл. 2, с течением времени количество клеток донора с исходной плазмидой не изменялось. В то же время через 3 и 4 ч скрещивания количество жизнеспособных клеток донора с мутантной плазмидой уменьшалось в 10 раз, а через 24 ч скрещивания — в 100 раз (различия статистически достоверны, $p < 0.05$). При этом количество образующихся трансконъюгантов практически не изменялось (различия статистически не достоверны). Следует отметить, что культивирование донорных бактерий, содержащих исходную или мутантную плазмиду, в аналогичных условиях в отсутствие штамма реципиента не влияло на их жизнеспособность и стабильность наследования внехромосомных генетических элементов (количество жизнеспособных клеток не изменялось, и плазмиды наследовались с частотой 100%). Следовательно, при скрещивании бактерий *B. subtilis* 168 наличие в клетках донора плазмиды pBS72 с нарушенной системой Rap—Phg приводило к их гибели, которая достоверно увеличивалась через 24 ч. Следует отметить, что только для двух конъюгативных мобильных генетических элементов *B. subtilis* (конъюгативный транспозон ICEBs1 и конъюгативная плазмиды pLS20) охарактеризованы сигнальные системы чувства кворума Rap—Phg, которые отличались между собой функциональной активностью. Rap-белок, кодируемый плазмидой pLS20, активировал ее конъюгационный перенос в логарифмической фазе роста за счет непосред-

ственного связывания белка репрессора Rco и не влиял на образование спор (Singh et al., 2013). В то же время фосфатаза RapI, кодируемая транспозоном ICEBs1, выполняла двойную функцию. Она опосредованно активировала перенос ICEBs1 (активировала протеазу ImmA, расщепляющую репрессор конъюгационного переноса ImmR) во время стационарной фазы роста и одновременно ингибировала характерную для этой стадии инициацию процесса спорообразования (Neiditch et al., 2017). При этом влияния сигнальной системы Rap—Phg данных конъюгативных мобильных элементов на жизнеспособность содержащих их бактерий не отмечено.

Тем не менее, известно, что сигнальные системы Rap—Phg, кодируемые хромосомными генами, влияют на функциональную активность транскрипционного фактора Spo0A (изменяют количество фосфорилированного Spo0A~P в клетке), который при определенных концентрациях активирует процессы образования компетентных клеток, биопленок, синтез токсинов (“каннибализм”) и спорообразование. При этом “каннибализм”, сопровождающийся гибелью клеток в бактериальной популяции, рассматривается как механизм, предотвращающий или задерживающий спорообразование (Gonzalez-Pastor et al., 2003). Выявленный эффект гибели донорных клеток, содержащих плазмиду pBS72 с нару-

шенными генами *rap-phr*, возможно также связан с процессом, подавляющим образование спор. Поскольку в присутствии исходной плазмиды спорообразование подавляется и лишь частично восстанавливается при нарушении генов *rap-phr*, логично предположить, что отсутствие спор является необходимым условием для конъюгационного переноса плазмиды pBS72, и, следовательно, в ее геноме присутствуют генетические детерминанты, определяющие синтез белков, предотвращающих их образование. Следует отметить, что гибель клеток наблюдали для бактерий, содержащих неконъюгативную плазмиду pBS32 (содержит филогенетически близкую плазмиде pBS72 систему RapP-PhrP), после обработки интракалирующими красителями, повреждающими данный внехромосомный генетический элемент. Гибель клеток происходила за счет усиления экспрессии плазмидных генов, кодирующих токсины (Parashar et al., 2013). При конъюгационном переносе плазмиды pBS72 в область *oriT* вносится односторонний разрыв, с последующим переносом вытесняемого 5'-конца молекулы в реципиентную клетку. Этот процесс, безусловно, влияет на структуру плазмидной ДНК и, возможно, активирует систему, приводящую к гибели содержащих ее бактерий в отсутствие функционально активной сигнальной системы Rap-Phr (через 24 ч скрещивания число жизнеспособных клеток донора снижалось в 100 раз). При этом количество клеток трансконъюгантов, образующихся в скрещиваниях с использованием в качестве донора бактерий, содержащих исходный и мутантный варианты плазмиды pBS72, не изменялось (табл. 2). Следовательно, конъюгационная система плазмиды pBS72, в отличие от известных (транспозон ICEBs1 и плазида pLS20), не подвержена позитивной регуляции Rap-фосфатазой. Тем не менее, сигнальная система Rap-Phr играет важную роль в горизонтальном переносе плазмиды pBS72 за счет подавления спорообразования и поддержания жизнеспособности бактерий доноров при ее конъюгационном переносе. Последнее свойство является уникальным, и для его объяснения необходимы дополнительные исследования.

Таким образом, в результате проведенного исследования установлено, что, подобно филогенетически родственным белкам RapP (идентичность составила 68.4%) и RapI (идентичность составила 36.9%), кодируемым, соответственно, плазмидой pBS32 и конъюгативным транспозоном ICEBs1, исследуемая Rap-фосфатаза негативно влияла на процесс споруляции. В отличие от известных сигнальных систем, выявлено влияние продуктов генов *rap-phr* на жизнеспособность плазмидсодержащих донорных бактерий при конъюгационном переносе плазмиды pBS72 в изогенной системе скрещивания. При нарушении генов *rap-phr* через 3 и 4 ч скрещивания количество жизнеспособных

клеток донора с мутантной плазмидой уменьшалось в 10 раз, а через 24 ч скрещивания – в 100 раз. При этом количество образующихся трансконъюгантов практически не менялось. Полученные результаты являются основой для изучения механизмов, обеспечивающих влияние внехромосомных генетических элементов на содержащих их донорных бактерий, обеспечивающих распространение pBS72-подобных плазмид в природной среде обитания.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнялась при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант № Б21-142) и Государственной программы научных исследований (НИР № 3.6.2).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Гуринович А.С., Титок М.А. Молекулярно-генетический и функциональный анализ плазмиды pBS72 природных бактерий *Bacillus subtilis* // Микробиология. 2020. Т. 89. С. 646–657. <https://doi.org/10.31857/S0026365620060063>
- Gurinovich A.S., Titok M.A. Molecular genetic and functional analysis of the pBS72 plasmid from *Bacillus subtilis* environmental isolates // Microbiology (Moscow). 2020. V. 89. P. 660–669. <https://doi.org/10.1134/S0026261720060065>
- Гуринович А.С., Титок М.А. Молекулярно-генетический и функциональный анализ системы конъюгации плазмиды pBS72 природных бактерий *Bacillus subtilis* // Microbiology (Moscow). 2022. V. 91. P. 451–465. <https://doi.org/10.31857/S0026365622300188>
- Gurinovich A.S., Titok M.A. Molecular genetic and functional analysis of the conjugation system of the pBS72 plasmid from *Bacillus subtilis* environmental isolates // Microbiology (Moscow). 2022. V. 91. № 4. P. 395–408. <https://doi.org/10.1134/S002626172230018X>
- Baker M.D., Neiditch M.B. Structural basis of response regulator inhibition by a bacterial anti-activator protein // PLoS Biol. 2011. V. 9. Art. e1001226. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001226>
- Beauregard P.B., Chai Y., Vlamakis H., Losick R., Kolter R. *Bacillus subtilis* biofilm induction by plant polysaccharides // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2013. V. 110. P. 1621–1630. <https://doi.org/10.1073/pnas.1218984110>

- Belas R.* When the swimming gets tough, the tough form a biofilm // *Mol. Microbiol.* 2013. V. 90. P. 1–5.
<https://doi.org/10.1111/mmi.12354>
- Bendori S.O., Pollak S., Hizi D., Eldar A.* The RapP–PhrP quorum-sensing system of *Bacillus subtilis* strain NCIB3610 affects biofilm formation through multiple targets, due to an atypical signal-insensitive allele of RapP // *J. Bacteriol.* 2015. V. 197. P. 592–602.
<https://doi.org/10.1128/JB.02382-14>
- Boguslawski K.M., Hill P.A., Griffith K.L.* Novel mechanisms of controlling the activities of the transcription factors Spo0A and ComA by the plasmid-encoded quorum sensing regulators Rap60–Phr60 in *Bacillus subtilis* // *Mol. Microbiol.* 2015. V. 96. P. 325–348.
<https://doi.org/10.1111/mmi.12939>
- Branda S.S., Chu F., Kearns D.B., Losick R., Kolter R.* A major protein component of the *Bacillus subtilis* biofilm matrix // *Mol. Microbiol.* 2006. V. 59. P. 1229–1238.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.05020x>
- Bullock W.O., Fernandez J.M., Short J.M.* XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection // *BioTechniques.* 1987. V. 5. P. 376–378.
- Burton A.T., Kearns D.B.* The large pBS32/pLS32 plasmid of ancestral *Bacillus subtilis* // *J. Bacteriol.* 2020. V. 202. Art. e00290–20.
<https://doi.org/10.1128/JB.00290-20>
- Comella N., Grossman A.D.* Conservation of genes and processes controlled by the quorum response in bacteria: characterization of genes controlled by the quorum-sensing transcription factor ComA in *Bacillus subtilis* // *Mol. Microbiol.* 2005. V. 57. P. 1159–1174.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04749x>
- Erez Z., Steinberger-Levy I., Shamir M., Doron S., Stokar-Avihail A., Peleg Y., Melamed S., Leavitt A., Savidor A., Albeck S., Amitai G., Sorek R.* Communication between viruses guides lysis-lysogeny decisions // *Nature.* 2017. V. 541. P. 488–493.
<https://doi.org/10.1038/nature21049>
- Even-Tov E., Bendori S.O., Pollak S., Eldar A.* Transient duplication dependent divergence and horizontal transfer underlie the evolutionary dynamics of bacterial cell–cell signaling // *PLoS Biol.* 2016. V. 14. Art. e2000330.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2000330>
- Gallegos-Monterrosa R., Christensen M.N., Barchewitz T., Koppenhofer S., Priyadarshini B., Balint B., Maroti G., Kempen P.J., Dragos A., Kovacs A.T.* Impact of Rap–Phr system abundance on adaptation of *Bacillus subtilis* // *Commun. Biol.* 2021. V. 4. P. 468.
<https://doi.org/10.1038/s42003-021-01983-9>
- Gastelum G., de la Torre M., Rocha J.* Rap protein paralogs of *Bacillus thuringiensis*: a multifunctional and redundant regulatory repertoire for the control of collective functions // *J. Bacteriol.* 2020. V. 202. Art. e00747–19.
<https://doi.org/10.1128/JB.00747-19>
- Gonzalez-Pastor J.E., Hobbs E.C., Losick R.* Cannibalism by sporulating bacteria // *Science (New York, N.Y.)*. 2003. V. 301. P. 510–513.
<https://doi.org/10.1126/science.1086462>
- Harwood C.R., Mouillon J.M., Pohl S., Arnau J.* Secondary metabolite production and the safety of industrially important members of the *Bacillus subtilis* group // *FEMS Microbiol. Rev.* 2018. V. 42. P. 721–738.
<https://doi.org/10.1093/femsre/fuy028>
- Lopez D., Vlamakis H., Losick R., Kolter R.* Cannibalism enhances biofilm development in *Bacillus subtilis* // *Mol. Microbiol.* 2009. V. 74. P. 609–618.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06882.x>
- Mirouze N., Dubnau D.* Chance and necessity in *Bacillus subtilis* development // *Microbiol. Spectrum.* 2013. V. 1. Art. TBS-0004-2012.
<https://doi.org/10.1128/microbiolspectrum.TBS-0004-2012>
- Molecular Biological Methods for Bacillus* / Eds. Harwood C.R., Cutting S.M. N.Y.: Chichester, 1991. P. 75–174.
- Neiditch M.B., Capodagli G.C., Prehna G., Federle M.J.* Genetic and structural analyses of RRNPP intercellular peptide signaling of gram-positive bacteria // *Annu. Rev. Genet.* 2017. V. 51. P. 311–333.
<https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120116-023507>
- Parashar V., Konkol M.A., Kearns D.B., Neiditch M.B.* A plasmid-encoded phosphatase regulates *Bacillus subtilis* biofilm architecture, sporulation, and genetic competence // *J. Bacteriol.* 2013. V. 195. P. 2437–2448.
<https://doi.org/10.1128/JB.02030-12>
- Parashar V., Mirouze N., Dubnau D.A., Neiditch M.B.* Structural basis of response regulator dephosphorylation by Rap phosphatases // *PLoS Biol.* 2011. V. 9. Art. e1000589.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000589>
- Rosch T.C., Golman W., Hucklesby L., Gonzalez-Pastor J.E., Graumann P.L.* The presence of conjugative plasmid pLS20 affects global transcription of its *Bacillus subtilis* host and confers beneficial stress resistance to cells // *Appl. Environ. Microbiol.* 2014. V. 80. P. 1349–1358.
<https://doi.org/10.1128/AEM.03154-13>
- Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T.* *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. / Eds. Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. N.Y., Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 468 p.
- Serra C.R., Earl A.M., Barbosa T.M., Kolter R., Henriques A.O.* Sporulation during growth in a gut isolate of *Bacillus subtilis* // *J. Bacteriol.* 2014. V. 196. P. 4184–4196.
<https://doi.org/10.1128/JB.01993-14>
- Singh P.K., Ramachandran G., Duran-Alcalde L., Alonso C., Wu L.J., Meijer W.J.* Inhibition of *Bacillus subtilis* natural competence by a native, conjugative plasmid-encoded *comK* repressor protein // *Environ. Microbiol.* 2012. V. 14. P. 2812–2825.
<https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2012.02819x>
- Singh P.K., Ramachandran G., Ramos-Ruiz R., Peiro-Pastor R., Abia D., Wu L.J., Meijer W.J.* Mobility of the native *Bacillus subtilis* conjugative plasmid pLS20 is regulated by intercellular signaling // *PLoS Genet.* 2013. V. 9. Art. e1003892.
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003892>
- te Riele H., Michel B., Ehrlich S.D.* Single-stranded plasmid DNA in *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1986. V. 83. P. 2541–2545.
<https://doi.org/10.1073/pnas.83.8.2541>
- Verhamme D.T., Kiley T.B., Stanley-Wall N.R.* DegU coordinates multicellular behaviour exhibited by *Bacillus subtilis* // *Mol. Microbiol.* 2007. V. 65. P. 554–568.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05810x>

Molecular Genetic and Functional Analysis of the Rap-Phr Signal System of the Plasmid pBS72 of *Bacillus subtilis* Isolates

A. S. Gurinovich¹, * and M. A. Titok¹, **

¹Department of Microbiology, Belarusian State University, Minsk, 220030 Belarus

*e-mail: nastia.gurinovich96@gmail.com

**e-mail: m_titok@bsu.by

Received April 8, 2023; revised May 26, 2023; accepted May 28, 2023

Abstract—The functional characteristics of the Rap-Phr quorum sensing signal system of the plasmid pBS72 were investigated. Phylogenetic relationship was revealed between Rap phosphatase coded by the plasmid pBS72 and the homologous polypeptides RapP and RapI determined by the plasmid pBS32 (68.4% identity) and the ICEBs1 conjugative transposon (36.9% identity). Similar to the phylogenetically related phosphatases, the studied Rap protein had a negative effect on sporulation. Unlike the known signal systems, Rap-Phr proteins were found to affect the viability of plasmid-bearing donor bacteria in the course of conjugative transfer of the plasmid pBS72 in the isogenic system. Impaired *rap-phr* genes resulted in a 10-fold decrease in the number of viable donor cells with the mutant plasmid after 3 and 4 h, and in a 100-fold decrease after 24 h. The number of formed transconjugants remained almost the same. Our results provide the basis for investigation of the mechanisms responsible for the effect of extrachromosomal genetic elements on the donor bacteria, providing for the propagation of the pBS72-like plasmids in natural environments.

Keywords: *B. subtilis*, plasmid, Rap phosphatase, Phr pheromone, sporulation, conjugative transfer, competence

ОБРАЗОВАНИЕ МЕТАНА В ПРЕСНОМ ОЗЕРЕ УМЕРЕННОГО ПОЯСА
В ПЕРИОД ИНТЕНСИВНОГО ЦВЕТЕНИЯ ЦИАНОБАКТЕРИЙ¹© 2023 г. А. Ю. Каллистова^а, * А. И. Косякова^а, И. И. Русанов^а, В. В. Кадников^а,
А. В. Белецкий^а, Д. Д. Коваль^а, С. К. Юсупов^а, И. Зеккер^б, Н. В. Пименов^а^аФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, 119071 Россия^бУниверситет Тарту, Тарту, 50411 Эстония

*e-mail: kallistoanna@mail.ru

Поступила в редакцию 15.05.2023 г.

После доработки 18.05.2023 г.

Принята к публикации 22.05.2023 г.

Сезонное цветение цианобактерий оказывает негативное влияние на пресноводные экосистемы. Участие цианобактерий в образовании метана и их взаимоотношения с метаногенными археями к настоящему времени изучены недостаточно. Целью работы было выявление особенностей процесса метаногенеза в водной толще и осадках центральной части пресного оз. Сенеж (Московская область) в период активного цветения цианобактерий. В работе использовали аналитические, радиоизотопные, микроскопические, молекулярно-биологические и инкубационные методы. Выявлено защелачивание и перенасыщение кислородом водного слоя 0–2 м за счет интенсивного фотосинтеза. В придонной воде (4 м) условия были рН-нейтральные и гипоксидные; осадки были восстановленные. Метан детектировался по всему профилю водной толщи: его концентрация в поверхностном водном слое была на порядок ниже, чем в придонной воде и на 4 порядка ниже, чем в осадках. В фотической зоне доминировали цианобактерии вида *Microcystis aeruginosa* (до 30% от общего количества фрагментов гена 16S рРНК). Также детектированы последовательности цианобактерий и пресноводных представителей клады SAR11, которые потенциально могут участвовать в аэробном метаногенезе при разложении метилфосфонатов (MPn). В перенасыщенных кислородом водах выявлены последовательности гидрогенотрофных метаногенов рода *Methanoregula*, которые потенциально могут осуществлять метаногенез в кооперации с цианобактериями. В восстановленных осадках преобладали гидрогенотрофный и ацетокластический пути метаногенеза. Детектированы последовательности метаногенов порядков *Methanomicrobiales*, *Methanobacteriales*, *Methanosarciniales* и *Methanomassiliicoccales*. Цветение цианобактерий способствовало процессу метаногенеза как в фотической зоне оз. Сенеж за счет разложения MPn и ассоциированного с цианобактериальными агрегатами анаэробного метаногенеза, так и в придонной воде и осадках за счет создания дефицита кислорода и избытка субстратов при осаждении и разложении цианобактериальной биомассы.

Ключевые слова: пресные озера, цветение цианобактерий, *Microcystis*, метаногенез, разложение метилфосфоната, *Methanoregula*

DOI: 10.31857/S0026365623600256, EDN: KAVSYX

Сезонное цветение фитопланктона оказывает негативное воздействие на пресноводные экосистемы, т.к. приводит к образованию избыточного количества органического вещества (ОВ) и токсинов, снижению освещенности и дефициту кислорода в водной толще, расположенной ниже фотической зоны. Источником токсинов являются цианобактерии, которые имеют более высокие температурные оптимумы роста и более толерантны к повышенным температурам, чем другие представители фитопланктона (Wetzel, 2001), по-

этому повышение температуры водоемов, происходящее в результате изменения климата, вызывает большое беспокойство (Huisman et al., 2018; Smucker et al., 2021). Интенсивное цветение цианобактерий может происходить и при пониженных температурах (<15°C), в том числе, в подледный сезон (Reinl et al., 2023).

Известно, что в водных экосистемах цианобактерии опосредовано и напрямую участвуют в круговороте парникового газа метана. В первую очередь, это связано с включением их биомассы в микробную пищевую цепь. Осаждение и интенсивное разложение избыточного ОВ биомассы цианобактерий приводит к быстрому истощению

¹ Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0026365623600256 для авторизованных пользователей.

растворенного кислорода и созданию гипоксидных и анаэробных условий ниже фотической зоны (Diaz, Rosenberg, 2008). В анаэробных условиях ОВ продолжает разлагаться до субстратов – непосредственных предшественников метаногенеза (Xu et al., 2020). Таким образом, цветение цианобактерий создает в воде и верхнем слое осадков благоприятные условия для метаногенеза – анаэробии и доступность субстратов. Цианобактерии могут также напрямую снабжать метаногенов субстратами, например, водородом (Berg et al., 2014; Bizik, 2020; Самылина и соавт., 2023) и C1-метилированными соединениями (Zhu et al., 2022). Этот процесс может происходить, в том числе, в бескислородных микронишах внутри плавающих цианобактериальных (*Microcystis* sp.) агрегатов, где выявлено одновременное присутствие и активность метаногенных и метанотрофных сообществ (Li et al., 2021).

Помимо стимуляции классического анаэробного метаногенеза, цианобактерии способны самостоятельно осуществлять аэробный метаногенез путем деметилирования метилфосфонатов (MPn) (Bizik, 2020). Гены, отвечающие за разложение фосфонатов (*phn*), широко распространены у filamentных цианобактерий, в том числе, и у представителей, вызывающих цветение водоемов. MPn является альтернативным источником фосфора для цианобактерий, имеющих *phn* гены. Выделение метана в присутствии MPn в основном происходит в световой период и подавляется ортофосфатом (Zhao et al., 2022). В последние годы появляется все больше данных о том, что цианобактерии могут образовывать метан и по другим, неизвестным механизмам, непосредственно связанным с их основным фототрофным метаболизмом (Bizik, 2020).

Таким образом, интенсивное цветение цианобактерий должно приводить к усилению как анаэробного, так и аэробного метаногенеза. Существуют, однако, данные о том, что токсины цианобактерий оказывают ингибирующее влияние на микробные сообщества. Например, среди цианобактерий рода *Microcystis* (*M. aeruginosa*) – наиболее распространенных в мире агентов цветения пресных водоемов (Wilhelm et al., 2020) – встречаются как токсичные, так и нетоксичные штаммы, и их соотношение в водоеме динамично меняется. Токсичные штаммы образуют микроцистины, которые подавляют метаногенез: в присутствии токсичных штаммов *M. aeruginosa* относительное обилие метаногенов и образование метана на единицу общего углерода заметно ниже, чем в присутствии нетоксичных штаммов (Xu et al., 2020). При этом известно, что цианобактерии рода *Microcystis* образуют меньше токсинов на клетку, когда растут при более высоких температурах (около 25°C). При более низких температурах (около 18°C) скорости роста ниже, образуется

меньше биомассы, но клетки, тем не менее, образуют больше токсинов (Wilhelm et al., 2020). Образование токсинов у многих цианобактерий также снижается при дефиците фосфора (Zhao et al., 2022).

Целью настоящей работы было исследование особенностей процесса метаногенеза в водной толще и осадках пресного озера умеренного пояса в период интенсивного цветения цианобактерий рода *Microcystis*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования и пробоотбор. Объектами исследования являлись образцы воды и осадков по профилю экспериментальной точки (глубина 4 м), расположенной в центральной части пресного оз. Сенеж (56°12'34.6" N, 36°59'53.0" E). Характеристика оз. Сенеж (Солнечногорский район, Московская обл.) приведена в предыдущей публикации (Kallistova et al., 2023). Отбор проб и полевые измерения проводили в августе 2022 г. Воду отбирали с помощью 1 л стеклянного батометра Руттнера, осадки – лимнологическим стратометром. Для большинства лабораторных исследований (химический и молекулярный анализ, определение потенциальных активностей) использовали интегральные пробы воды с глубин 0, 2, 4 м и осадков с глубин 0–10, 10–20 и 20–30 см, т.е. 3 образца (биологические повторности) отбирали с конкретной глубины на площади 1 м² и сливали в одну склянку. Образцы хранили без доступа воздуха при 15°C в течение 24 ч до начала всех анализов.

Аналитические методы. Температуру воды, концентрацию растворенного кислорода и процент насыщения воды кислородом определяли *in situ* на глубинах 0, 1, 2, 3, 4 м с помощью портативного оксиметра Oxi 340i (“WTW”, Германия), оснащенного кислородным датчиком CellOx 325 (“WTW”, Германия). Освещенность воды определяли на тех же глубинах с использованием люксметра ТКА-ПКМ (Россия). Для определения концентрации метана по профилю воды (0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4 м) и осадков (0–2, 2–5, 5–10, 10–15, 15–20, 20–25, 25–30 см) использовали метод фазово-равновесной дегазации (McAuliffe, 1971). Содержание метана в газовой фазе определяли на газовом хроматографе Кристалл 2000 (“Хромат-эк”, Россия) с пламенно-ионизационным детектором и 3-х м колонкой с сорбентом Hayesep N (температура инжектора – 100°C, температура колонки – 60°C, расход газа-носителя азота – 30 мл/мин). Измерение pH проводили с помощью pH-метра SevenCompact pH/Ion S220 (“Mettler-Toledo AG”, Швейцария). Eh осадков определяли с помощью портативного ионометра WTW 3310 (Германия). Общую щелочность определяли набором стандартных реактивов (“Aquamerck”, Герма-

ния). Концентрацию PO_4^{3-} определяли фотометрическим методом с восстановлением аскорбиновой кислотой с использованием спектрофотометра UNICO 1200/1201 (“United Products & Instruments, Inc.”, США). Содержание хлорофилла *a* (хл *a*) в интегральных пробах воды (0, 2 и 4 м) определяли с помощью спектрофотометра Nano-Photometer NP80 (“Implen”, Германия). Для этого образцы воды фильтровали через фильтры GF/F, хл *a* экстрагировали 90% раствором ацетона в течение 24 ч при 5°C; расчет (в мкг/л) производили по формулам (Намсараев, 2009).

Микроскопия. Состав природных фототрофных сообществ изучали в нативных препаратах (“раздавленная капля”) под световым микроскопом Jenaval с фотоустановкой Zeiss Bundle Canon PS G9 (“Carl Zeiss”, Jena, Германия).

Молекулярные методы. Таксономический состав микробных сообществ определяли в интегральных образцах воды (0, 2, 4 м) и осадков (0–10, 10–20 и 20–30 см). Клетки микроорганизмов из образцов воды предварительно концентрировали на фильтрах с диаметром пор 0.22 мкм, фильтр гомогенизировали, растирая с жидким азотом. Препарат метагеномной ДНК выделяли с помощью Power Soil DNA Isolation Kit (“MO BIO Laboratories Inc.”, США). Состав сообщества прокариот определяли на основании анализа последовательностей варибельного региона V3–V4 гена 16S рРНК, амплифицированного с помощью ПЦР с использованием праймеров PRK341F (5'-CCTACGGGGRBGCASCAG-3') и PRK806R (5'-GGACTACYVGGGTATCTAAT-3') (Frey et al., 2016). ПЦР фрагменты были баркодированы с помощью Nextera XT Index Kit v.2 (“Illumina”, США) и очищены с использованием Agencourt AMPure beads (“Beckman Coulter”, США). Концентрация полученных ПЦР продуктов была определена с помощью Qubit dsDNA HS Assay Kit (“Invitrogen”, США). Затем ПЦР фрагменты были смешаны в эквимольных количествах и секвенированы на Illumina MiSeq (2 × 300 нт с обоих концов). Парные чтения были объединены с использованием FLASH v.1.2.11 (Magoc, Salzberg, 2011). Полученные последовательности были кластеризованы в операционные таксономические единицы (ОТЕ) при 97% идентичности с помощью программы Usearch (Edgar, 2010); низкокачественные чтения, химерные и единичные последовательности были удалены при кластеризации.

Таксономическая идентификация ОТЕ была выполнена по базе SILVA v.138 с использованием алгоритма VSEARCH (Rognes et al., 2016). Для образцов воды с глубин 0, 2 и 4 м было получено 9927, 39270 и 51430 последовательностей соответственно. Для образцов осадков с глубин 0–10, 10–20 и 20–30 см было получено 4306, 43766, 58516 последовательностей соответственно. По-

лученные последовательности были депонированы в базе данных NCBI Sequence Read Archive (SRA) в рамках проекта PRJNA972532.

Проведен поиск генов синтеза (*pepM*, *ppd*), транспорта и разложения (*phnC-P*) МРп в геноме *Ca. “Fonsibacter ubiquis”* (номер в Генбанке CP024034.1). Гены *pepM*, *ppd*, *phnC-P* идентифицировали с помощью поиска gpsblast v.2.9.0 с пороговым значением *e-value* – $1e-10$ по базе данных консервативных доменов (Conserved Domain Database, CDD).

Радиоизотопные методы. Для измерения интенсивности процесса фотосинтеза использовали радиоуглеродный метод с добавлением $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$, в соответствии со стандартной методикой (Sorokin, Kadota, 1972). Радиоактивность конечных продуктов определяли на сцинтилляционном счетчике TRI-Carb TR2400 (“Packard”, США). Пробы воды отбирали батометром Руттнера и сразу наливали в стеклянные флаконы объемом 120 мл с помощью силиконовой трубки с двойной промывкой и с изливом половины объема склянки. Флаконы закрывали пенициллиновой пробкой без пузырька воздуха, закрепляя их алюминиевым колпачком с перфорацией для ввода реактивов. Все склянки при отборе были затемнены. Для определения первичной продукции использовали две прозрачные склянки и две темные, покрытые алюминиевой фольгой. В затемненном помещении во все флаконы добавляли 100 мкл стерильного раствора $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ (специфическая активность 2.04 Гбк ммоль; 1.5 мкКи/проба). Затем последовательно снимали общие затемняющие чехлы и каждую склянку помещали в индивидуальный чехол, калиброванный по степени пропускания фотосинтетически активной радиации, соответствующей освещенности на горизонте отбора пробы. Флаконы с пробами инкубировали в течение 24 ч в специальном бассейне с водой, при освещенности и температуре, близким к условиям *in situ*. По завершении экспозиции содержимое флаконов фиксировали 1 мл 0.05 н HCl. Интенсивность суммарного фотосинтеза ($I_{\text{фот}}$) рассчитывали по разнице интенсивностей в светлой и темной склянках. Интегральную продукцию фотосинтеза под квадратным метром рассчитывали как сумму величин активности в каждом кубометре водного столба, от поверхности до дна водоема.

Инкубационные эксперименты. Потенциальную метаногенную активность определяли в интегральных образцах осадков (0–10 и 10–20 см) путем инкубации осадков с субстратами, обеспечивающими ацетокластический (ацетат), гидрогенотрофный (формиат), метилотрофный (триметиламин, ТМА; метанол, MeOH; диметилсульфоксид, ДМСО) и метил-редуцирующий (смесь ТМА + H_2 ; MeOH + H_2 ; ДМСО + H_2). Го-

Таблица 1. Физико-химические параметры, активность и доля фототрофных микроорганизмов в водной толще оз. Сенеж

Параметр	Глубина, м		
	0 м	2 м	4 м
Температура, °С	24	23	22.5
Освещенность, лк	15 560	805	20
O ₂ , мг/дм ³	17	14.6	2.5
pH	9.25	9.2	7.5
PO ₄ ³⁻ , мг/дм ³	<0.05	0.06	0.18
хл <i>a</i> , мкг/дм ³	43.3	40.6	20.3
<i>I</i> _{фот} , мкг С/дм ³ /сут	351.6	224.2	194.6
Доля <i>Cyanobacteriota</i> , % от общего количества последовательностей 16S рРНК	24.6	30.1	14.4
Доля аноксигенных фототрофов, % от общего количества последовательностей 16S рРНК	2.02	1.39	0.81

товили серию из девяти параллельных инкубаций с добавлением различных субстратов из расчета конечной концентрации каждого субстрата (ацетат, формиат, MeOH, ДМСО, ТМА) – 10 мМ. Смеси с водородом содержали по 10 мМ MeOH, ДМСО, ТМА и 1.5 об. % H₂. По мере исчерпания H₂ из газовой фазы, его добавляли во флаконы с помощью шприца. В контрольный вариант, показывающий эндогенный метаногенез в осадках, субстраты не вносили. Подробная методика описана в предыдущей публикации (Kallistova et al., 2023). Количество образованного метана рассчитывали на 1 г сухого вещества (СВ) осадка; СВ определяли высушиванием образца до постоянного веса при 105°C. Все инкубации проводили при комнатной температуре (25.3 ± 1.3°C) в течение месяца. Потенциальные скорости метаногенеза оценивали как количество метана, образованное на 3, 7, 13 и 17 сут с начала инкубации. Результаты представлены как средние значения для 3-х повторностей.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Физико-химические параметры. Свет проникал до дна водоема, однако освещенность придонной воды составляла всего 0.13% от поверхностной. Слой воды 0–2 м был перенасыщен (до 200%) кислородом, за счет активности оксигенных фототрофов. Ниже 2 м концентрация кислорода резко падала до 30% насыщения, и, начиная с 3 м, в толще воды создавались гипоксидные условия (2.7–2.5 мг O₂/дм³). Осадки (0–30 см) были восстановленные: величина *Eh* изменялась от –188 до –358 мВ вниз по профилю. Следствием интенсивного фотосинтеза являлось защелачивание (pH > 9) слоя воды 0–2 м; в придонной воде pH

снижалась до нейтральных значений. Дефицит фосфата также наблюдался в слое воды 0–2 м; его концентрация увеличивалась в 3 раза на глубине 4 м (табл. 1). Концентрация CH₄ в водном слое 0–3.5 м изменялась в диапазоне 1.5–2.4 мкг/дм³. Небольшое увеличение концентрации CH₄ (с 1.6 до 2.4 мкг/дм³) наблюдалось в интервале глубин 2–3 м. На глубине 3.5 м концентрация CH₄ снижалась до 1.8 мкг/дм³, а на глубине 4 м (придонная вода) возрастала более чем в 5 раз, достигая 10.7 мкг/дм³ (рис. 1а). Концентрация CH₄ в восстановленных осадках была в среднем в 500 раз выше, чем в придонной воде (средняя по профилю 0–30 см – 5.2 ± 1.95 мг/дм³). Профиль CH₄ в осадках имел волнообразный характер: минимальные значения наблюдались в поверхностном слое 0–2 см, что может быть связано как с окислением, так и с диффузией в водную толщу; в слое осадков 2–5 см концентрация метана увеличивалась в 2 раза; ниже – постепенно снижалась до минимальных значений на глубине 15–20 см; затем снова увеличивалась и оставалась постоянной до глубины 30 см (рис. 1б).

Активность фотосинтеза. Средняя величина суммарной интенсивности фотосинтеза оксигенных и аноксигенных фототрофов (*I*_{фот}) по профилю водной толщи составляла 256.8 ± 83.4 мкг С/дм³/сут. Интегральная величина первичной продукции составляла 994.6 мг С/м²/сут, что позволяет отнести оз. Сенеж к мезотрофно-евтрофному трофическому статусу. *I*_{фот} в поверхностном водном слое (0 м) была в 1.8 раз выше, чем в придонной воде (351.6 vs 194.6 мкг С/дм³/сут). Содержание хл *a* в водных пробах также снижалось в 2 раза на глубине 4 м по сравнению с поверхно-

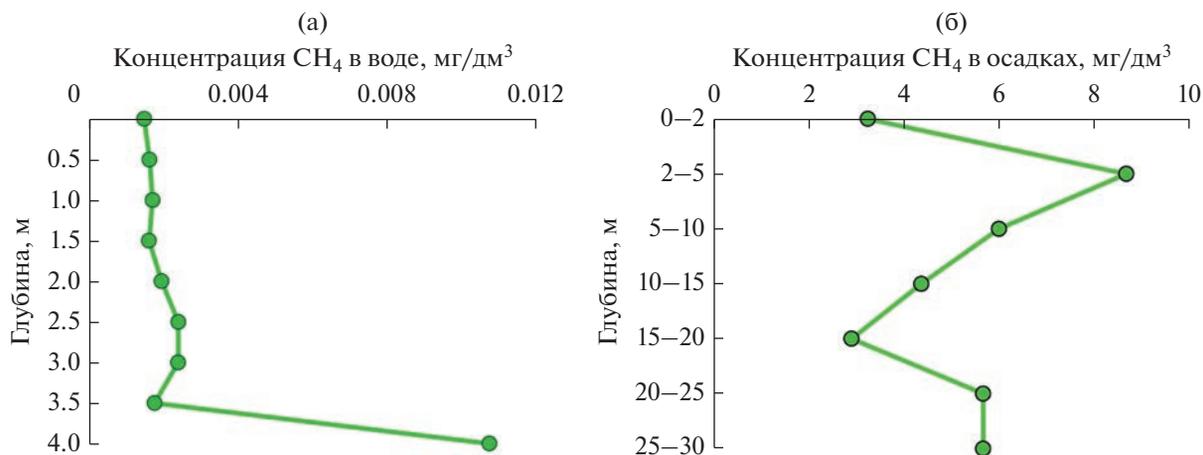


Рис. 1. Концентрация метана в воде (а) и осадках (б) по профилю экспериментальной точки глубоководной части оз. Сенеж.

стью, а общая доля представителей филума *Cyanobacteriota* – в 1.7 раз (табл. 1). На глубине 2 м интенсивность фотосинтеза была в 1.5 раза ниже, чем у поверхности (0 м), однако концентрация хл *a* снижалась незначительно (43.3 vs 40.6 мкг/л), а доля цианобактерий, наоборот, возрастала (24.6 vs 30.1%). Содержание хл *a* по профилю водной толщи довольно хорошо коррелировало с относительным количеством цианобактерий (коэффициент корреляции Пирсона, $r = 0.8986$) и хуже с $I_{\text{фот}}$ ($r = 0.7223$). Коэффициент корреляции между $I_{\text{фот}}$ и долей цианобактерий был низким ($r = 0.3456$), что может быть связано с тем, что часть ДНК была выделена из физиологически неактивных или мертвых клеток цианобактерий. В фотической зоне также детектированы последовательности, аффилированные с различными таксонами anoxygenic фототрофов (пурпурных серных и несерных, а также зеленых серных бактерий). При этом, несмотря на перенасыщение воды кислородом, суммарное относительное количество anoxygenic фототрофов было максимальным (2%) в поверхностном слое (табл. 1) и лучше коррелировало с $I_{\text{фот}}$ ($r = 0.9476$), чем количество цианобактерий.

Разнообразие оксигенных и аноксигенных фототрофов. Общее разнообразие микроорганизмов в воде и осадках оз. Сенеж будет представлено в другой публикации (готовится к печати). Преобладающие в водной толще оз. Сенеж морфологические формы цианобактерий представлены на рис. 2. По данным анализа фрагментов генов 16S рРНК цианобактерии составляли абсолютное большинство в микробном сообществе водной толщи озера (до 30% в фотической зоне; табл. 1). В воде доминировали (11.9–26.5%) цианобактерии, близкородственные (99.2% сходства) представителям вида *Microcystis aeruginosa* (LC557463.1); их доля

превышала долю остальных микроорганизмов в 4–20 раз. Помимо микроцистисов в воде детектированы последовательности, близкородственные (>98% сходства) цианобактериям видов *Aphanizomenon flos-aquae* (0.45–2%), *Cuspidothrix (Anabaena) issatschenkoi* (0.3–1%), *Planktothrix agardhii* (0.2–0.7%), *Woronichinia naegeliana* (0.2–0.5%), *Synechococcus* sp. (0.3–0.4%) и *Pseudanabaena mucicola* (0.06–0.11%). Доля представителей видов *Dolichospermum (Anabaena) lemmermannii*, *D. brachiatum*, *Radiocystis geminata*, *Synechococcus rubescens*, *Snowella* sp., а также некультивируемых представителей порядка *Chroococcales* и неидентифицированных цианобактерий была <0.1% для каждого из таксонов. Перечисленные цианобактерии были также детектированы в осадках (0–30 см), где их доля снижалась вниз по профилю с 0.7 до 0.14%.

Последовательности anoxygenic фототрофов, детектированные в оз. Сенеж, были аффилированы с пурпурными несерными бактериями семейств *Rhodobacteraceae*, *Rhodospirillaceae*, *Cotamonadaceae* (род *Rhodofera*), пурпурными серными бактериями семейства *Chromatiaceae* и факультативными фототрофами семейства *Roseiflexaceae*. Выявлены последовательности некультивируемых представителей филума *Chlorobiota* (0.4–1.2%, максимум на глубине 0 м), который включает зеленых серных бактерий. Суммарная доля anoxygenic фототрофов в воде составляла 0.8–2% (максимум на глубине 0 м, табл. 1), в осадках – 0.06–0.4% (максимум в слое 0–10 см).

Разнообразие метаногенов. По всему профилю водной толщи (0–4 м) выявлены последовательности (5–6%), близкородственные (99.25% сходства) пресноводным представителям клады SAR11 (*Pelagibacterales*) – *Ca. "Fonsibacter ubiqvis"* (CP024034.1), которые, возможно, участвуют в аэробном образовании метана (Carini et al., 2014).

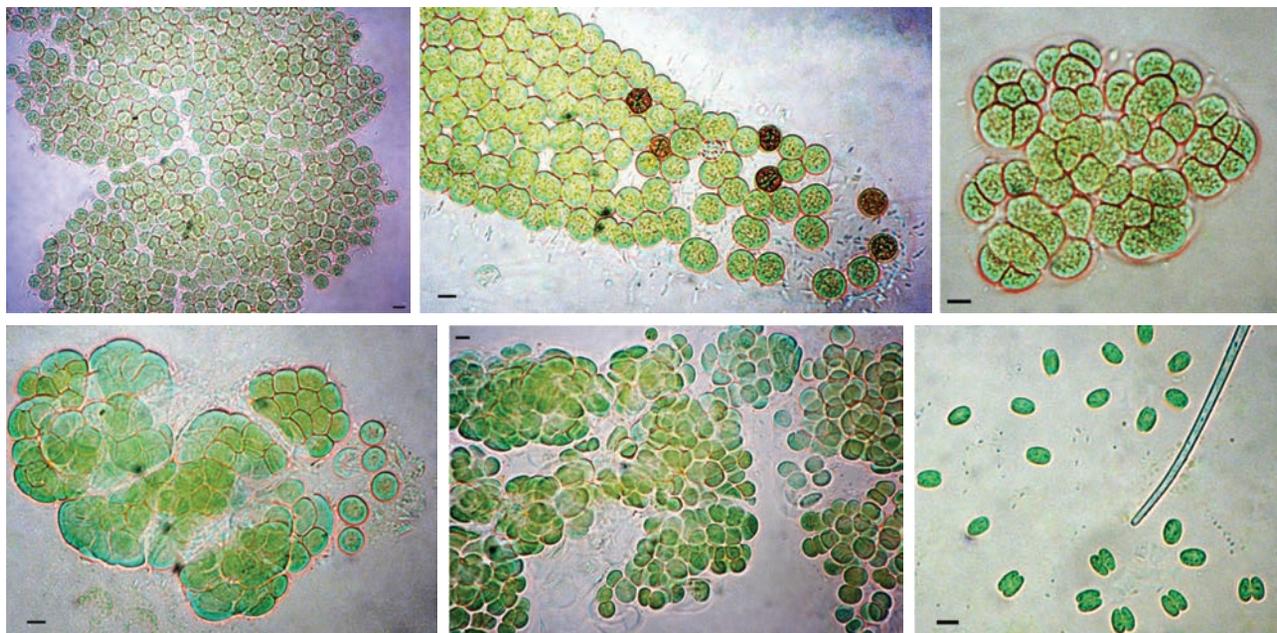


Рис. 2. Преобладающие в водной толще оз. Сенеж морфологические формы цианобактерий. Масштабная метка соответствует 5 мкм.

Их доля в осадках составляла 0.02–0.12%. В геноме *Ca. "Fonsibacter ubiquis"* выявлены потенциальные гомологи генов синтеза, транспорта и разложения МРп (*pepM*, *phnC*, *phnK*, *phnL*, *phnP*). Гомология *gprblast* (с консенсусной последовательностью домена из базы CDD) варьировала от 25 до 46% (табл. S1).

В перенасыщенных кислородом водах (0–2 м) детектированы последовательности (0.01–0.024%) классических анаэробных гидрогенотрофных метаногенных архей рода *Methanoregula* и порядка *Methanomicrobiales*. Наибольшего разнообразия метаногены достигали в гипоксидном слое (4 м), где наряду с гидрогенотрофными появлялись ацетокластические, метилотрофные и метил-редуцирующие метаногены. В слое осадков 0–10 см гидрогенотрофные и ацетокластические метаногены присутствовали в одинаковом соотношении 1 : 1 (доля каждой группы около 2%). На нижних горизонтах осадков доля ацетокластических метаногенов оставалась на том же уровне, а гидрогенотрофных – увеличивалась до 6.2%. По профилю осадков (0–30 см) доминировали представители гидрогенотрофных метаногенов родов *Methanoregula* (1.2–2.5%), *Methanolinea* (0.4–1.2%), *Methanobacterium* (0.2–1.1%), а также некультивируемые представители порядка *Methanomicrobiales* (0.1–1.1%). Доля ацетокластических метаногенов рода *Methanotrix* возросла с 0.66 до 1.84% в диапазоне глубин 4 м–30 см. Метилотрофные метаногены были представлены последовательностями, близкородственными (98.9% сходства) метаногенам вида *Methanosarcina subterranea* (NR_134763.1), кото-

рые используют С1-метилированные соединения, но не ацетат, формиат и H_2/CO_2 . Метилотрофы могли также присутствовать среди детектированных последовательностей некультивируемых представителей порядка *Methanosarciniales*. Доля метилотрофных метаногенов в оз. Сенеж была очень низкой (<0.05%). Доля последовательностей некультивируемых метил-редуцирующих метаногенов порядка *Methanomassiliicoccales* увеличивалась с 0.2 до 0.5% в диапазоне глубин 4 м–30 см (рис. 3).

Потенциальная активность метаногенеза. Потенциальную метаногенную активность в осадках определяли на разных субстратах метаногенеза в инкубационных экспериментах (рис. 4а). В контроле без добавления субстратов (эндогенный метаногенез) в образце осадка с глубины 0–10 см наблюдалось стабильное образование метана с постоянной скоростью (3.25 ± 0.16 мкмоль CH_4 /г СВ/сут) в течение всего периода инкубации (27 сут). При добавлении субстратов потенциальная скорость метаногенеза зависела от времени инкубации (табл. 2). Так, в первые 3 сут с начала инкубации максимальная скорость метаногенеза наблюдалась на формиате (6.1 мкмоль CH_4 /г СВ/сут), что было в 2 раза выше, чем в контроле и на ацетате. Поскольку образование метана при добавлении формиата начиналось сразу (без лаг-фазы) и с высокой скоростью (рис. 4б), то, вероятно, гидрогенотрофные метаногены были наиболее активны в осадках *in situ*. В процессе инкубации скорость гидрогенотрофного метаногенеза сначала снизилась (на 7 сут), затем процесс прекратился, что вероятнее всего связано с исчерпанием субстрата.

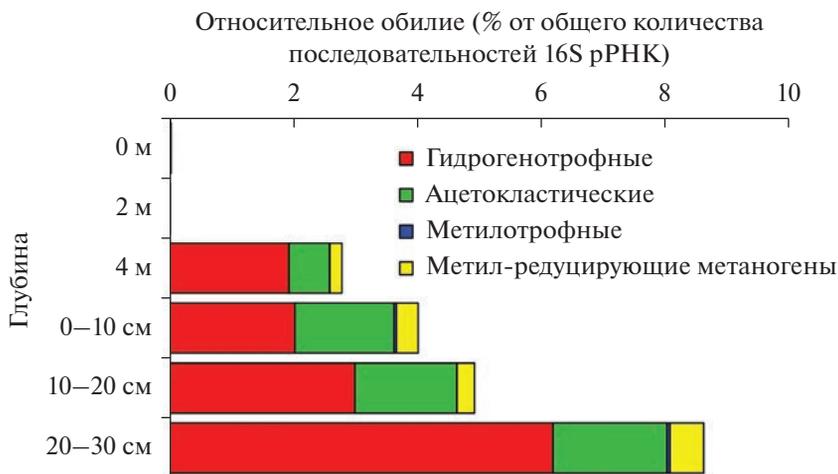


Рис. 3. Относительная численность последовательностей, относящихся к разным группам метаногенов, по профилю воды и осадков оз. Сенег.

Скорость ацетокластического метаногенеза в начале инкубации также была высокой (2.9 мкмоль $\text{CH}_4/\text{г СВ}/\text{сут}$) и увеличивалась со временем, что указывает на прирост ацетокластических метаногенов в процессе культивирования. Полученные результаты согласуются с данными молекулярного анализа, выявившими преобладание гидрогенотрофных и ацетокластических метаногенов в слое осадков 0–10 см (рис. 3). Фаза задержки в образовании метана наблюдалась при инкубации с C1-метилированными соединениями, в течение которой предположительно происходила адаптация сообщества и постепенное (в течение 2-х нед.) накопление метилотрофных метаногенов. Вероятно, в условиях *in situ* в осадках имелся недостаток C1-метилированных субстратов, что согласуется с крайне низким относительным обилием метилотрофных метаногенов. При добавлении ДМСО лимитирующей стадией, очевидно, являлась стадия перехода ДМСО в диметилсульфид (ДМС) – непосредственный субстрат метаногенеза, для которой необходимо присутствие в сообществе определенных сульфатредуцирующих бактерий. Этим объясняется длительная задержка (больше 2-х нед.) начала образования метана из ДМСО. Небольшая скорость метаногенеза на ТМА (0.88 мкмоль $\text{CH}_4/\text{г СВ}/\text{сут}$) в первые сутки инкубации, далее снижение потенциальной активности, а затем резкое увеличение может быть связано с присутствием в сообществе метаногенов с разным отношением к ТМА: в первые сутки инкубации были активны организмы, использующие разные C1-метилированные соединения, ко второй неделе инкубации накопились метаногены, предпочитающие в качестве субстрата ТМА. Динамика образования метана на смеси C1-метилированных соединений с H_2 указывает скорее на отсутствие метил-редуцирующего метаногенеза.

При добавлении $\text{MeOH} + \text{H}_2$ наблюдалась та же тенденция, что и при добавлении MeOH без водорода, что может быть связано с активностью исключительно метилотрофных метаногенов, потребляющих MeOH . В случае с $\text{DMSO} + \text{H}_2$, относительно высокая активность в первые 3 сут, вероятнее всего, связана с гидрогенотрофным метаногенезом на добавленном H_2 и эндогенно образованном CO_2 . Затем происходило переключение на метилотрофный метаногенез. При добавлении $\text{TMA} + \text{H}_2$, вероятнее всего, метилотрофный метаногенез протекал одновременно с гидрогенотрофным. Для более точных выводов о соотношении метил-редуцирующего, гидрогенотрофного и метилотрофного путей метаногенеза в условиях одновременного присутствия C1-метилированных субстратов и H_2 необходим анализ динамики изменения таксономического состава метаногенной популяции в процессе инкубации обогащенных субстратами образцов осадков.

В нижнем слое осадков (10–20 см) как эндогенная, так и потенциальные активности метаногенеза на разных субстратах были ниже, чем в верхнем слое (0–10 см) (рис. 4а, 4в), несмотря на довольно близкое относительное количество метаногенов в этих слоях (4 и 4.9% соответственно). Отличия нижнего слоя осадков от верхнего касались динамики метаногенеза на C1-метилированных соединениях в присутствии и отсутствии H_2 . Метилотрофный метаногенез имел большую задержку на MeOH и ТМА в нижнем слое осадков по сравнению с верхним, а также полностью отсутствовал на ДМСО. Метил-редуцирующий метаногенез можно с определенной долей вероятности предположить в варианте инкубации с добавлением $\text{MeOH} + \text{H}_2$, т.к. скорость метаногенеза в этом варианте, начиная с 7 сут инкубации и до конца

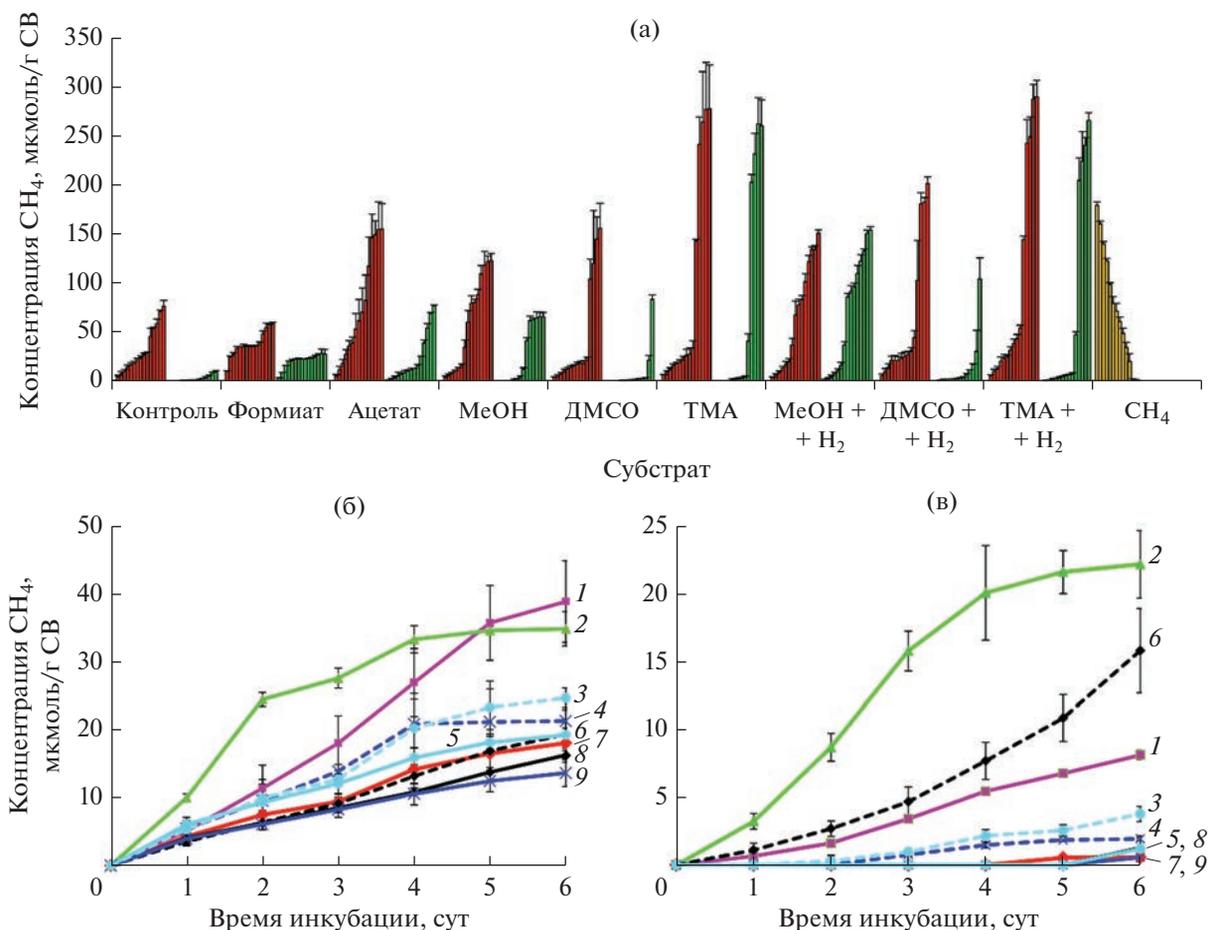


Рис. 4. Образование метана при инкубации осадков на разных субстратах метаногенеза: (а) – инкубация в течение 27 сут (красным цветом обозначены осадки с глубины 0–10 см, зеленым – 10–20 см, желтым – аэробное окисление метана в осадках с глубины 0–10 см); (б) – инкубация образцов осадков с глубины 0–10 см в течение первых 6 сут; (в) – инкубация образцов осадков с глубины 10–20 см в течение первых 6 сут. Номера кривых соответствуют: 1 – ацетат; 2 – формиат; 3 – TMA + H_2 ; 4 – DMSO + H_2 ; 5 – TMA; 6 – MeOH + H_2 ; 7 – контроль (без добавления субстрата); 8 – MeOH; 9 – DMSO.

эксперимента, превышала суммарную скорость на MeOH, формиате и в эндогенном контроле (табл. 2).

Таким образом, основными путями метаногенеза в осадках оз. Сенеж являлись гидрогено-трофный и ацетокластический. Метилотрофные метаногены малочисленны и малоактивны *in situ*, вероятно, из-за нехватки доступного субстрата. Активность метил-редуцирующих метаногенов можно предположить в нижнем слое осадков 10–20 см. Для сравнения в табл. 2 приведена потенциальная активность аэробного метаноокисления для слоя осадков 0–10 см (подробные результаты будут представлены в другой публикации). Максимальная потенциальная активность аэробного метаноокисления наблюдалась в первые сутки инкубации ($18.9 \text{ мкмоль } \text{CH}_4/\text{г СВ}/\text{сут}$). Она превышала суммарную потенциальную скорость метаногенеза ($15.5 \text{ мкмоль } \text{CH}_4/\text{г СВ}/\text{сут}$) за тот

же период времени для того же слоя осадков, что указывает на более быстрый ответ аэробных метанотрофов на снятие лимита по субстрату (в данном случае по кислороду) по сравнению с метаногенами. Метаногенам требуется больше времени для адаптации и накопления биомассы при переходе в более благоприятные по субстрату условия. Только через 2 нед. инкубации суммарная потенциальная скорость метаногенеза стала выше потенциальной скорости аэробного метаноокисления за тот же период.

ОБСУЖДЕНИЕ

В перенасыщенной кислородом фотической зоне оз. Сенеж присутствовал метан в концентрации $1.9 \pm 0.35 \text{ мкг}/\text{дм}^3$ (среднее значение на глубине 0–3.5 м), что может быть связано: 1) с физическим транспортом из осадков в сочетании с низкой скоростью аэробного метаноокисления;

Таблица 2. Потенциальные скорости метаногенеза (мкмоль $\text{CH}_4/\text{г СВ/сут}$) при инкубации образцов осадков на разных субстратах

Субстрат	Глубина, см	Время инкубации, сут			
		3	7	13	17
Контроль (эндогенная активность)	0–10	3.13	3.23	3.48	3.15
	10–20	0	0.13	0.21	0.25
Опыт – Контроль*					
Формиат	0–10	6.05	1.75	0	0
	10–20	5.27	3.09	1.44	1.25
Ацетат	0–10	2.86	4.33	5.53	5.44
	10–20	1.14	1.30	1.72	2.03
MeOH	0–10	0	1.69	3.30	3.26
	10–20	0	0.14	4.52	3.44
DMCO	0–10	0	0	0	2.97
	10–20	0	0	0	0
TMA	0–10	0.88	0.12	7.51	11.05
	10–20	0	0.08	2.92	11.67
MeOH + H_2	0–10	0	1.99	4.30	4.00
	10–20	1.56	5.09	8.23	6.94
DMCO + H_2	0–10	1.48	0.10	0	2.88
	10–20	0.25	0.17	0.32	0.40
TMA + H_2	0–10	1.11	1.27	7.61	11.11
	10–20	0.32	0.51	3.40	11.78
Суммарный метаногенез на всех субстратах	0–10	15.52	14.47	31.72	43.86
	10–20	8.54	10.51	22.76	37.76
Аэробное метаноокисление**	0–10	18.88	16.95	13.70	10.49

* Приведенные цифры являются разностью между опытом (скорость образования CH_4 при добавлении конкретного субстрата) и контролем (без добавления субстрата).

** Аэробное окисление метана в оз. Сенеж подробно описано в другой публикации (готовится к печати).

2) с процессом метаногенеза в этой зоне. Косвенным доказательством последнего может служить локальное увеличение концентрации метана в диапазоне глубин 2–3 м (рис. 1а). Микробный метаногенез в аэробных условиях может быть связан: 1) с активностью цианобактерий и других микроорганизмов, разлагающих в условиях фосфатного голодания МРп с выделением метана в качестве побочного продукта; 2) с активностью метаногенов внутри бескислородных зон, в том числе в цианобактериальных агрегатах. Наши данные указывают на возможность протекания в аэробной зоне оз. Сенеж обоих путей метаногенеза. Способность отдельных штаммов пресноводных цианобактерий к образованию метана при разложении фосфонатов продемонстрирована в работе Zhao et al. (2022). Отвечающий за разложение фосфонатов генный кластер (*phn*), представленный *phn* опероном, который включает комплекс транспорта фосфоната (*phnC-E*), ген-регулятор транскрипции (*phnF*), С-Р-лиазный комплекс

(*phnG-M*) и несколько дополнительных генов (*phnN-P*), присутствует в основном в геномах филадельфийских цианобактерий (Zhao et al., 2022). В оз. Сенеж выявлены последовательности представителей как филадельфийских (*Aphanizomenon*, *Cuspidothrix* (*Anabaena*), *Planktothrix*, *Pseudanabaena*, *Dolichospermum* (*Anabaena*)), так и одноклеточных колониальных (*Microcystis*, некультивируемые *Chroococcales*, *Snowella*, *Radiocystis*, *Woronichinia*) и неколонизальных (*Synechococcus*) цианобактерий, а также неизвестные цианобактерии. Большинство детектированных оз. Сенеж цианобактерий, включая доминирующих представителей (*Microcystis*, *Aphanizomenon*, *Cuspidothrix*, *Woronichinia* и *Dolichospermum*), не имеют в геномах ни генов синтеза, ни генов транспорта и разложения фосфонатов (согласно списку цианобактерий из статьи Zhao et al., 2022). Из всех цианобактерий, обнаруженных в оз. Сенеж, только три рода *Pseudanabaena*, *Synechococcus* и *Planktothrix* могут потенциально участвовать в синтезе (*Synechococcus* и *Plankto-*

thrix) и разложении (*Pseudanabaena*, *Synechococcus*) фосфонатов. Их суммарная доля в фотической зоне (0–2 м) оз. Сенеж составляла 0.5–0.8% и увеличивалась до 1.2% в придонной воде за счет увеличения доли представителей рода *Planktothrix*, которые участвуют в синтезе, но не в разложении МРп.

По всей водной толще оз. Сенеж доминировали (на 3-м месте по относительному количеству среди всех прокариот) последовательности, близкородственные (99.25% сходства) *Ca. "Fonsibacter ubiqvis"* (CP024034.1). Это широко распространенные в пресных водоемах аэробные хемогетеротрофы, являющиеся представителями клады SAR11 (*Pelagibacterales*) (Henson et al., 2018). У морских представителей клады SAR11 выявлены гены синтеза и разложения МРп, и в условиях фосфатного голодания они используют МРп в качестве источника фосфора с побочным выделением метана в эквимольных количествах (Carini et al., 2014). В работе Хенсона и соавт. (2018) проведен геномный анализ *Ca. "F. ubiqvis"*, однако нет информации ни о наличии, ни об отсутствии генов синтеза (*pepM* и *ppd*) и разложения (*phn*) МРп у этого организма (Henson et al., 2018), а также у других представителей рода *Ca. "Fonsibacter"* (Tsementzi et al., 2019). Мы обнаружили в геноме *Ca. "Fonsibacter ubiqvis"* потенциальные гомологи генов метаболизма МРп. Однако для обоснованного утверждения того, что данный организм способен к аэробному метаногенезу, необходим более детальный геномный анализ, а также физиологические эксперименты.

Кроме того, в насыщенных кислородом водах оз. Сенеж детектированы последовательности классических анаэробных гидрогенотрофных метаногенов рода *Methanoregula*. Данные метаногены были выявлены ранее в аэробной водной толще пресного бореального оз. Светлое (Kallistova et al., 2018), а также в поверхностных водах пяти пресных озер, содержащих крупные агрегаты *Microcystis* sp. (Li et al., 2021). Согласно сравнительному геномному анализу, основной пул антиоксидантных генов присутствует у различных метаногенов порядков *Methanobacteriales*, *Methanocellales*, *Methanococcales*, *Methanomicrobiales* (включает род *Methanoregula*), *Methanosarcinales* и *Methanopyrales*. Этот пул в числовом выражении шире представлен у метаногенов порядков *Methanocellales*, *Methanomicrobiales* и *Methanosarcinales*. Представители этих порядков лучше адаптированы к окисленным условиям и поэтому чаще встречаются в различных аэробных местообитаниях (Lyu, Lu, 2018). Прямая передача водорода от цианобактерий к гидрогенотрофным метаногенам выявлена как в лабораторных модельных экспериментах (Berg et al., 2014), так и в природных цианобактериальных сообществах (Самылина и соавт., 2023). Водород является облигатным продуктом нитроге-

назной активности в реакции фиксации азота цианобактериями. При этом нитрогеназа необратимо инактивируется кислородом, и поэтому для фиксации азота необходимы анаэробные условия. Диазотрофные цианобактерии по-разному решают эту проблему. У нитчатых цианобактерий, в том числе у детектированных в оз. Сенеж представителей родов *Aphanizomenon*, *Cuspidothrix* и *Dolichospermum*, имеются специализированные клетки – гетероцисты, которые защищают нитрогеназу от действия кислорода, т.е. процессы фотосинтеза и азотфиксации разделены в пространстве. У многих аэробных диазотрофных негетероцистных цианобактерий фиксация N_2 с образованием H_2 может происходить как в темновой период в условиях чередования режима свет/темнота, так и при непрерывном освещении. Например, цианобактерии рода *Gloeotheca* реализуют стратегию разделения во времени процессов фотосинтеза и фиксации N_2 в условиях непрерывного освещения: активность нитрогеназы достигает пика в период, когда активность фотосинтеза снижается (подробнее см. Stal, 2015). Несмотря на то, что доминирующие в оз. Сенеж цианобактерии вида *M. aeruginosa* не способны к фиксации азота, они образуют H_2 в анаэробных условиях в темноте за счет активности гидрогеназы при разложении эндогенных запасных веществ, таких как гликоген (Asada, Kawamura, 1984; Asada et al., 1998; Rashid et al., 2009). В природе дефицит кислорода, необходимый для гидрогеназной активности цианобактерий рода *Microcystis* и гидрогенотрофной активности метаногенов рода *Methanoregula*, может наблюдаться, например, в бентосных цианобактериальных матах, где условия обычно становятся анаэробными ночью, когда фотосинтез прекращается, а высокая скорость дыхания приводит к быстрому истощению кислорода (Stal, 2015). Гидрогенотрофные и ацетокластические метаногены были также выявлены в бескислородных микронишах внутри плавающих агрегатов цианобактерий рода *Microcystis* (Li et al., 2021). Последнее может также иметь место в оз. Сенеж, где компактные цианобактериальные агрегаты выявлены с помощью микроскопии (рис. 2). Таким образом, гидрогенотрофные метаногены рода *Methanoregula*, находясь в кооперации с цианобактериями, потенциально способны к образованию метана в аэробной водной толще.

В восстановленных осадках оз. Сенеж наблюдалась типичная для пресных озер картина образования метана – преобладание гидрогенотрофного и ацетокластического путей метаногенеза (Borrel et al., 2011; Peura et al., 2015; Rissanen et al., 2017; Kallistova et al., 2018, 2021; Lyautey et al., 2021; Li et al., 2021). Низкие скорости и низкое относительное количество метилотрофных и метил-редуцирующих метаногенов могут быть связаны с

дефицитом метилированных C1-соединений, характерных для пресных озер (Vorrel et al., 2011). Однако цианобактерии в период цветения могут служить источником метилированных соединений и значительно стимулировать активность метилотрофного метаногенеза (Zhu et al., 2022). В работе Риссанена (2017) показано, что доля метаногенов в архейном сообществе зоны литорали пресного озера была выше, чем в его глубоководной части. Как следует из более низкого отношения C : N, на поросшем растительностью литоральном участке было больше доступного для микроорганизмов ОВ по сравнению с глубоководной частью озера. Этим объясняются более высокие потенциальные скорости образования метана и общего неорганического углерода, а также более высокая относительная численность метаногенов в зоне литорали. Относительное количество гидрогено-трофных представителей семейства *Methanobacteriaceae* было выше в зоне литорали, чем в глубоководной части озера, и, напротив, ацетокластические представители семейства *Methanosetaeaceae* преобладали в глубоководной части (Rissanen et al., 2017). Сравнение данных 2022 г., полученных для глубоководной части оз. Сенез (настоящая работа), и данных 2021 г., полученных для зоны литорали (Kallistova et al., 2023), показывает, что в верхнем слое осадков соотношение гидрогено-трофных и ацетокластических метаногенов, как в зоне литорали, так и в глубоководной части озера, было близким (~1 : 1). При этом, однако, концентрация метана, общее относительное количество метаногенов, скорость эндогенного метаногенеза и метаногенеза на разных субстратах были выше в глубоководной части озера по сравнению с литоралью. Мы предполагаем, что цветение цианобактерий создало благоприятные условия для метаногенеза в глубоководной части озера, т.к. способствовало анаэробии и избыточному поступлению метаногенных субстратов. В период исследования литорали цветения цианобактерий не происходило, и основными первичными продуцентами в озере были диатомовые водоросли (Kallistova et al., 2023).

Таким образом, интенсивное цветение цианобактерий способствует усилению метаногенеза в пресном озере умеренного климата, как напрямую в водной толще за счет аэробного метаногенеза при разложении МРп и снабжения H₂ гидрогено-трофных метаногенов, ассоциированных с цианобактериальными агрегатами, так и опосредованно в придонной воде и осадках за счет создания дефицита кислорода и снабжения метаногенов субстратами при осаднении и разложении избыточной биомассы цианобактерий.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа частично финансировалась из средств Российского научного фонда (грант № 22-14-00038) и Ми-

нистерства науки и высшего образования Российской Федерации.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Каллистова А.Ю., Кадников В.В., Саввичев А.С., Русанов И.И., Дворников Ю.А., Лейбман М.О., Хомутов А.В., Равин Н.В., Пименов Н.В. Сравнительное исследование путей метаногенеза в осадках термокарстовых и полигенетических ямальских озер // Микробиология. 2021. Т. 90. С. 236–242.
- Kallistova A.Yu., Kadnikov V.V., Savvichev A.S., Rusanov I.I., Dvornikov Yu.A., Leibman M.O., Khomutov A.V., Ravin N.V., Pimenov N.V. Comparative study of methanogenic pathways in the sediments of thermokarst and polygenetic Yamal lakes // Microbiology (Moscow). 2021. V. 90. P. 261–267.
- Намсараев З.Б. Использование коэффициентов поглощения для расчета концентрации хлорофиллов и бактериохлорофиллов // Микробиология. 2009. Т. 78. С. 836–839.
- Namsaraev Z.B. Application of extinction coefficients for quantification of chlorophylls and bacteriochlorophylls // Microbiology (Moscow). 2009. V. 78. P. 794–797.
- Самылина О.С., Меркель А.Ю., Пименов Н.В. Суточная динамика метана в цианобактериальном сообществе содового озера Горчина 1 (Кулундинская степь, Алтайский край) // Микробиология. 2023. Т. 92. С. 233–239.
- Samylyna O.S., Merkel A.Y., Pimenov N.V. Diurnal methane dynamics in the cyanobacterial community of soda Lake Bitter 1 (Kulunda Steppe, Altai Krai) // Microbiology (Moscow). 2023. V. 92. P. 293–299.
- Asada Y., Kawamura S. Hydrogen evolution by *Microcystis aeruginosa* in darkness // Agric. Biol. Chem. 1984. V. 48. P. 2595–2596.
- Asada Y., Miyake M., Koike Y., Aoyama K., Uemura I., Miyake J. Hydrogenase-mediated hydrogen metabolism in a non-nitrogen-fixing cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa* // BioHydrogen / Eds. Zaborsky O.R., Benemann J.R., Matsunaga T., Miyake J., San Pietro A. Boston: Springer, 1998. P. 173–179.
- https://doi.org/10.1007/978-0-585-35132-2_23
- Berg A., Lindblad P., Svensson B.H. Cyanobacteria as a source of hydrogen for methane formation // World J. Microbiol. Biotechnol. 2014. V. 30. P. 539–545.
- Bižić M., Grossart H.-P., Ionescu D. Methane Paradox // eLS / Chichester: John Wiley & Sons, Ltd., 2020. P. 1–11.
- <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0028892>
- Borrel G., Jézéquel D., Biderre-Petit C., Morel-Desrosiers N., Morel J.P., Peyret P., Fonty G., Lehours A.C. Production and consumption of methane in freshwater lake ecosystems // Res. Microbiol. 2011. V. 162. P. 832–847.

- Carini P., White A.E., Campbell E.O., Giovannoni S.J. Methane production by phosphate-starved SAR11 chemoheterotrophic marine bacteria // *Nat. Commun.* 2014. V. 5. Art. 4346.
<https://doi.org/10.1038/ncomms5346>
- Diaz R.J., Rosenberg R. Spreading dead zones and consequences for marine ecosystems // *Science*. 2008. V. 321. P. 926–929.
- Edgar R.C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST // *Bioinformatics*. 2010. V. 26. P. 2460–2461.
- Frey B., Rime T., Phillips M., Stierli B., Hajdas I., Widmer F., Hartmann M. Microbial diversity in European alpine permafrost and active layers // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2016. V. 92. Art. fiw018.
<https://doi.org/10.1093/femsec/fiw018>
- Henson M.W., Lanclus V.C., Faircloth B.C., Thrash J.C. Cultivation and genomics of the first freshwater SAR11 (LD12) isolate // *ISME J.* 2018. V. 12. P. 1846–1860.
- Huisman J., Codd G.A., Paerl H.W., Ibelings B.W., Ver-spagen J.M.H., Visser P.M. Cyanobacterial blooms // *Nat. Rev. Microbiol.* 2018. V. 16. P. 471–483.
- Kallistova A., Kadnikov V., Rusanov I., Kokryatskaya N., Beletsky A., Mardanov A., Savvichev A., Ravin N., Pimenov N. Microbial communities involved in aerobic and anaerobic methane cycling in a meromictic ferruginous subarctic lake // *Aquat. Microbial Ecol.* 2018. V. 82. P. 1–18.
- Kallistova A.Yu., Koval D.D., Kadnikov V.V., Toshchakov S.V., Yusupov S.K., Izotova A.O., Vinogradova E.N., Zekker I., Pimenov N.V. Methane cycle in a littoral site of a temperate freshwater lake // *Microbiology (Moscow)*. 2023. V. 92. P. 153–170.
- Li C., Hambright K.D., Bowen H.G., Trammell M.A., Gros-sart H.P., Burford M.A., Hamilton D.P., Jiang H., Latour D., Meyer E.I., Padiśák J., Zamor R.M., Krumholz L.R. Global co-occurrence of methanogenic archaea and methanotrophic bacteria in *Microcystis* aggregates // *Environ. Microbiol.* 2021. V. 23. P. 6503–6519.
- Lyautey E., Billard E., Tissot N., Jacquet S., Domaizon I. Seasonal dynamics of abundance, structure, and diversity of methanogens and methanotrophs in lake sediments // *Microb. Ecol.* 2021. V. 82. P. 559–571.
- Lyu Z., Lu Y. Metabolic shift at the class level sheds light on adaptation of methanogens to oxidative environments // *ISME J.* 2018. V. 12. P. 411–423.
- Magoč T., Salzberg S.L. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies // *Bioinformatics*. 2011. V. 27. P. 2957–2963.
- McAuliffe C.C. GC determination of solutes by multiple phase equilibration // *Chem. Technol.* 1971. V. 1. P. 46–51.
- Peura S., Sinclair L., Bertilsson S., Eiler A. Metagenomic insights into strategies of aerobic and anaerobic carbon and nitrogen transformation in boreal lakes // *Sci. Rep.* 2015. V. 5. Art. 12102.
<https://doi.org/10.1038/srep12102>
- Rashid N., Song W., Park J., Jin H.-F., Lee K. Characteristics of hydrogen production by immobilized cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* through cycles of photosynthesis and anaerobic incubation // *Ind. Eng. Chem.* 2009. V. 15. P. 498–503.
- Reinl K.L., Harris T.D., North R.L., Almela P., Berger S.A., Bizic M., Burnet S.H., Grossart H.-P., Ibelings B.W., Jakobsson E., Knoll L.B., Lafrancois B.M., McElarney Y., Morales-Williams A.M., Obertegger U., Ogashawara I., Paule-Mercado M.C., Peierls B.L., Rusak J.A., Sarkar S., Sharma S., Trout-Haney J.V., Urrutia-Cordero P., Venkiteswaran J.J., Wain D.J., Warner K., Weyhenmeyer G.A., Yokota K. Blooms also like it cold // *Limnol. Oceanogr. Lett.* 2023.
<https://doi.org/10.1002/lol2.10316>
- Rissanen A.J., Karvinen A., Nykänen H., Peura S., Tirola M., Mäki A., Kankaala P. Effects of alternative electron acceptors on the activity and community structure of methane-producing and consuming microbes in the sediments of two shallow boreal lakes // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2017. V. 93. Art. fix078.
<https://doi.org/10.1093/femsec/fix078>
- Rognes T., Flouri T., Nichols B., Quince C., Mahé F. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics // *PeerJ*. 2016. V. 4. Art. e2584.
<https://doi.org/10.7717/peerj.2584>
- Smucker N.J., Beaulieu J.J., Nietch C.T., Young J.L. Increasingly severe cyanobacterial blooms and deep water hypoxia coincide with warming water temperatures in reservoirs // *Glob. Change Biol.* 2021. V. 27. P. 2507–2519.
- Sorokin Y.I., Kadota H. Techniques for the assessment of microbial production and decomposition in fresh waters // *IBP Handbook 23 / Oxford and London: Blackwell Scientific Publ.*, 1972. 112 p.
- Stal L.J. Nitrogen fixation in cyanobacteria // *eLS / Chichester: John Wiley & Sons, Ltd.*, 2015. P. 1–9.
<https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0021159.pub2>
- Tsementzi D., Rodriguez-R L.M., Ruiz-Perez C.A., Meziti A., Hatt J.K., Konstantinidis K.T. Ecogenomic characterization of widespread, closely-related SAR11 clades of the freshwater genus “*Candidatus Fonsibacter*” and proposal of *Ca. Fonsibacter lacus* sp. nov. // *Syst. Appl. Microbiol.* 2019. V. 42. P. 495–505.
- Wetzel R.G. *Limnology: Lake and River Ecosystems* // Academic Press, 2001, 3rd edn.
<https://doi.org/10.1016/C2009-0-02112-6>
- Wilhelm S.W., Bullerjahn G.S., McKay R.M.L. The complicated and confusing ecology of *Microcystis* blooms // *mBio*. 2020. V. 11. Art. e00529-20.
<https://doi.org/10.1128/mBio.00529-20>
- Xu H., Liu Y., Tang Z., Li H., Li G., He Q. Methane production in harmful algal blooms collapsed water: The contribution of non-toxic *Microcystis aeruginosa* outweighs that of the toxic variety // *J. Cleaner Product.* 2020. V. 276. Art. 124280.
<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.124280>
- Zhao L., Lin L.Z., Chen M.Y., Teng W.K., Zheng L.L., Peng L., Lv J., Brand J.J., Hu C.X., Han B.P., Song L.R., Shu W.S. The widespread capability of methylphosphonate utilization in filamentous cyanobacteria and its ecological significance // *Water Res.* 2022. V. 217. Art. 118385.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2022.118385>
- Zhu Y., Chen X., Yang Y., Xie S. Impacts of cyanobacterial biomass and nitrate nitrogen on methanogens in eutrophic lakes // *Sci. Total. Environ.* 2022. V. 848. Art. 157570.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.157570>

Methane Production in a Temperate Freshwater Lake during an Intense Cyanobacterial Bloom

A. Yu. Kallistova^{1, *}, A. I. Kosyakova¹, I. I. Rusanov¹, V. V. Kadnikov¹, A. V. Beletskii¹, D. D. Koval¹, S. K. Yusupov¹, I. Zekker², and N. V. Pimenov¹

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

²University of Tartu, Tartu, 50411 Estonia

*e-mail: kallistoanna@mail.ru

Received May 15, 2023; revised May 18, 2023; accepted May 22, 2023

Abstract—Seasonal cyanobacterial blooms have a negative impact on freshwater ecosystems. The role of cyanobacteria in methane production and their relationship with methanogenic archaea are not yet well understood. The goal of the present work was to identify the features of methanogenesis in the water column and sediments of a profound part of the freshwater Lake Senezh (Moscow oblast) during a period of cyanobacteria over-bloom. Analytical, radiotracer, microscopic, molecular biological, and incubation techniques were used. Alkalization and oxygen oversaturation of the 0–2-m water layer were caused by intensive photosynthesis. The near-bottom water (4 m) was pH-neutral and hypoxic; the sediments were reduced. Methane was detected throughout the water column; its concentration in the surface water was an order of magnitude lower than in the near-bottom water and 4 orders of magnitude lower than in the sediments. Cyanobacteria of the species *Microcystis aeruginosa* predominated in the photic zone (up to 30% of the total number of the 16S rRNA gene fragments). The sequences of cyanobacteria and freshwater members of the SAR11 clade, which can potentially be involved in aerobic methanogenesis via decomposition of methylphosphonates (MPn), were also detected. The sequences of hydrogenotrophic methanogens of the genus *Methanoregula*, which are potentially capable of methanogenesis in cooperation with cyanobacteria, were revealed in oxygen-supersaturated water. Hydrogenotrophic and acetoclastic pathways of methanogenesis predominated in reduced sediments. Sequences of methanogens of the orders *Methanomicrobiales*, *Methanobacteriales*, *Methanosarcinales*, and *Methanomassiliicoccales* were detected there. Cyanobacterial bloom promoted methanogenesis both in the photic zone of Lake Senezh (due to MPn decomposition and anaerobic methanogenesis in association with cyanobacterial aggregates) and in the near-bottom water and sediments (due to oxygen depletion and excessive release of substrates caused by sedimentation and degradation of cyanobacterial biomass).

Keywords: freshwater lakes, cyanobacterial bloom, *Microcystis*, methanogenesis, methylphosphonate decomposition, *Methanoregula*

СОВМЕСТИМЫЕ ВЕЩЕСТВА, НАКАПЛИВАЕМЫЕ КЛЕТКАМИ ШТАММА *GLUTAMICIBACTER* SP. SMB32 В ОТВЕТ НА ДЕЙСТВИЕ АБИОТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

© 2023 г. Л. Н. Ананьина^а, *, А. А. Горбунов^б, Е. А. Шестакова^а,
А. А. Пьянкова^а, Е. Г. Плотникова^а

^аИнститут экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь, 614081 Россия

^бИнститут технической химии УрО РАН – филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь, 614013 Россия

*e-mail: ludaananyina@mail.ru

Поступила в редакцию 30.03.2023 г.

После доработки 26.05.2023 г.

Принята к публикации 30.05.2023 г.

Методом спектроскопии протонного магнитного резонанса исследован пул совместимых веществ, накапливающихся в ответ на действие абиотических факторов среды в клетках штамма *Glutamicibacter* sp. SMB32. Средой обитания исследованного штамма являлась техногенно засоленная почва района солеразработок Верхнекамского месторождения калийно-магниевых солей (Пермский край, Россия). Штамм SMB32 рос в диапазоне температур 5–35°C. Выявлено, что при 5 и 32°C в клетках значительно увеличивалось количество трегалозы, чем при 25°C. *Glutamicibacter* sp. SMB32 был способен расти как без соли, так и в присутствии до 11% NaCl. В клетках, выращенных в среде без хлорида натрия, преобладал глутамат. В условиях высокой солености среды (8% NaCl) в клетках исследованного штамма доминировали трегалоза, пролин, глутамин и глутамат. Повышение солености среды культивирования приводило к возрастанию внутриклеточных количеств пролина. В представленной работе на примере штамма SMB32 впервые показана способность бактерий рода *Glutamicibacter* к синтезу маннита, и продемонстрирована зависимость его аккумуляции от режима аэрации. Таким образом, штамм *Glutamicibacter* sp. SMB32 обладает высокой пластичностью метаболизма, проявляя способность адаптироваться к неблагоприятному действию разных физико-химических факторов.

Ключевые слова: *Glutamicibacter*, совместимые вещества, ЯМР, температура, соленость, аэрация

DOI: 10.31857/S002636562360013X, **EDN:** KFPNGN

В 2016 г. Н.-J. Busse пересмотрел таксономию рода *Arthrobacter*, и по ряду признаков, включая систему хинонов и тип пептидогликана, виды группы “*Arthrobacter nicotianae*” были реклассифицированы в новый род *Glutamicibacter* (Busse, 2016). За последнее десятилетие резко возросло внимание исследователей к бактериям этой таксономической группы ввиду их высокого биотехнологического потенциала. Бактерии рода *Glutamicibacter* широко распространены в природе, обладают стимулирующими рост растений свойствами, не имеют строгих требований к питательным средам, способны к деградации различных стойких токсичных поллютантов (Wang et al., 2015; Busse, 2016; Feng et al., 2017; Qin et al., 2018; Santos et al., 2020; Ястребова и соавт., 2022). В то же время, механизмы, обуславливающие стрессоустойчивость бактерий рода *Glutamicibacter*, изучены недостаточно. Из литературы известно, что одним из механизмов защиты эубактерий от

неблагоприятных факторов окружающей среды является синтез органических соединений – совместимых веществ, накопление которых в высоких концентрациях не нарушает метаболизм клетки (Galinski, 1993). В геномах представителей рода *Glutamicibacter* выявлены гены, кодирующие ферменты синтеза таких совместимых соединений как трегалоза (Nishu et al., 2019; Santos et al., 2020), пролин и глутамат (Nishu et al., 2019). Однако данных о реализации генетической информации на фенотипическом уровне в условиях действия различных абиотических факторов для бактерий этого рода крайне мало. Так, известно, что некоторые штаммы рода *Glutamicibacter* в условиях высокой солености среды накапливали эктоин (Назаров и соавт., 2022).

В ходе исследования биоразнообразия экосистемы района солеразработок Верхнекамского месторождения калийно-магниевых солей (ВМКМС) (Пермский край, Россия) бактерии рода *Gluta-*

micibacter были выделены из разных засоленных биотопов (Назаров и соавт., 2022; Ястребова и соавт., 2022; Anan'ina et al., 2022). Однако засоление не единственный неблагоприятный абиотический фактор в этой экосистеме. ВМКМС расположено на севере Пермского края в зоне умеренно-континентального климата. В регионе зимой наблюдается промерзание верхних слоев грунта на глубину более 0.1 м (Василец, 2021), а весной после схода снежного покрова возможен возврат холодов с образованием инея на поверхности грунта. В летний период вследствие обильных осадков отмечается переувлажнение грунтов, что приводит к затруднению аэрации и снижению концентрации кислорода в них. В исследованной экосистеме широко распространены, поскольку были обнаружены как в шламоохранилищах (Ястребова и соавт., 2022), так и в техногенно засоленной почве (Anan'ina et al., 2022), изоляты, филогенетически близкородственные виду *Glutamicibacter halophytocola*. Это может указывать на наличие у этих бактериальных культур эффективных механизмов защиты от неблагоприятных абиотических факторов.

Целью настоящей работы было изучение совместимых веществ, накапливаемых при разной температуре, аэрации и солености среды в клетках штамма SMB32, филогенетически близкородственного виду *Glutamicibacter halophytocola* и обитающего в техногенно засоленной почве района солеработок ВМКМС.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования. В работе использовали штамм SMB32 из разлагающего нафталин консорциума бактерий SMB3, выделенного из техногенно засоленной почвы района солеработок ВМКМС (Пермский край, Россия) (Anan'ina et al., 2022). Штамм идентифицирован на основе анализа почти полной нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК (GenBank № MN327514). Бактериальная культура хранится в рабочей коллекции Лаборатории микробиологии техногенных экосистем ИЭГМ УрО РАН.

Физиологическая характеристика штамма. Способность к росту при температурах 25, 32, 35 и 37°C изучали, выращивая штамм в 100 мл минеральной среды Раймонда (МСР) (Raymond, 1961), содержащей 1 г/л глюкозы ("ОАО Дальхимфарм", Россия), в колбах объемом 250 мл, в термостатируемых шкафах ТС-1/80 СПУ (Россия). Культивирование штамма при 0 и 5°C проводили в холодильных камерах. Контроль температуры осуществляли один раз в день с помощью спиртовых термометров с погрешностью измерения $\pm 1^\circ\text{C}$. Кроме того, в камере, поддерживающей 0°C, термометрия и запись показаний проводились на протяжении всего эксперимента с помощью термо-

метрической системы Data logger Rc-5 ("Eltech", США). Записанные данные графически визуализировали в программе Elitechlogwin ("Eltech", США) после завершения эксперимента.

Изучение кинетики роста штамма в зависимости от концентрации хлорида натрия (5, 6, 8, 10, 11, 12%) и без соли проводили при культивировании в 100 мл МСР, содержащей 1 г/л глюкозы, в колбах объемом 250 мл на орбитальном шейкере УВМТ-12-250 ("Элион", Россия) со скоростью вращения 100 об./мин при 25°C.

Продолжительность культивирования составляла до 14 сут.

Оптическую плотность клеточной суспензии измеряли на спектрофотометре BioSpec-mini UV/VIS ("Shimadzu corporation", Япония) при длине волны 540 нм в кювете с длиной оптического пути 1 см.

Расчет удельной скорости роста (μ) производили в экспоненциальной фазе по стандартной формуле (Gerhardt, 1981).

Подготовка биомассы для экстракции органических соединений. При температурах 5, 25 и 32°C штамм SMB32 растили в среде без хлорида натрия, как описано выше для изучения температурного диапазона. Дополнительно при температурах 25 и 32°C инкубацию проводили на орбитальном шейкере при скорости вращения 100 или 200 об./мин.

Кроме того, штамм SMB32 выращивали в среде, содержащей 6 или 8% NaCl, а также без дополнительного внесения соли. Культивирование осуществляли на орбитальном шейкере УВМТ-12-250 ("Элион", Россия) при 100 об./мин и температуре 25°C.

В описанных выше экспериментах бактериальную культуру выращивали в 100 мл МСР с глюкозой, внесенной в конечной концентрации 1 г/л, в колбах объемом 250 мл до фазы замедления роста. Инокулятом (1%, об./об.) служила культура, инкубированная при температуре 25°C в МСР с глюкозой, содержащей 5% NaCl.

После завершения инкубирования клеточную суспензию делили на две равные части. Клетки осаждали на центрифуге 3К30 ("Sigma", Германия) при 10000 g в течение 10 мин; температура соответствовала таковой в эксперименте. Клетки первой части сушили при 70°C до постоянного веса. Количество сухой биомассы варьировало в пределах 17–23 мг в зависимости от условий культивирования. Из клеток второй части проводили экстракцию органических соединений 80% раствором этанола согласно (Bernard et al., 1993). Высушенные экстракты хранили при 5°C до проведения анализа.

Спектроскопия протонного магнитного резонанса. Для исследования этанольных экстрактов был ис-

пользован метод спектроскопии одномерного протонного магнитного резонанса (ЯМР ^1H). Спектры записывали на приборе Bruker Avance Neo 400 (“Bruker Corporation”, США), оснащенный 5-мм широкополосным датчиком ВВО с Z-градиентом и системой термостатирования образца с точностью установки температуры 0.1°C , при 30°C . При записи спектров ЯМР ^1H использовали 30-градусные импульсы, релаксационная задержка составляла 1 с, ширина окна была равна 5.9 кГц. Данные обрабатывали с помощью программного обеспечения Topspin, версия 4.0.8 (“Bruker Corporation”, США). Высушенный осадок этанольного экстракта растворяли в 0.5–1.0 мл D_2O (“ООО Астрахим”, Россия). Спектр предварительно записывали с 8 накоплениями, затем в пробу вносили 0.13–0.20 мг *трет*-бутилового спирта в качестве внутреннего стандарта и записывали спектр с 64 накоплениями, который использовали для количественных расчетов. Химические сдвиги (δ) указывали в миллионных долях (м.д.) и измеряли относительно сигнала метильных групп *трет*-бутилового спирта (1.24 м.д.). Растворы этанольных экстрактов клеток, выращенных в присутствии 6 и 8% NaCl , закисляли H_2SO_4 с целью изменения химических сдвигов сигналов глутамата и пролина и перемещения их в область, свободную от сигналов других соединений.

Предварительную идентификацию сигналов в спектре проводили путем сравнения со спектрами соединений из базы данных Biological Magnetic Resonance Data Bank (Hoch et al., 2023). Затем была создана библиотека спектров аланина, валина, трегалозы, глутамата, глутамина, пролина, сукцината и 5-оксопролин, к которым предварительно были отнесены сигналы в спектрах исследованных проб. 5-Оксопролин синтезировали путем нагрева глутамата при 180°C в течение 30 мин, в остальных случаях использовали соединения фирмы “Sigma” (Германия). Идентификацию соединений подтверждали путем последовательного добавления указанных эталонных веществ в исследуемые растворы в концентрации примерно равной или сравнимой с концентрацией, найденной в пробе, с последующей записью спектра. При росте соответствующего сигнала (группы сигналов) считали, что внесенное вещество присутствовало в пробе. Критерием пригодности пика для количественного расчета считали соотношение сигнал/шум >10 . Соответствующим пороговым значением в единицах количества вещества было значение примерно 0.1 мкмоль атомов водорода в группе, дающей сигнал, на образец (при 64 накоплениях).

Концентрацию вещества определяли путем сравнения площади его изолированного пика с площадью пика внутреннего стандарта (Nagata et al., 1996; Yamazaki et al., 2017; Калабин и соавт.,

2000). Далее проводили пересчет количеств веществ на 1 мг сухого веса биомассы (мг СБ).

Статистическая обработка. При статистической обработке данных определяли среднее арифметическое и стандартное отклонение трех независимых экспериментов, используя модуль Microsoft Office Excel 2003.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Накопление совместимых веществ клетками штамма *Glutamicibacter* sp. SMB32 при разных температурах. Температурный диапазон роста штамма SMB32 при выращивании в жидкой МСР с глюкозой в качестве единственного источника углерода и энергии находился в пределах $5\text{--}35^\circ\text{C}$ (табл. 1). Инкубирование исследованной бактериальной культуры при 5°C приводило к замедлению скорости роста. Самые низкие показатели роста были зафиксированы при 35°C , однако тренд на их снижение был отмечен при 32°C .

Для изучения влияния температуры на пул совместимых веществ клеток штамма были выбраны значения 5, 25 и 32°C , при которых максимальные показатели оптической плотности имели минимальные отличия, что позволило получить достаточное количество биомассы для применения с целью анализа этанольных экстрактов методом спектроскопии ЯМР ^1H . В спектре ЯМР ^1H этанольного экстракта клеток штамма SMB32, культивированных при 25°C , доминировали глутамат, маннит, аланин и валин (рис. 1в). В спектре ЯМР ^1H этанольного экстракта клеток, выросших при 32°C , помимо сигналов глутамата, маннита, аланина и валина преобладали сигналы трегалозы (рис. 1б). А в спектре ЯМР ^1H экстракта клеток, культивированных при низкой температуре, сигналы трегалозы превосходили сигналы других соединений (рис. 1а). Внутриклеточное количество трегалозы при температурах 5 и 32°C составляло 0.16 ± 0.01 и 0.036 ± 0.008 мкмоль/мг СБ соответственно, что значительно превышало показатели при 25°C (рис. 2). В настоящее время исследованы механизмы адаптации к неблагоприятному действию температур и недостатку воды представителей рода *Arthrobacter*, филогенетически близкородственного исследованному штамму. Показано, что штаммы этого рода накапливали в клетках трегалозу в ответ на действие низкотемпературных стрессов, а также в условиях засухи (Narváez-Reinaldo et al., 2010; Chen et al., 2011; Singh et al., 2016). Трегалоза сохраняет гидратную оболочку биомолекул, поддерживая структурную организацию мембран и конформацию белков, подавляет агрегацию денатурированных макромолекул, формирует водородные связи с молекулами воды, что влияет на их динамику, снижая их подвижность, и, тем самым, препятствует образо-

Таблица 1. Физиологическая характеристика штамма *Glutamicibacter* sp. SMB32

Условия культивирования			Параметры роста	
температура, °С	условия аэрации	NaCl, %	максимальное значение оптической плотности	максимальная удельная скорость роста, ч ⁻¹
0	Без перемешивания	Без соли	—	н.о.
5			1.04 ± 0.18	0.016 ± 0.001
25			1.10 ± 0.05	0.062 ± 0.002
32			1.08 ± 0.03	0.061 ± 0.001
35			0.17 ± 0.04	0.013 ± 0.005
37			—	н.о.
25	Перемешивание, 100 об./мин	Без соли	1.19 ± 0.06	0.158 ± 0.002
		5	1.18 ± 0.05	0.155 ± 0.002
		6	1.21 ± 0.07	0.117 ± 0.001
		8	1.25 ± 0.09	0.037 ± 0.009
		10	1.24 ± 0.13	0.024 ± 0.003
		11	0.12 ± 0.02	0.005 ± 0.001
		12	—	н.о.

Примечание. н.о. – не определяли. Отсутствие изменения оптической плотности МСР после 14 сут культивирования квалифицировали как отсутствие роста. Значение оптической плотности в начале эксперимента было равно 0.076 ± 0.015. Приведены средние значения и стандартные отклонения.

ванию кристаллов льда при низких температурах или утрате воды клеткой в условиях засухи (Kumar, Roy, 2009). Примечательно, что внутриклеточный пул этого дисахарида возрастал при значении температуры 32°С, при котором параметры роста исследованного штамма незначительно отличались от наблюдаемых при 25°С. Полученные данные согласуются с ранее опубликованными о том, что клетки бактерий могут испытывать тепловой стресс при температуре, соответствующей верхней границе оптимума роста (Cavicchioli, 2016).

Принимая во внимание вышесказанное, можно сделать вывод, что увеличение количества трегалозы при 5 и 32°С указывает на адаптацию клеток *Glutamicibacter* sp. SMB32 к действию этих температур, в то время как температура 25°С являлась оптимальной для роста.

Влияние условий аэрации на состав совместимых веществ клеток штамма *Glutamicibacter* sp. SMB32. Исследование влияния аэрации среды на состав совместимых веществ клеток штамма SMB32 проводили, выращивая бактериальную культуру при разных режимах – как без перемешивания

среды культивирования, так и при ее перемешивании с разной скоростью, вследствие чего увеличивается абсорбция кислорода и возрастает его концентрация в среде (Wise, 1951). При 25°С без перемешивания среды культивирования было зафиксировано замедление скорости роста *Glutamicibacter* sp. SMB32 (табл. 1). В этих условиях культивирования клетки накапливали маннит (рис. 3), а также в 2.2 раза возрастало внутриклеточное количество сукцината и таких аминокислот как аланин и валин в 1.9 и 6.7 раз соответственно (рис. 4). Известно, что внутриклеточный уровень аланина, валина и сукцината у бактерий повышается в условиях кислородного голодания (Hasegawa et al., 2012; Yasid et al., 2016; Jeong et al., 2018).

Поскольку маннит преобладал в пуле совместимых веществ клеток штамма SMB32, выросших при 32°С (рис. 16), было проведено изучение влияния условий аэрации на его синтез при этой температуре. Установлено, что маннит присутствовал в пуле водорастворимых соединений клеток *Glutamicibacter* sp. SMB32, выросших как без переме-

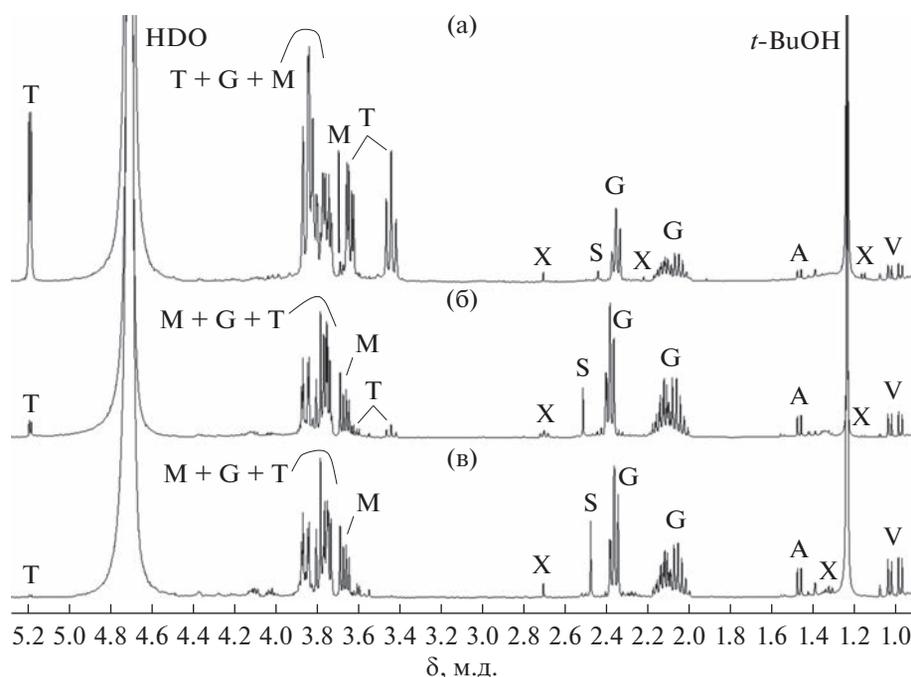


Рис. 1. Спектры ЯМР ^1H этанольных экстрактов из клеток *Glutamicibacter* sp. SMB32, выросших при 5°C (а), 32°C (б) и 25°C (в) в МСР с глюкозой без перемешивания среды культивирования. Условные обозначения: аланин (А); валин (V); глутамат (G); сукцинат (S); трегалоза (Т); маннит (М); неидентифицированные соединения (X); монодейтериевая вода (HDO); *tert*-бутиловый спирт (*t*-BuOH). Количество сухой биомассы (мг) в пробах составляло: 5°C – 17; 32°C – 19; 25°C – 19.

шивания среды, так и при ее перемешивании со скоростью 100 об./мин (рис. 1, 3). Поскольку с возрастанием температуры понижается растворимость кислорода, а для компенсации этого фактора следует увеличить частоту оборотов качалки (Zhou et al., 2018), в схему эксперимента был добавлен вариант перемешивания среды культивирования со скоростью 200 об./мин. В этих условиях клетки исследованного штамма не накапливали маннит (рис. 3). При этом они не утрачивали способность аккумулировать трегалозу (рис. 3).

Таким образом, показано, что состав совместимых веществ клеток *Glutamicibacter* sp. SMB32 зависит от режима аэрации среды культивирования. Так, накопление маннита в клетках штамма SMB32 не являлось следствием адаптации к неблагоприятной температуре, а, по-видимому, было обусловлено недостатком растворенного в среде кислорода. Тогда как аккумуляцию этого многоатомного спирта в клетках штамма *Arthro bacter agilis* L77 исследователи связывали с криопротекцией (Singh et al., 2016).

Идентификация осмолитов, накапливаемых клетками *Glutamicibacter* sp. SMB32. Учитывая влияние режима аэрации на метаболизм клеток, изучение роста штамма SMB32 при разной солёности проводили в условиях перемешивания среды культивирования со скоростью 100 об./мин при оптимальной температуре (25°C). Штамм SMB32

рос в МСР, используя глюкозу в качестве единственного источника углерода и энергии, как в присутствии до 11% NaCl, так и в отсутствие соли (табл. 1). Увеличение солёности среды культивирования до 10% NaCl приводило к замедлению скорости роста, но не оказывало влияния на максимальное значение оптической плотности клеточной суспензии (табл. 1). При последующем возрастании концентрации хлорида натрия до 11% было отмечено значительное снижение параметров роста исследованного штамма (табл. 1). Принимая во внимание влияние солёности среды на кинетику роста, выращивание штамма SMB32 для изучения совместимых веществ клеток проводили при концентрации хлорида натрия ниже 10%.

В клетках штамма SMB32, выращенных без внесения хлорида натрия, преобладали сигналы, которые были отнесены к глутамату (рис. 5а). Повышение солёности среды приводило к качественному изменению пула совместимых веществ клетки. Помимо сигналов глутамата в спектре ЯМР ^1H экстрактов клеток, культивированных при 8% NaCl, преобладали сигналы пролина, глутамина и трегалозы (рис. 5б, 5в). В экстрактах присутствовал 5-оксипролин, который является продуктом спонтанной циклизации глутамина (Tritsch, Moore, 1962). С повышением концентрации хлорида натрия в среде культивирования в клетках штам-

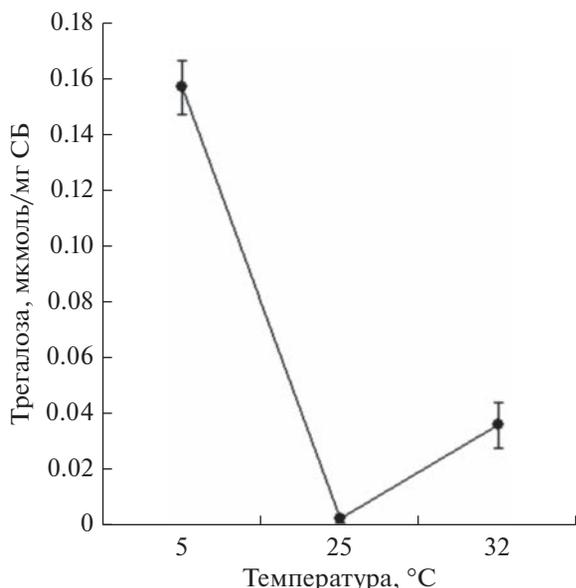


Рис. 2. Накопление трегалозы клетками *Glutamicibacter* sp. SMB32 в зависимости от температуры. Культивирование штамма осуществляли в МСР с глюкозой при 5, 25 и 32°C без перемешивания. Количество трегалозы в этанольных экстрактах из клеток, выращенных при 25°C, было на уровне предела обнаружения, составляющего 10 мкг/пробу.

ма SMB32 возрастало количество пролина, при 8% NaCl оно достигало значения 0.90 ± 0.04 мкмоль/мг СБ (рис. 6).

В настоящее время информация об осмолитах бактерий рода *Glutamicibacter* крайне скудна и освещает, в основном, изменение пула эктоина (Назаров и соавт., 2022), но в клетках *Glutamicibacter* sp. SMB32 методом ЯМР ^1H это соединение не было обнаружено. Между тем, в клетках штамма SMB32 с возрастанием солёности среды увеличивалось количество другого гетероциклического соединения – пролина (рис. 6). Больше информации опубликовано для представителей филогенетически близкородственного исследованному штамму рода *Arthrobacter* (*Arthrobacter globiformis*). В клетках штаммов *A. globiformis* при повышении солёности среды также увеличивался уровень низкомолекулярных углеводов, преимущественно трегалозы (Zevenhuizen, 1992), но в пуле свободных аминокислот клетки преобладал глутамат, о накоплении пролина и глутамина не сообщалось (Комарова и соавт., 2002). Однако способность актинобактерий к аккумуляции пролина в ответ на высокое осмотическое давление среды культивирования была выявлена ранее на примере штаммов рода *Corynebacterium* (Матвеева и соавт., 1997). Необходимо заметить, что штаммы *A. globiformis* выдерживали присутствие хлорида натрия в концентрации до 5% (Busse et al., 2012). В то время как *Glutamicibacter* sp. SMB32, в клетках которого на-

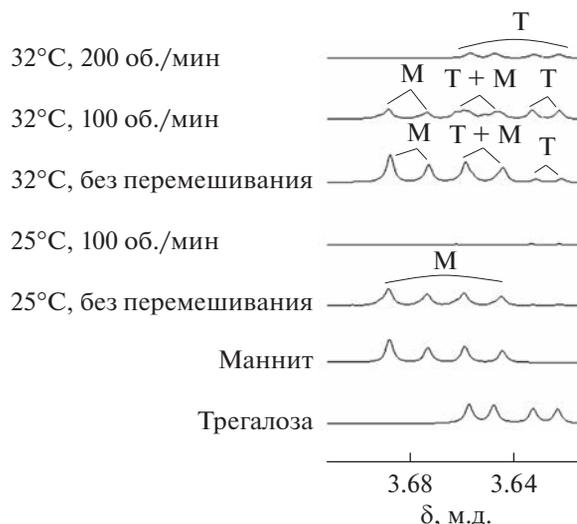


Рис. 3. Участки спектров ЯМР ^1H маннита, трегалозы и этанольных экстрактов из клеток *Glutamicibacter* sp. SMB32, выращенных при 25 или 32°C как без перемешивания, так и при перемешивании среды культивирования. Культивирование штамма осуществляли в МСР с глюкозой. Условные обозначения: М – маннит; Т – трегалоза; 25 или 32°C – температура культивирования; 100 или 200 об./мин – частота оборотов перемешивающего устройства в эксперименте; без перемешивания – эксперимент выполняли без перемешивания среды культивирования.

капливался пролин, был способен к росту в присутствии 11% NaCl (табл. 1). Подобная закономерность была описана для представителей другого класса бактерий (Brill et al., 2011). Причины этого могут раскрыть современные исследования

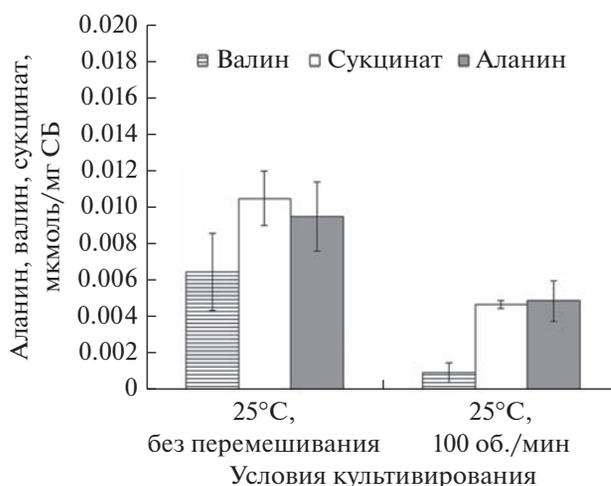


Рис. 4. Накопление клетками штамма *Glutamicibacter* sp. SMB32 аланина, валина и сукцината при разных условиях аэрации среды культивирования. Культивирование штамма осуществляли в МСР с глюкозой при 25°C без перемешивания среды культивирования и с перемешиванием со скоростью 100 об./мин.

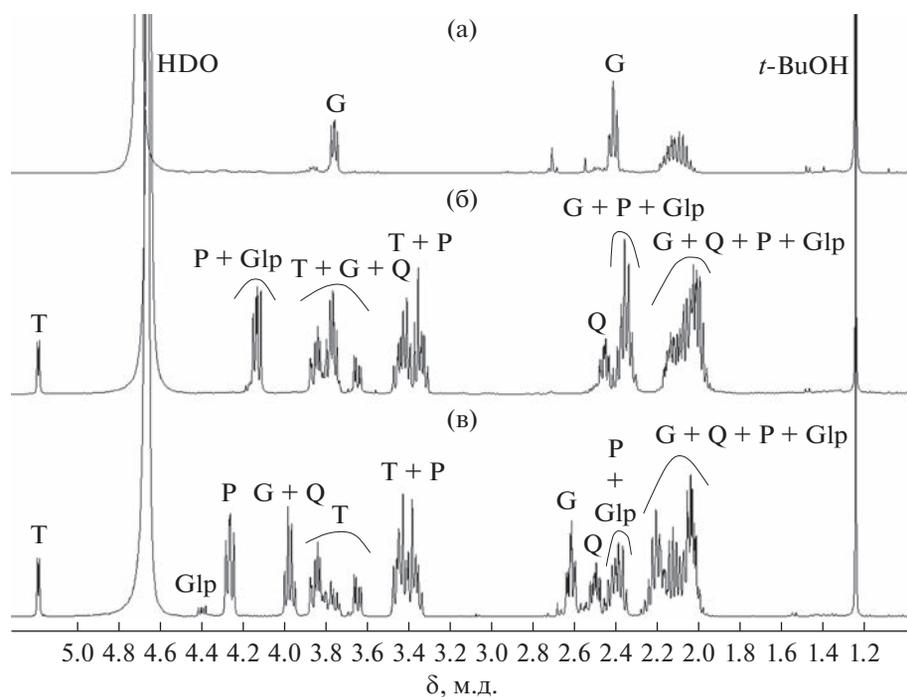


Рис. 5. Спектры ЯМР ^1H этанольных экстрактов из клеток *Glutamicibacter* sp. SMB32, выросших в присутствии 8% NaCl (б, в) и без NaCl (а). Культивирование штамма осуществляли в МСР с глюкозой при 25°C со скоростью перемешивания 100 об./мин. Этанольный экстракт из клеток штамма *Glutamicibacter* sp. SMB32, выросших в среде с 8% NaCl, был закислен серной кислотой (в). Условные обозначения: глутамат (G), глутамин (Q), пролин (P), 5-оксипролин (Glp), трегалоза (T), монодейтериевая вода (HDO), *трет*-бутиловый спирт (*t*-BuOH). Количество сухой биомассы в пробах составляло: без соли – 21 мг; 8% NaCl – 23 мг.

физико-химических свойств растворов глутамата и пролина. В растворах глутамата при концентрации, превышающей 0.3 М, взаимодействие глутамата с молекулами воды ослабевало, а в 0.7 М растворе количество прочно связанных молекул H_2O на эквивалент глутамата (Z_{ib}) снижалось с 5 (при концентрациях, стремящихся к 0) до нуля (Friesen et al., 2021). В растворах пролина изменение этого параметра происходило медленнее и достигало нуля при 3 М (Dmitrieva et al., 2017). Поскольку внутриклеточная концентрация совместимых веществ может превосходить 1 М (Galinski, 1993), из-за особенностей взаимодействия с молекулами воды глутамат является менее предпочтительным осмолитом для защиты от гиперосмотического стресса. Пролин, напротив, может накапливаться до высоких внутриклеточных концентраций, сохраняя способность проявлять сильные взаимодействия с молекулами воды. Последнее в условиях высокой осмолярности среды культивирования может стать решающим фактором для достижения осмотического равновесия, обеспечения стабильности ферментов и других компонентов клетки.

Бактерии рода *Glutamicibacter* (ранее группа “*Arthrobacter nicotianae*”) широко распространены в природе, а среды их обитания крайне разнообразны

и значительно отличаются физико-химическими параметрами (Wang et al., 2015; Busse, 2016). Даже в пределах одного биотопа, например, почвы, могут наблюдаться флуктуации величин абиотических факторов, таких как концентрация кислорода, соленость, а в верхних слоях вероятны

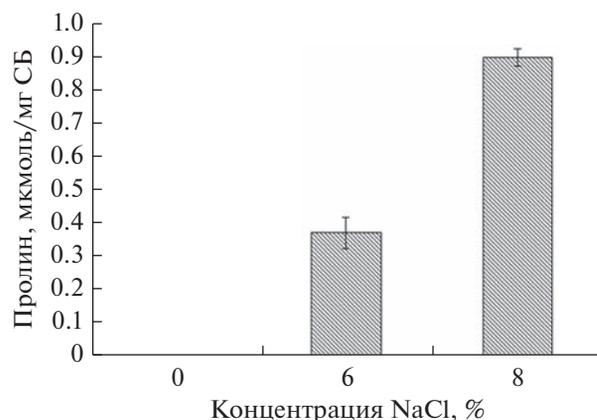


Рис. 6. Накопление клетками штамма *Glutamicibacter* sp. SMB32 пролина в зависимости от концентрации NaCl в среде культивирования. Культивирование штамма осуществляли в МСР с глюкозой при 25°C со скоростью перемешивания 100 об./мин.

колебания температуры. Для адаптации к условиям, отклоняющимся от оптимальных, бактерии накапливают внутри клетки совместимые вещества (Galinski, 1993). В представленной работе показано, что клетки штамма *Glutamicibacter* sp. SMB32 адаптировались к температурам 5 и 32°C, накапливая соединения с многочисленными гидроксильными группами – трегалозу (рис. 1, 2). В условиях высокой солености среды помимо трегалозы клетки накапливали низкомолекулярные азотистые соединения, в том числе пролин (рис. 5, 6). Установлено влияние аэрации среды на состав совместимых веществ клеток бактерий рода *Glutamicibacter* (рис. 3, 4). На примере штамма SMB32 впервые показана способность бактерий рода *Glutamicibacter* к синтезу маннита, и продемонстрирована зависимость его аккумуляции от режима аэрации (рис. 3).

Таким образом, на примере штамма *Glutamicibacter* sp. SMB32 впервые изучен спектр совместимых веществ, накапливающихся в клетках бактерий рода *Glutamicibacter* в ответ на действие абиотических факторов среды. Показано, что *Glutamicibacter* sp. SMB32 обладает высокой пластичностью метаболизма, проявляя способность адаптироваться к неблагоприятному действию разных физико-химических факторов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Настоящее исследование выполнено в рамках государственного задания АААА-А19-119112290008-4.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Василец Е.А. Условия промерзания почвы в Пермском крае // Географическое изучение территориальных систем: Сборник материалов XV Всероссийской научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых. Пермь, 11–12 мая 2021 г. / Под ред. Сафарьяна А.А.. Пермь: Перм. гос. нац. исслед. ун-т, 2021. С. 153–157.

Калабин Г.А., Каницкая Л.В., Кушнарев Д.Ф. Количественная спектроскопия ЯМР природного органического сырья и продуктов его переработки. М.: Химия, 2000. 408 с.

Комарова Т.И., Коронелли Т.В., Тимохина Е.А. Роль низкомолекулярных азотистых соединений в осмотолерантности бактерий родов *Rhodococcus* и *Arthrobacter* // Микробиология. 2002. Т. 71. С. 166–170.

Komarova. T.I., Koronelli T.V., Timokhina E.A. The role of low-molecular-weight nitrogen compounds in the osmotolerance of *Rhodococcus erythropolis* and *Arthrobacter globiformis* // Microbiology (Moscow). 2002. V. 71. P. 139–142.

Матвеева Н.И., Воронина Н.А., Борзенков И.А., Плакунов В.К., Беляев С.С. Состав и количественное содержание осмопротекторов в клетках нефтеокисляющих бактерий при разных условиях культивирования // Микробиология. 1997. Т. 66. С. 23–27.

Matveeva N.I., Voronina N.A., Borzenkov I.A., Plakunov V.K., Belyaev S.S. Composition and content of osmoprotectants in oil-oxidizing bacteria grown under different cultivation conditions // Microbiology (Moscow). 1997. V. 66. P. 32–37.

Назаров А.В., Ананьина Л.Н., Горбунов А.А., Пьянкова А.А. Бактерии-продуценты эктоина ризосферы растений, произрастающих на техногенной засоленной почве // Почвоведение. 2022. № 8. С. 1000–1008.

Nazarov A.V., Anan'ina L.N., Gorbunov A.A., Pyankova A.A. Bacteria producing ectoine in the rhizosphere of plants growing on technogenic saline soil // Euras. Soil Sci. 2022. V. 55. № 8. P. 1074–1081.

Ястребова О.В., Малышева А.А., Плотникова Е.Г. Галотолерантные бактерии рода *Glutamicibacter* – деструкторы терефталевой кислоты // Прикл. биохимия и микробиология. 2022. Т. 58. С. 476–483.

Yastrebova O.V., Malysheva A.A., Plotnikova E.G. Halotolerant terephthalic acid-degrading bacteria of the genus *Glutamicibacter* // Appl. Biochem. Microbiol. 2022. V. 58. P. 590–597.

Anan'ina L.N., Kosheleva I.A., Plotnikova E.G. Bacterial consortium as a model for studying the response of the microbial community of the Verkhnekamsk salt mining region to combined pollution // Теоретическая и прикладная экология. 2022. № 2. С. 116–123.

Bernard T., Jebbar M., Rassouli Y., Himdi-Kabbab S., Hamelin J., Blanco C. Ectoine accumulation and osmotic regulation in *Brevibacterium linens* // J. Gen. Microbiol. 1993. V. 139. P. 129–136.

Brill J., Hoffmann T., Bleisteiner M., Bremer E. Osmotically controlled synthesis of the compatible solute proline is critical for cellular defense of *Bacillus subtilis* against high osmolarity // J. Bacteriol. 2011. V. 193. P. 5335–5346.

Busse H.-J. Review of the taxonomy of the genus *Arthrobacter*, emendation of the genus *Arthrobacter sensu lato*, proposal to reclassify selected species of the genus *Arthrobacter* in the novel genera *Glutamicibacter* gen. nov., *Paeniglutamicibacter* gen. nov., *Pseudoglutamicibacter* gen. nov., *Paenarthrobacter* gen. nov. and *Pseudarthrobacter* gen. nov., and emended description of *Arthrobacter roseus* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2016. V. 66. P. 9–37.

Busse H.-J., Wieser M., Buczolits S. // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria / John Wiley & Sons, Inc., in association with Bergey's Manual Trust, 2012. Genus *Arthrobacter*. P. 1–71. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00118>

Cavicchioli R. On the concept of a psychrophile // ISME J. 2016. V. 10. P. 793–795.

Chen X.-M., Jiang Y., Li Y.-T., Zhang H.-H., Li J., Chen X., Zhao Q., Zhao J., Si J., Lin Z.-W., Zhang H., Dyson P., An L.-Z. Regulation of expression of trehalose-6-phosphate

- synthase during cold shock in *Arthrobacter* strain A3 // *Extremophiles*. 2011. V. 15. P. 499–508.
- Dmitrieva O.A., Fedotova M.V., Buchner R. Evidence for cooperative Na⁺ and Cl⁻ binding by strongly hydrated L-proline // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2017. V. 19. P. 20474–20483.
- Feng W.-W., Wang T.-T., Bai J.-L., Ding P., Xing K., Jiang J.-H., Peng X., Qin S. *Glutamicibacter halophytocola* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from the roots of a coastal halophyte, *Limonium sinense* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2017. V. 67. P. 1120–1125.
- Friesen S., Fedotova M.V., Kruchinin S.E., Buchner R. Hydration and dynamics of l-glutamate ion in aqueous solution // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2021. V. 23. P. 1590–1600.
- Galinski E.A. Compatible solutes of halophilic eubacteria: molecular principles, water-solute interaction, stress protection // *Experientia*. 1993. V. 49. P. 487–496.
- Gerhardt P. *Manual of Methods for General Bacteriology*. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1981. 524 c.
- Hasegawa S., Uematsu K., Natsuma Y., Suda M., Hiraga K., Jojima T., Inui M., Yukawa H. Improvement of the redox balance increases L-valine production by *Corynebacterium glutamicum* under oxygen deprivation conditions // *Appl. Environ. Microbiol.* 2012. V. 78. P. 865e875.
- Hoch J.C., Baskaran K., Burr H., Chin J., Eghbalnia H.R., Fujiwara T., Gryk M.R., Iwata T., Kojima C., Kurisu G., Mazziuk D., Miyanoiri Y., Wedell J.R., Wilburn C., Yao H., Yokochi M. Biological magnetic resonance data bank // *Nucleic Acids Res.* 2023. V. 51. D1. P. D368–D376.
- Jeong J.-A., Park S.W., Yoon D., Kim S., Kang H.-Y., Oh J.-I. Roles of alanine dehydrogenase and induction of its gene in *Mycobacterium smegmatis* under respiration-inhibitory conditions // *J. Bacteriol.* 2018. V. 200. P. e00152-18.
- Kumar N., Roy J.I. Effect of trehalose on protein structure // *Protein Sci.* 2009. V. 18. P. 24–36.
- Nagata S., Adachi K., Sano H. NMR analyses of compatible solutes in a halotolerant *Brevibacterium* sp. // *Microbiology (SGM)*. 1996. V. 142. P. 3355–3362.
- Narváez-Reinaldo J.J., Barba I., González-López J., Tunnacliffe A., Manzanera M. Rapid method for isolation of desiccation-tolerant strains and xeroprotectants // *Appl. Environ. Microbiol.* 2010. V. 76. P. 5254–5262.
- Nishu S.D., Hyun H.R., Lee T.K. Complete genome sequence of drought tolerant plant growth-promoting rhizobacterium *Glutamicibacter halophytocola* DR408 // *Korean J. Microbiol.* 2019. V. 55. P. 300–302.
- Qin S., Feng W.-W., Zhang Y.-J., Wang T.-T., Xiong Y.-W., Xing K. Diversity of bacterial microbiota of coastal halophyte *Limonium sinense* and amelioration of salinity stress damage by symbiotic plant growth-promoting actinobacterium *Glutamicibacter halophytocola* KLBMP 5180 // *Appl. Environ. Microbiol.* 2018. V. 84. P. e01533–18.
- Raymond R.L. Microbial oxidation of n-paraffinic hydrocarbons // *Develop. Ind. Microbiol.* 1961. V. 2. P. 23–32.
- Santos R.G., Hurtado R., Gomes L.G.R., Profeta R., Rificie C., Attilif A.R., Spier S.J., Mazzullo G., Morais-Rodrigues F., Gomide A.C.P., Brenig B., Gala-Garcia A., Cuteri V., de Paula Castro T.L., Ghosh P., Seyffert N., Azevedo V. Complete genome analysis of *Glutamicibacter creatinolyticus* from mare abscess and comparative genomics provide insight of diversity and adaptation for *Glutamicibacter* // *Gene*. 2020. V. 741. P. 144566.
- Singh R.N., Gaba S., Yadav A.N., Gaur P., Gulati S., Kaushik R., Saxena A.K. First high quality draft genome sequence of a plant growth promoting and cold active enzyme producing psychrotrophic *Arthrobacter agilis* strain L77 // *Stand. Genomic Sci.* 2016. V. 11. P. 54.
- Tritsch G.L., Moore G.E. Spontaneous decomposition of glutamine in cell culture media // *Exp. Cell Res.* 1962. V. 28. P. 360–364.
- Wang H.-F., Li L., Zhang Y.-G., Hozzein W.N. *Arthrobacter endophyticus* sp. nov., an endophytic actinobacterium isolated from root of *Salsola affinis* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2015. V. 65. P. 2154–2160.
- Wise W.S. The measurement of the aeration of culture media // *J. Gen. Microbiol.* 1951. V. 5. P. 167–177.
- Yamazaki T., Eyama S., Takatsu A. Concentration measurement of amino acid in aqueous solution by quantitative ¹H NMR spectroscopy with internal standard method // *Anal. Sci.* 2017. V. 33. P. 369–373.
- Yasid N.A., Rolfé M.D., Green J., Williamson M.P. Homeostasis of metabolites in *Escherichia coli* on transition from anaerobic to aerobic conditions and the transient secretion of pyruvate // *Royal Soc. Open Sci.* 2016. V. 3. P. rsos.160187.
- Zevenhuizen L.P. Levels of trehalose and glycogen in *Arthrobacter globiformis* under conditions of nutrient starvation and osmotic stress // *Antonie van Leeuwenhoek*. 1992. V. 61. P. 61–68.
- Zhou Y., Han L.-R., He H.-W., Sang B., Yu D.-L., Feng J.-T., Zhang X. Effects of agitation, aeration and temperature on production of a novel glycoprotein GP-1 by *Streptomyces kanasensis* ZX01 and scale-up based on volumetric oxygen transfer coefficient // *Molecules*. 2018. V. 23. P. 125.

Compatible Solute Accumulated by *Glutamicibacter* sp. Strain SMB32 in Response to Abiotic Environmental Factors

L. N. Anan'ina¹*, A. A. Gorbunov², E. A. Shestakova¹, A. A. Pyankova¹, and E. G. Plotnikova¹

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

² Institute of Technical Chemistry, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, 614013 Russia

*e-mail: ludaananyina@mail.ru

Received March 30, 2023; revised May 26, 2023; accepted May 30, 2023

Abstract—Proton magnetic resonance spectroscopy was used for investigation of the pool of compatible solutes accumulated in the cells of *Glutamicibacter* sp. strain SMB32 in response to abiotic environmental fac-

tors. The original habitat of the strain was anthropogenically salinated soil at the Verkhnekamsk deposit of potassium and magnesium salts (Perm krai, Russia). The strain grew within the temperature range from 5 to 35°C. At 5 and 32°C, the intracellular content of trehalose in the cells of *Glutamicibacter* sp. SMB32 was significantly higher than at 25°C. *Glutamicibacter* sp. SMB32 was able to grow both in the absence of NaCl and at its concentrations up to 11%. Glutamate predominated in the cells growth without NaCl. At high salinity (8% NaCl), predominant compounds in the studied strain cells were trehalose, proline, glutamine, and glutamate. Increasing salinity of the growth medium resulted in higher levels of intracellular proline. This is the first report of ability of a *Glutamicibacter* strain to synthesize mannitol; its accumulation was found to depend on the aeration mode. Thus, *Glutamicibacter* sp. strain SMB32 possesses high metabolic plasticity and is able to adapt to the action of unfavorable physicochemical factors.

Keywords: *Glutamicibacter*, compatible solutes, NMR, temperature, salinity, aeration

АДАПТАЦИОННЫЕ СВОЙСТВА ИЗОЛЯТА *ARTHROBACTER AGILIS* wb28 ИЗ ПШЕНИЧНЫХ ОТРУБЕЙ

© 2023 г. Н. Ю. Шарова^а, *, А. О. Причеп^а, О. П. Свердлова^а, А. А. Принцева^а

^аВсероссийский научно-исследовательский институт пищевых добавок – филиал Федерального научного центра пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН, Санкт-Петербург, 191014 Россия

*e-mail: natalya_sharova1@mail.ru

Поступила в редакцию 14.11.2022 г.

После доработки 01.03.2023 г.

Принята к публикации 02.03.2023 г.

В статье представлены результаты исследования некоторых адаптационных свойств бактериально-го изолята из пшеничных отрубей кормового и пищевого назначения, идентифицированного по гену 16S рРНК как *Arthrobacter agilis*. Культура *A. agilis*, по литературным данным, не относится к доминантным бактериальным видам микробных ассоциаций пшеницы и активизирует рост при низких температурах окружающей среды. Исследуемый изолят *A. agilis* проявил единственный рост в микробном консорциуме при высеве водной суспензии пшеничных отрубей, частично разрушенных при $28 \pm 1^\circ\text{C}$ под действием аборигенной микробиоты, на плотную питательную среду МПА и после трехнедельного хранения при температуре от $4 \pm 1^\circ\text{C}$ пигментировал. Умеренный рост бактерии без усиления пигментации визуализирован при последующем ее пересеве после низкотемпературного хранения на агаризованные среды, в состав которых входят более доступные по сравнению с нативными отрубями углеводные и азотсодержащие субстраты, минеральные соли, витамины. Количество колоний при высеве культуры на такие среды увеличивалось в ряду: термически разрушенные пшеничные отруби → ГМФ-агар → LB (без соли). Выявлено, что нехарактерная для микрофлоры пшеничных отрубей культура *A. agilis* при воздействии осмотического и температурного шока, как на плотной агаризованной среде, так и в культуральной жидкости, пигментирует при резком изменении концентрации хлористого натрия и/или перепаде температур окружающей среды. Синтезируемый пигмент, в результате проведенного спектрального анализа, отнесен к каротиноидам и предварительно идентифицирован как бактериоруберин. Количественная оценка показала, что в стрессовых условиях при глубинном культивировании исследуемый штамм *A. agilis* wb28 способен синтезировать пигмент на уровне 52.8 мг/л (17.2 мг/г биомассы).

Ключевые слова: пшеничные отруби, *Arthrobacter agilis* wb28, осмотический шок, холодовой шок, бактериоруберин, пигмент

DOI: 10.31857/S0026365622600766, **EDN:** AMRGHT

Бактерии рода *Arthrobacter* обнаружены в различных точках мира и типичны для почвы и ризосферы. Данный род, согласно результатам исследований гомологии ДНК представителей *Arthrobacter* и работ по каталогизации 16S рРНК, делится на две физиологические группы: группа *A. globiformis* и группа *A. nicotianae* (Jones, Keddie, 2006). В настоящее время известно, что род *Arthrobacter* включает виды со значительной фенотипической изменчивостью по составу хинонов, пептидогликана, сахаров в клеточной стенке и, в меньшей степени, полярных липидов (Bergey's Manual..., 2015). Во многих случаях объединение в группы, основанное на общих определенных хемотаксономических признаках, хорошо подтверждаются сравнительным анализом последовательностей генов 16S рРНК, и сходства большинства внутригрупповых последовательностей генов 16S рРНК превышают 96.0%.

Эти результаты предполагают возможность разделения рода *Arthrobacter* на несколько родоподобных групп. На основании филогении, сходства последовательностей генов 16S рРНК, состава пептидогликана и/или систем хинонов можно определить следующие родоподобные группы: группы *Arthrobacter globiformis*, *Arthrobacter aurescens*, *Arthrobacter oxydans*, *Arthrobacter protoformiae*, *Arthrobacter ulfereus*, *Arthrobacter citreus*, *Arthrobacter psychrolactophilus*, *Arthrobacter pigmenti*, *Arthrobacter albus/cumminsii*, *Synomonas* и *Arthrobacter agilis*. В группу “группа *Arthrobacter agilis*” входят следующие представители: *A. agilis*, *A. flavus*, *A. parietis*, *A. subterraneus*, *A. tecti*, *A. tumbae* (Bergey's Manual..., 2015).

Исследованные представители *Arthrobacter* способны обитать в экстремальных условиях. Например, присутствие *Arthrobacter cheniae* и *Arthrobacter*

frigidicola выявлено в ледниках (Yang et al., 2021), *Arthrobacter psychrophenicus* выделен из льда альпийской пещеры (Margesin et al., 2004). Некоторые представители выявлены в иных климатических условиях: *Arthrobacter mobilis* в пустыне Чолистан (Ye et al., 2020), *Arthrobacter deserti* – в пустыне Турфан (Hu et al., 2016). Такие специфические условия роста обусловлены различными защитными механизмами, например, адаптированность к холоду α -амилазы у *A. agilis* (Kim et al., 2017), пигментирование желтым или розовым цветом у различных представителей рода *Arthrobacter* (Reddy et al., 2002; Zhang et al., 2010; Kumar et al., 2016; Afra et al., 2017). Наличие каротинов способно защищать организм от УФ-излучения, так как они улавливают свободные радикалы. Красная окраска *A. agilis* обусловлена смесью различных веществ, основным из которых является бактериоруберин и его производные (Silva et al., 2019). Данное химическое соединение является объектом исследований, так как имеет потенциал в фармацевтической отрасли как средство с противоопухолевым воздействием на раковые клетки пищевода, кроме того, оно не цитотоксично для обычных клеток. Бактериоруберин обладает также антиоксидантной активностью, которая превышает уровень β -каротина и α -токоферола (Afra et al., 2017). Известно о противомикробных свойствах экстрактов галофильных архей, содержащих в значительном количестве бактериоруберин (Sahli et al., 2021). Пигментация защищает *A. agilis* не только от УФ-излучения, но и необходима для повышения текучести мембран в условиях осмотического стресса, вызванного NaCl, и для возможности существовать при низких температурах до 10°C (Flegler, Lipski, 2022a, 2022b). Имеются данные о том, что рост *A. agilis* при низких температурах сопровождается повышением содержания пигмента в клетках, а в присутствии в среде соли – его понижением (Fong et al., 2001).

Целью данной работы было исследование влияния резкого осмотического и холодового шока на содержание общего пигмента в клетках штамма *Arthrobacter agilis* wb 28, выделенного из пшеничных отрубей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования. В работе использованы: пшеничные отруби (АО “Петербургский мельничный комбинат”, г. Санкт-Петербург) с влажностью от 8–10%; растительно-микробная биомасса, полученная в результате деструкции пшеничных отрубей под действием собственной микробиоты; штамм *Arthrobacter agilis* wb28 (грамположительная аэробная бактерия семейства *Micrococcaceae*), выделенный из партии пшеничных отрубей, отобранной в городской черте г. Гатчина Ленинградской области в феврале 2021 г.

Ферментация сырья. Влажность пшеничных диетических отрубей определяли путем высушивания в течение 6 ч в сушильном шкафу Memmert UF110plus с принудительной конвекцией (“Mettmert”, Германия) при температуре 105°C и расчетом по формуле:

$$\omega = \frac{m_1 - m_2}{m_1} \times 100, \quad (1)$$

где ω – влажность пшеничных отрубей, %;

m_1 – масса пшеничных отрубей до высушивания, г;

m_2 – масса пшеничных отрубей после высушивания, г;

100 – пересчет на 100 г пшеничных отрубей до высушивания.

Растительно-микробную биомассу получали путем ферментации пшеничных отрубей (гидромодуль 1 : 6) под действием собственной микробиоты глубинным способом в течение 7 сут при температуре $32 \pm 2^\circ\text{C}$, интенсивности аэрации $0.6\text{--}1.0 \text{ дм}^3/(\text{дм}^3 \text{ мин})$ в шейкере-инкубаторе Multitron (“Infors”, Швейцария). С соответствующей периодичностью отбирали ферментированные отруби; из полученной растительно-микробной биомассы в ламинарном боксе биологической безопасности Esco SC2 (“Esco”, Сингапур) проводили высев микроорганизмов на плотную среду на основе питательного агара для культивирования микроорганизмов ГМФ-агар (“ООО НИЦФ”, Россия), используемую для выращивания хемоорганотрофных бактерий и содержащую (г/л): ГМФ-основу (мясо-пептонный бульон и пептон) – 15, агар микробиологический – 15, NaCl – 15, дистиллированная вода – до 1 л; pH 6.8–7.2.

Идентификация изолятов. Выращивание микроорганизмов и последующее выделение микробных изолятов осуществляли при культивировании клеток в стационарном режиме в течение 3–7 сут при температуре $37 \pm 2^\circ\text{C}$ в инкубаторе IN75 plus (“Mettmert”, Германия). Из изолятов выделяли ДНК; использовали набор реактивов QI Aamp DNA Mini Kit (“Qiagen”, Германия). Видовую принадлежность изолятов определяли с помощью амплификации и секвенирования гена 16S рРНК, на генетическом анализаторе ABI PRISM 3500xl (“Applied Biosystems”, США) с использованием пар универсальных праймеров: 5'GCCGGAGGTCATTGCTAGTGGAGTC3' и 5'AGGAGGTGATCCAGCCGACAGATTCC3' (Hezayen et al., 2002), fD1 5'AGAGTTTGGATCCTGGCTCAG3' и rD1 5'CTTAAGGAGGTGATCCAGCC3' (Weisburg et al., 1991).

ПЦР выполняли в течение 30 циклов: денатурация 30 с при 95°C, отжиг в течение 1 мин при 40°C и полимеризация в течение 2 мин при 72°C. Продукты ПЦР (~1540 п.н.) разделяли электрофорезом в агарозном геле и извлекали с помощью

набора Nucleo Trap (“Macherey-Nagel”, Германия). Использовали генетический анализатор ABI PRISM 3500 × 1 (“Applied Biosystems”, США).

Поиск гомологичных последовательностей проводили с помощью базы данных NCBI GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) и программы BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Для конструирования филогенетических деревьев использовали программу MEGAX и метод Neighbor-Joining (Tamura et al., 2011). Идентифицированные микроорганизмы помещали на хранение в вертикальный морозильник Premium U410 (“New Brunswick Scientific, Co., Inc.”, США).

Выращивание изолята *A. agilis* и контроль накопления биомассы. Культуру выращивали при температуре $28 \pm 1^\circ\text{C}$ на плотной среде Lysogeny Broth (LB) в чашках Петри и в жидкой модифицированной среде LB (объем 200 мл) в качалочных колбах вместимостью 750 мл в шейкере-инкубаторе Multitron (“Infors”, Швейцария) при скорости вращения платформы 180 об./мин. Состав среды LB (г/л): триптон – 20 (“WVR Chemicals, LLC”, США), дрожжевой экстракт – 10 (“Bio Springer”, Франция), NaCl (“Михайловский завод химических реактивов”, Россия) – 20 (для плотной среды) и от 20 до 100 (для жидкой среды), агар-агар – 10 (для плотной среды), дистиллированная вода до 1 л; pH 7.5 (Zalazar, 2018).

Для определения абсолютно сухой биомассы в 4 предварительно взвешенные пробирки Eppendorf (“Eppendorf”, Германия) отбирали по 1 мл жидкой культуры и центрифугировали, сливали супернатант и высушивали осадок в течение 6 ч в сушильном шкафу Memmert UF110plus с принудительной конвекцией (“Mettler”, Германия) при температуре 105°C . Взвешивали все 4 пробирки на лабораторных аналитических весах GR-200 (“AND”, Япония). Среднее арифметическое результатов взвешивания сухой биомассы (г) пересчитывали на содержание в 1 л (г/л).

Экстракция и количественная оценка содержания пигмента. Для экстракции общего пигмента из клеток *A. agilis* в различных условиях культивирования штамма проводили их лизис, предварительно удалив биомассу из культуральной жидкости центрифугированием на универсальной микроцентрифуге Eppendorf 5418 (“Eppendorf”, Германия) в течение 10 мин при скорости вращения ротора 10000 g. Декантировали супернатант и к биомассе добавляли 3 М раствор гуанидинтиоцианата (“Hebei Honggang Importand Export Trade Co., Ltd.”) по 200 мкл в каждую из 4 пробирок Eppendorf. Суспензию гомогенизировали с использованием встряхивателя V-3 типа Vortex (“Elmi Ltd.”, Латвия) и затем пробирки помещали в термощейкер Eppendorf Thermo Mixer C с охлаждением и перемешиванием (“Eppendorf”, Германия) для экстракции пигмента: длительность 10 мин, ско-

рость перемешивания 300 об./мин, температура 60°C . Далее суспензию центрифугировали на универсальной микроцентрифуге Eppendorf 5418 (“Eppendorf”, Германия) в режиме: 10000 g, 10 мин. Декантировали супернатант, бактериальные клетки промывали дистиллированной водой до удаления цветового оттенка и к промытой биомассе добавляли метанол с массовой долей основного вещества 99.99% (“Химмед”, Россия) по 300 мкл в каждую из 4 пробирок Eppendorf; биомассу тщательно гомогенизировали путем встряхивания; суспензию выдерживали в течение 10 мин при температуре $22\text{--}25^\circ\text{C}$, периодически встряхивая. Полученный экстракт концентрировали в сушильном шкафу Memmert UF110 plus с принудительной конвекцией (“Mettler”, Германия) при 75°C , периодически перемешивая; полученный сухой остаток суспендировали в воде и на спектрофотометре UV-1900 (“Shimadzu”, Япония) определяли спектр поглощения в интервале длин волн 350–600 нм.

Количественную оценку содержания пигмента в биомассе с использованием результатов спектрального анализа проводили по формулам:

$$m = \frac{m_1 - m_2}{V} = \frac{(m_1 - m_2) \rho}{m_1}, \quad (2)$$

где m – масса вещества, растворенного в объеме, мг/мл;

m_1 – масса раствора до высушивания, г;

m_2 – масса раствора после высушивания, г;

V – объем раствора, мл;

ρ – плотность метанола при $22\text{--}25^\circ\text{C}$, г/см³.

Так как концентрация находится в прямой зависимости от оптической плотности, то массу анализируемого вещества в растворе (ω_x) определяли по формуле, полученной из следующей математической выкладки:

$$\frac{D_x}{D_{\text{эт}}} = \frac{\omega_x}{\omega_{\text{эт}}}; \quad m_x = \frac{m_{\text{эт}} D_x}{D_{\text{эт}}}, \quad (3)$$

где m_x – масса анализируемого вещества, растворенного в объеме, мг/мл;

$m_{\text{эт}} = m$ – известная масса вещества, растворенного в объеме, мг/мл;

$\omega_{\text{эт}}$ – масса раствора с известным содержанием вещества, мг;

D_x – оптическая плотность анализируемого раствора (500 нм), е.о.п.;

$D_{\text{эт}}$ – оптическая плотность раствора с известной массой вещества (500 нм), е.о.п.

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с помощью программы R (версия 4.0) и PAST (версия 4.04) для Windows. Статистическую значимость результата оценивали по критерию Стьюдента и уровню значимости 0.05.

Таблица 1. Идентификация микроорганизмов из пшеничных отрубей

Наименование микроорганизма	Наименования штамма по GenBank	Процент идентификации, %	Наименование, КОЕ/г
2 сут ферментации			
<i>Acinetobacter radioresistens</i>	<i>Acinetobacter radioresistens</i> strain OsEp_Pim_15B15	98.24	$3 \times 10^4 - 7 \times 10^5$
<i>Arthrobacter ragilis</i>	<i>Arthrobacter agilis</i> strain BE1	99.58	$2 \times 10^2 - 7 \times 10^3$
5 сут ферментации			
<i>Acinetobacter radioresistens</i>	<i>Acinetobacter radioresistens</i> strain OsEp_Pim_15B15	98.24	$5 \times 10^5 - 9 \times 10^6$
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Enterobacter cloacae</i> strain OsEp_Pim_30B10	99.17	$1 \times 10^2 - 5 \times 10^2$
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i> strain 2	99.57	$7 \times 10^4 - 9 \times 10^5$
<i>Kocuria rhizophila</i>	<i>Kocuria rhizophila</i> strain NO4	99.13	$3 \times 10^3 - 6 \times 10^3$
7 сут ферментации			
<i>Acinetobacter radioresistens</i>	<i>Acinetobacter radioresistens</i> strain OsEp_Pim_15B15	98.24	$2 \times 10^6 - 5 \times 10^9$
<i>Atlantibacter hermannii</i>	<i>Atlantibacter hermannii</i> strain B-5	99.56	$1 \times 10^4 - 9 \times 10^7$
<i>Atlantibacter</i> sp.	<i>Atlantibacter</i> sp. strain L1-4ET-C-OTU2MT(Q02)	99.17	$3 \times 10^7 - 7 \times 10^8$
<i>Enterococcus avium</i>	<i>Enterococcus avium</i> strain G-15	99.16	$2 \times 10^4 - 5 \times 10^5$
<i>Enterococcus</i> sp.	<i>Enterococcus</i> sp. strain Pg1	99.17	$3 \times 10^4 - 8 \times 10^5$
<i>Enterococcus hiraе</i>	<i>Enterococcus hiraе</i> strain ABRIINW.N6	100.00	$2 \times 10^5 - 4 \times 10^6$
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Enterobacter cloacae</i> strain OsEp_Pim_30B10	100.00	$2 \times 10^5 - 6 \times 10^6$
<i>Kocuria rhizophila</i>	<i>Kocuria rhizophila</i> strain NO4	99.11	$5 \times 10^4 - 8 \times 10^5$

РЕЗУЛЬТАТЫ

Состав микробиома пшеничных отрубей. В результате проведенной идентификации по гену 16S рРНК микробиоты исследуемых пшеничных отрубей установлено, что микробиом представлен бактериями, в основном принадлежащими к роду *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Atlantibacter*, *Enterococcus*, *Enterobacter*, *Kocuria*. На протяжении всего периода ферментации в течение 7 сут в культуральной жидкости, по результатам высева на среду ГМФ-агар и изучения морфологических признаков выросших культур, преобладали выпуклые колонии от светло-серого до молочного цвета с однородной блестящей поверхностью и ровными краями. В результате секвенирования выделенной из этого изолята ДНК получена генетическая последовательность, которая в программе

BLAST соответствует культуре *Acinetobacter radioresistens*, относящейся к виду радиационно-устойчивых бактерий. Выявленную бактерию по показателю КОЕ условно приняли как микрофлору, доминирующую в микробном консорциуме изучаемых пшеничных отрубей (табл. 1). Идентифицированные микроорганизмы по 16S рРНК с помощью программы BLAST обладают высоким уровнем вариативности генов с депонированными микроорганизмами международной базы данных GenBank (см. рис. 1–3).

Влияние температуры на пигментообразование и идентификация бактериального изолята. После высева на ГМФ-агар и в процессе хранения в течение 7–10 сут при температуре $4 \pm 1^\circ\text{C}$ рядом с цепочками колоний культуры *Acinetobacter radioresistens* появлялись единичные бактериальные

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Acinetobacter radioresistens strain OsEp_Pim_15B15 16S ribosomal RNA gene, partial seq...	Acinetobacter radioresistens	405	805	100%	2e-108	98.24%	1402	MT367790.1

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Arthrobacter agilis strain BE1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Arthrobacter agilis	438	866	99%	2e-118	99.58%	1409	MT397223.1

Рис. 1. Идентифицированные микроорганизмы на 2 сут ферментации по 16S рРНК с помощью программы BLAST.

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Acinetobacter radioresistens strain OsEp_Plm_15B15 16S ribosomal RNA gene, partial seq...	Acinetobacter radioresistens	405	805	100%	2e-108	98.24%	1402	MT367790.1
<input checked="" type="checkbox"/> Enterobacter cloacae strain OsEp_Plm_30B10 16S ribosomal RNA gene, partial seque...	Enterobacter cloacae	435	862	100%	3e-117	99.17%	1403	MT367801.1
<input checked="" type="checkbox"/> Enterococcus faecium strain 2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Enterococcus faecium	431	783	100%	3e-116	99.57%	1000	MH236303.1
<input checked="" type="checkbox"/> Kocuria rhizophila strain NO4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Kocuria rhizophila	418	799	98%	3e-112	99.13%	1367	MT377849.1

Рис. 2. Идентифицированные микроорганизмы на 5 сут ферментации по 16S рРНК с помощью программы BLAST.

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Acinetobacter radioresistens strain OsEp_Plm_15B15 16S ribosomal RNA gene, partial seq...	Acinetobacter radioresistens	405	805	100%	2e-108	98.24%	1402	MT367790.1
<input checked="" type="checkbox"/> Atlantibacter hermannii strain B-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Atlantibacter hermannii	416	811	100%	9e-112	99.56%	1449	MT434774.1
<input checked="" type="checkbox"/> Atlantibacter sp. strain L1-4ET-C-OTU2MT(Q02) 16S ribosomal RNA gene, partial seq...	Atlantibacter sp.	435	844	100%	2e-117	99.17%	1382	MT772208.1
<input checked="" type="checkbox"/> Enterococcus avium G-15 DNA, complete genome	Enterococcus avium	435	4332	100%	3e-117	99.17%	3623727	AP019814.1
<input checked="" type="checkbox"/> Enterococcus sp. strain Pg1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Enterococcus sp.	435	787	93%	3e-117	99.17%	913	KY230514.1
<input type="checkbox"/> Enterococcus hirae strain ABRIINW.N6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Enterococcus...	435	783	99%	2e-117	100.00%	1545	MK367693.1
<input checked="" type="checkbox"/> Enterobacter cloacae strain OsEp_Plm_30B10 16S ribosomal RNA gene, partial seque...	Enterobacter cloacae	396	790	98%	1e-105	100.00%	1403	MT367801.1
<input checked="" type="checkbox"/> Kocuria rhizophila strain NO4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Kocuria rhizophila	407	761	99%	5e-109	99.11%	1367	MT377849.1

Рис. 3. Идентифицированные микроорганизмы на 7 сут ферментации по 16S рРНК с помощью программы BLAST.

колонии розового цвета (рис. 4, поз. 2), количество которых увеличивалось во временном интервале (рис. 4, поз. 3). В результате секвенирования выделенной из этого изолята ДНК получена генетическая последовательность, которая в программе BLAST соответствует бактерии *Arthro-bacter agilis*.

Выделенная культура депонирована в Ведомственную коллекцию полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения Россельхозакадемии (RCAM) под номером wb28, RCAM 05966, наименование штамма по GenBank *Arthro-bacter agilis* strain BE1. Штамм *A. agilis* wb28 в процессе длительного хранения даже при температуре $28 \pm 2^\circ\text{C}$ пигментировал, и интенсивность окраши-

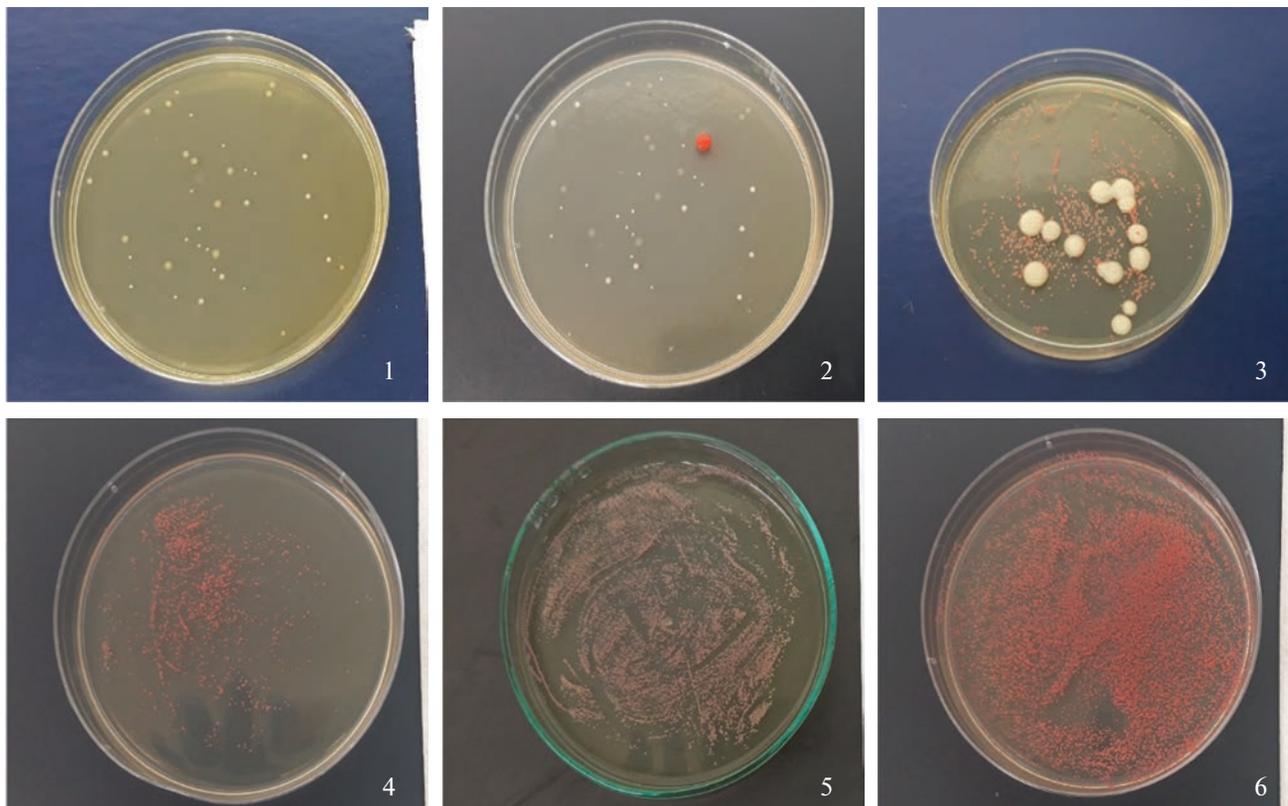


Рис. 4. *A. agilis* wb28 в микробном консорциуме пшеничных отрубей (1–3) и в виде изолята (4–6) при культивировании на различных агаризованных средах: 1 – микробный консорциум пшеничных отрубей (ГМФ-агар, 3 сут, $28 \pm 1^\circ\text{C}$); 2 – микробный консорциум (ГМФ-агар, 3 сут при $28 \pm 1^\circ\text{C}$ и далее в течение 20 сут при $4 \pm 1^\circ\text{C}$ (обнаружена красная колония *A. agilis*)); 3 – колонии *A. agilis* розового цвета с колониями *Acinetobacter radioresistens* (ГМФ-агар, 3 сут, $28 \pm 1^\circ\text{C}$); 4 – изолят *A. agilis* (ГМФ-агар, 3 сут, $28 \pm 1^\circ\text{C}$); 5 – изолят *A. agilis* (среда LB с NaCl в концентрации 2%, 3 сут, $28 \pm 1^\circ\text{C}$); 6 – изолят *A. agilis* (среда LB без NaCl, 3 сут, $28 \pm 1^\circ\text{C}$).



Рис. 5. Изолят *A. agilis* wb28, колонии красного цвета; хранение в течение 3 сут при температуре $4 \pm 1^\circ\text{C}$ после культивирования на среде LB без NaCl в течение 3 сут при температуре $28 \pm 2^\circ\text{C}$.

вания усиливалась при понижении температуры до $4 \pm 1^\circ\text{C}$ (рис. 5).

В зависимости от потребностей продуцентов *A. agilis* для их роста используют различные варианты среды LB, состав которой включает в качестве источника углерода глюкозу, азота – пептиды, казеиновые пептоны и аминокислоты (вводятся с триптоном), а также витамины и микроэлементы (добавляют путем введения экстракта дрожжей); концентрацию хлорида натрия варьируют (стандартно 1%) (Nikaido, 2009).

Поскольку колонии исследуемого штамма проявили рост на среде как в присутствии NaCl, так и без него, и более интенсивное их окрашивание выявлено при росте бактерии на среде без соли (см. рис. 4, поз. 6), то представляло интерес изучить влияние концентрации хлорида натрия и холодового шока на пигментообразование.

В результате эксперимента выявлено, что в культуральной жидкости, полученной при температуре культивирования *A. agilis* wb28 $28 \pm 2^\circ\text{C}$, скорости перемешивания 180 об./мин и добавлении NaCl изначально в питательную среду в кон-

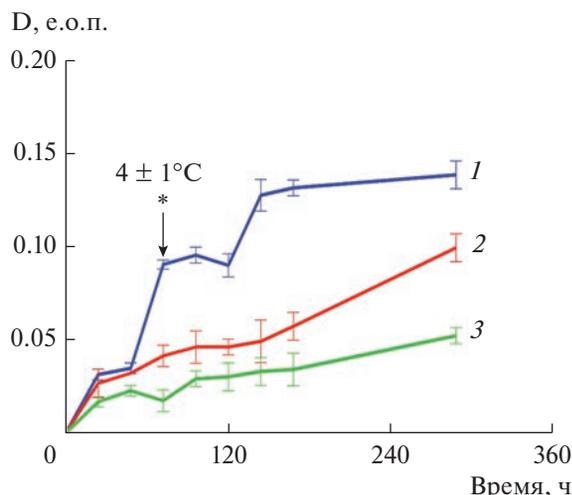


Рис. 6. Зависимость оптической плотности экстрактов общего пигмента при длине волны 500 нм от концентрации NaCl в культуральной среде и времени культивирования штамма *A. agilis* wb28 при температуре 28 ± 2 и $4 \pm 1^\circ\text{C}$: 1 – без NaCl; 2 – NaCl 2%; 3 – NaCl 4%.

центрации 2 и 4%, содержание пигмента, судя по показателю оптической плотности экстрактов общего пигмента, было ниже, чем в отсутствие NaCl (рис. 6). Однако это непосредственно связано с тем, что развитие *A. agilis* wb28 подавляется в среде с хлоридом натрия, как это было представлено выше в опытах на плотных агаризованных средах (см. рис. 4, поз. 5), поэтому общее содержание каротиноида в культуральной жидкости было меньше. Бактерии, которые культивировались на среде с NaCl (2 и 4%) с первых суток при $28 \pm 2^\circ\text{C}$, при охлаждении на третьи сутки процесса до $4 \pm 1^\circ\text{C}$ не снижали концентрацию пигмента (рис. 6). На шестые сутки, после 3 сут культивирования при $4 \pm 1^\circ\text{C}$, количество пигмента вновь увеличивалось (рис. 6, 1).

Влияние осмотического шока на пигментобразование. При осмотическом шоке (введение в культуральную жидкость NaCl на 3 сут культивирования) концентрация пигмента снижалась, но ее уровень восстанавливался до достигнутого на 3 сут и продолжал увеличиваться, независимо от концентрации соли, введенной в культуральную среду (рис. 7). Увеличение концентрации соли до 10% показало самое большое падение содержания бактериоруберина на 4 и 5 сут культивирования штамма *A. agilis* wb28. На 3 сут после введения хлорида натрия, рост концентрации пигмента восстановился, и на 12 сут было видно, что общее содержание пигмента ниже в тех образцах, в которых содержалась соль. Следует отметить, что штамм *A. agilis* wb28, независимо от температуры культивирования и присутствия в питательной среде хлорида натрия, проявлял рост на средах с различными

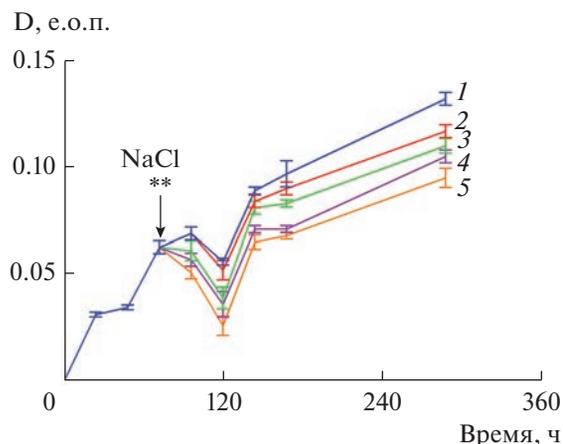


Рис. 7. Зависимость оптической плотности экстрактов общего пигмента при длине волны 500 нм от времени культивирования штамма *A. agilis* wb28 при температуре $28 \pm 2^\circ\text{C}$ и концентрации NaCl, введенной в культуральную среду на 3 сут: 1 – 0% (контроль); 2 – 2%; 3 – 4%; 4 – 6%; 5 – 8%; 6 – 10%.

источниками углерода, представленными поли-, ди- и моносахарами (табл. 2).

Количественная оценка содержания пигмента в биомассе с использованием результатов спектрального анализа показала, что в экстремальных условиях ($4 \pm 1^\circ\text{C}$) в клетках *A. agilis* wb28 может накапливаться в среднем до 17.2 мг пигмента в пересчете на 1 г биомассы (см. табл. 2, рис. 8).

ОБСУЖДЕНИЕ

Культура *Arthrobacter agilis*, согласно данным ряда исследователей, является холодоустойчивой культурой и продуцирует красящие вещества (каротиноиды) (Afra et al., 2017). Поскольку рост ис-

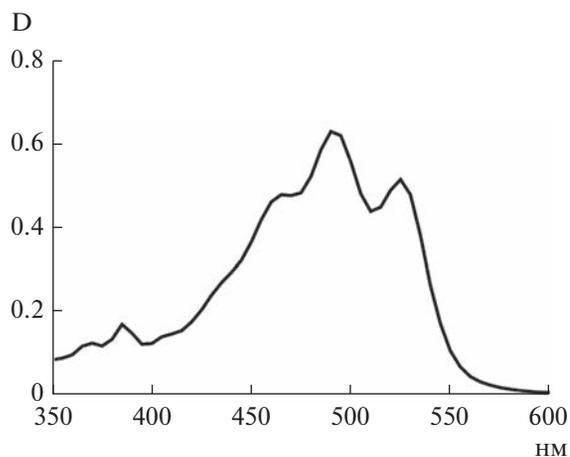


Рис. 8. Спектрограмма экстракта общего пигмента в интервале длин волн поглощения λ в пределах от 350 до 600 нм.

Таблица 2. Некоторые физиологические характеристики исследуемого штамма *A. agilis* wb28

Наименование	Рост на глюкозе и (или) сахарозе	Рост на агарозе	Рост в присутствии NaCl	Количество пигмента, (метанольный экстракт/ ВЖХ), мг/л	Оптимальный pH	Оптимальная температура пигментации, °С
Исследуемый штамм <i>A. agilis</i> wb28	+	+	+	52.8 (17.2 мг/г биомассы)	5.0–7.0	5–30
<i>A. agilis</i> (Bertani, 2004)	+	+	+	50 (1.8 мг/г биомассы)	5.0–11.0	4–35
<i>A. agilis</i> A17 (KP318146) (Zhang et al., 2010)	+	+	+	40–100	≥ 0	30
<i>A. agilis</i> DSM 20550T (Davidson, Jaine, 2014)	+	+	+	50–85 мг/г биомассы	≥ 7.0	10–30
<i>A. agilis</i> (Flegler, Lipski, 2022a)	+	+	?	21.5–100	≥ 7.0	4–30
<i>A. agilis</i> MB813 (Flegler, Lipski, 2022b)	+	?	?	2.5	≥ 7.0	5–40
<i>A. agilis</i> G20 (Fong et al., 2001)	+	+	+	0.84	6–7	15–25

Примечание. ? – данные отсутствуют.

следуемого штамма *A. agilis* wb28 выявлен только совместно с бактерией *Acinetobacter radioresistens*, причем при низкой температуре, то, по-видимому, субстратами для нее являются метаболиты, выделяемые в среду *Acinetobacter radioresistens*. За счет использования органических веществ различного происхождения проявляет жизнеспособность большинство гетеротрофных микроорганизмов. Исследуемый штамм по углеродному питанию, по-видимому, относится к гетеротрофам, питающимся субстратами растительного и микробного происхождения, и является сапротрофом.

Представители бактерий *A. agilis* – грамположительные аэробы семейства *Micrococcaceae*, относятся к умеренным галофилам, которые имеют оптимум роста при содержании соли 1–2%, хорошо растут в среде с 10% соли, но могут выдерживать даже 20% соли (большинство штаммов *A. agilis* не растут на среде с NaCl в концентрации более 5%) (Ястребова и соавт., 2007). Исследуемую культуру можно отнести к умеренным галофилам, так как ее рост проявлялся на среде LB в присутствии NaCl в концентрации 2% (рис. 4, поз. 5).

По температурному фактору изучаемый штамм *A. agilis* wb28 является психротрофом, поскольку может расти при различных температурах, но развитие клеток активизируется при 5°C и ниже. Рост представителей *A. agilis* при низких температурах сопровождается образованием пигментов – каротиноидов. Это свойство бактерии используется для получения натурального пищевого красителя – β-каротина (Fong et al., 2001). В сравнительном аспекте, для изолята *A. agilis* wb28 температура и pH среды (слабокислая и щелочная

зоны), способствующие пигментации, находятся в пределах, характерных для известных представителей данной таксономической группы (см. табл. 2). Биосинтез каротиноидов способствует адаптации бактерий к холоду путем стабилизации мембраны и обеспечивает устойчивость к окислительному стрессу и УФ-излучению. У психрофильных бактерий биосинтез каротиноидов индуцируется холодом; при 5°C синтезируется большее количество каротиноидов, чем при 25°C (Afra et al., 2017).

Таким образом, воздействие хлоридом натрия не только негативно сказывалось на росте культуры *A. agilis* wb28, но и изменяло содержание пигмента, по-видимому, бактериоруберина, в клетке. Эти явления можно объяснить двумя факторами: гибелью клеток в результате тургора (и высвобождением пигмента из клетки) или изменением химического состава пигмента (разложение, окисление, реакция с другими молекулами) бактериоруберина в процессе адаптации клеток. Кроме того, понижение температуры с 28 ± 2 до 4 ± 1 °C замедляло рост содержания пигмента, но не уменьшало его.

Есть два влияющих фактора: адаптация к холоду и продолжение роста культуры или активирование защитных механизмов и повышение концентрации пигмента непосредственно в клетках. Наиболее вероятно, что мы имеем дело с совокупностью двух факторов, вклад которых на данный момент не ясен. Поэтому, при культивировании клеток *A. agilis* wb28 с целью получения наибольшего содержания бактериоруберина необходимо избегать стресс-факторов в виде холода и осмотического шока, так

как они замедляют и понижают содержание каротиноидов в культуре. Интересен тот факт, что при 5°C изученные культуры *A. agilis* увеличивали продуцирование разветвленных и ненасыщенных жирных кислот, которые повышают текучесть мембраны (Özdal et al., 2017). Предполагается, что при низких температурах бактерии обладают способностью поддерживать оптимальную текучесть мембраны, регулируя баланс между количеством разветвленных и ненасыщенных жирных кислот (увеличивают текучесть мембраны) и полярных каротиноидов (увеличивают жесткость мембраны).

Согласно литературным данным, *A. agilis* может продуцировать холодоактивные ферменты, такие как липаза, амилаза, протеаза, хитиназа, β-галактозидаза, каталаза, нитратредуктаза, а также индол-3-уксусную кислоту, применяемую в сельском хозяйстве как гормон роста для растений (Ram et al., 2016), и диметилгексадециламин, ингибирующий рост фитопатогенных грибов (Velázquez-Becerra et al., 2013; Özdal et al., 2017). Поэтому в перспективе представляет интерес исследовать возможные защитные механизмы изучаемого бактериального изолята на ферментативном уровне относительно биохимических реакций взаимопревращения ответных метаболитов на осмозок и холодовый стресс.

Обнаружение штамма *A. agilis* wb28, относящегося к холодоустойчивым таксонам, в пшеничных отрубях, по-видимому, обусловлено его миграцией из почвы в растение и далее в продукты переработки зерновой культуры, что представляет интерес в качестве отдельной темы научных исследований.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают признательность сотрудникам Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной микробиологии (ВНИИСМ) за оказанную помощь в проведении идентификации микроорганизмов по гену 16S рРНК.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследования проведены по теме FGUS-2022-0003 в рамках государственного задания № 075-01190-22-00 ВНИИ пищевых добавок – филиал ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН.

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

- Ястребова О.В., Плотникова Е.Г. Галотолерантные бактерии-деструкторы полициклических ароматических углеводородов рода *Arthrobacter* // Вестн. Пермского ун-та. 2007. Вып. 5. № 10. С. 100–106.
- Afra S., Makhdoumi A., Matin M.M., Feizy J. A novel red pigment from marine *Arthrobacter* sp. G20 with specific anticancer activity // J. Appl. Microbiol. 2017. V. 123. P. 1228–1236.
- Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria / Ed. Whitman W.B. N.Y.: John Wiley & Sons, Inc., 2015. 990 p. ISBN: 978-1-118-96060-8.
- Bertani G. Lysogeny at mid-twentieth century: P1, P2, and other experimental systems // J. Bacteriol. 2004. V. 186. P. 595–600.
- Davidson A., Jaine T. The Oxford Companion to Food. Oxford: Oxford University Press, 2014. 960 p. ISBN 978-0-19-104072-6.
- Flegler A., Lipski A. Engineered CRISPR/Cas9 system for transcriptional gene silencing in *Arthrobacter* species indicates bacterioruberin is indispensable for growth at low temperatures // Curr. Microbiol. 2022a. V. 79. P. 199.
- Flegler A., Lipski A. The C₅₀ carotenoid bacterioruberin regulates membrane fluidity in pink-pigmented *Arthrobacter* species // Arch. Microbiol. 2022b. V. 204. P. 70.
- Fong N., Burgess M., Barrow K., Glenn D. Carotenoid accumulation in the psychrotrophic bacterium *Arthrobacter agilis* in response to thermal and salt stress // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2001. V. 56. P. 750–756.
- Hezayen F.F., Tindall B.J., Steinbüchel A., Rehm B.H.A. Characterization of a novel halophilic archaeon, *Halobiforma haloterrestriis* gen. nov., sp. nov., and transfer of *Natronobacterium nitratireducens* to *Halobiforma nitratireducens* comb. nov. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2002. V. 52. P. 2272–2280.
- Hu Q.-W., Chu X., Xiao M., Li C.-T., Yan Z.-F., Hozzein W.N., Kim C.-J., Zhi X.-Y., Li W.-J. *Arthrobacter deserti* sp. nov., isolated from a desert soil sample // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2016. V. 66. P. 2035–2040.
- Jones D., Keddie R.M. The genus *Arthrobacter* // The Prokaryotes / Eds. Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.H., Stackebrandt E. New York, N.Y.: Springer, 2006. https://doi.org/10.1007/0-387-30743-5_36
- Kim S., Park H., Choi J. Cloning and characterization of cold-adapted α-amylase from antarctic *Arthrobacter agilis* // Appl. Biochem. Biotechnol. 2017. V. 181. P. 1048–1059.
- Kumar R., Singh D., Swarnkar M.K., Singh A.K., Kumar S. Complete genome sequence of *Arthrobacter alpinus* ERGS4:06, a yellow pigmented bacterium tolerant to cold and radiations isolated from Sikkim Himalaya // J. Biotechnol. 2016. V. 220. P. 86–87.
- Margesin R., Schumann P., Sproer C., Gounot A.M. *Arthrobacter psychrophenicus* sp. nov., isolated from an alpine ice cave Inter // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2004. V. 54. P. 2067–2072.
- Nikaido H. The Limitations of LB Medium. Small things considered – The Microbe Blog. ASM. <http://schaechter.asmblog.org/schaechter/2009/11/the-limitations-of-lb-medium.html>. Архивная копия от 12 ноября 2020 на Wayback Machine.

- Özdal M., Özdal O.G., Gürkök S. Statistical optimization of β -carotene production by *Arthrobacter agilis* A17 using response surface methodology and Box-Behnken design // II. Int. Conf. on Advances in Natural and Applied Sciences. 18–21 April 2017, Antalya, Turkey / Eds. Akdemir A.O., Ekinci A., Han I., Set E., Dadasoglu F., Karagoz K., Oztekin A. AIP Conference Proceedings, 2017. V. 1833. Iss. 1, id.020101. publ. Apr 25, 2017. ISBN: 978-0-7354-1503-4.
- Özdal M., Özdal O.G., Sezen A., Algur O.F., Kurbanoglu E.B. Continuous production of indole-3-acetic acid by immobilized cells of *Arthrobacter agilis* // 3 Biotech. 2017. V. 7. Art. 23. P. 1–6.
- Reddy G.S.N., Prakash J.S.S., Matsumoto G.I., Stackebrandt E., Shivaji S. *Arthrobacter roseus* sp. nov., a psychrophilic bacterium isolated from an antarctic cyanobacterial mat sample // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2002. V. 52. P. 1017–1021.
- Sahli K., Gomri M.A., Esclapez J., Gómez-Villegas P., Bonete M.-J., León R., Kharroub K. Characterization and biological activities of carotenoids produced by three haloarchaeal strains isolated from Algerian salt lakes // Arch. Microbiol. 2022. V. 204. P. 6.
https://doi.org/10.1007/s00203-021-02611-0
- Saini R.K., Keum Y.S. Microbial platforms to produce commercially vital carotenoids at industrial scale: An updated review of critical issues // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2019. V. 46. P. 657–674.
- Singh R.N., Gaba S., Yadav A.N., Gaur P., Gulati S., Kaushtik R., Saxena A.K. First high-quality draft genome sequence of a plant growth promoting and cold active enzyme producing psychrotrophic *Arthrobacter agilis* strain L77 // Stand. Genom. Sci. 2016. V. 1. P. 1–9.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony method // Mol. Biol. Evol. 2011. V. 28. P. 2731–2739.
- Velázquez-Becerra C., Macías-Rodríguez L.I., López-Bucio J., Flores-Cortez I. The rhizobacterium *Arthrobacter agilis* produces dimethylhexadecylamine, a compound that inhibits growth of phytopathogenic fungi *in vitro* // Protoplasma. 2013. V. 1. P. 100–112.
- Weisburg W.G., Barns S.M., Pelletier D.A., Lane D.J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study // J. Bacteriol. 1991. V. 173. P. 697–703.
- Yang L.-L., Liu H.-C., Liu Q., Xin Y.-H. *Arthrobacter cheninae* and *Arthrobacter frigidicola* sp. nov., isolated from a glacier // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2021. V. 71. P. 005177.
- Ye J.-J., Liu S.-W., Lu Q.-P., Cheema M.T., Abbas M., Sajid I., Huang D.-L., Sun C.-H. *Arthrobacter mobilis* sp. nov., a novel actinobacterium isolated from Cholistan desert soil // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2020. V. 70. P. 5445–5452.
- Zalazar L., Pagola P., Miró M.V., Churio M.S., Cerletti M., Martínez C., Iniest-Cuerda M., Soler A.J., Cesari A., De Castro R. Bacterioruberin extracts from a genetically modified hyperpigmented *Haloferax volcanii* strain: antioxidant activity and bioactive properties on sperm cells // J. Appl. Microbiol. 2018. V. 126. P. 796–810.
- Zhang D.-C., Schumann P., Liu H.-C., Xin Y.-H., Zhou Y.-G., Schinner F., Margesin R. *Arthrobacter alpinus* sp. nov., a psychrophilic bacterium isolated from alpine soil // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2010. V. 60. P. 2149–2153.

Adaptive Properties of *Arthrobacter agilis* Strain wb28 Isolated from Wheat Bran

N. Yu. Sharova¹*, A. O. Prichepa¹, O. P. Sverdlova¹, and A. A. Printseva¹

¹All-Russia Research Institute for Food Additives, Branch of Gorbатов Federal Research Center for Food Systems, Russian Academy of Sciences, St.-Petersburg, 191014 Russia

*e-mail: natalya_sharova1@mail.ru

Received November 14, 2022; revised March 1, 2023; accepted March 2, 2023

Abstract—The article presents the results of a study of some adaptive properties of a bacterial isolate from wheat bran, identified by the 16S rRNA gene as an *Arthrobacter agilis* strain. According to the literature data, *A. agilis* does not belong to the dominant bacterial species of wheat microbial associations and activates growth at low ambient temperatures. The studied *A. agilis* strain showed poor growth in a microbial consortium when an aqueous suspension of wheat bran, partially fermented at $28 \pm 1^\circ\text{C}$ by the native microbiota, was plated on a dense MPA medium and produced the pigment after three weeks of storage at $4 \pm 1^\circ\text{C}$. Moderate growth of bacteria without increased pigmentation was observed during its subsequent transfer after low-temperature storage on agar media containing carbohydrates and nitrogen compounds, mineral salts, and vitamins that were more easily utilized than native bran. The growth of colonies upon plating on such media increased in the series: thermally fermented wheat bran \rightarrow HMF agar \rightarrow LB (without salt). It was revealed that the *A. agilis* strain, which was not typical of the wheat bran microflora, under the influence of osmotic and/or temperature shock (in response to a sharp change in the NaCl concentration and/or a difference in ambient temperatures) produced pigments both in agar and liquid cultures. According to the results of spectral analysis, the pigment was assigned to carotenoids and tentatively identified as bacterioruberin. Quantitative evaluation showed that, under stress conditions during submerged cultivation, the studied strain *A. agilis* wb28 was able to synthesize the pigment at the level of 52.8 mg/L (17.2 mg/g biomass).

Keywords: wheat bran, *Arthrobacter agilis* wb28, osmotic shock, cold shock, bacterioruberin, pigment

ОСОБЕННОСТИ БИОДЕСТРУКЦИИ КОМПОЗИТНЫХ МАТЕРИАЛОВ НА ОСНОВЕ ПОЛИЭТИЛЕНА ВЫСОКОЙ ПЛОТНОСТИ И КРАХМАЛА

© 2023 г. Т. Н. Сулова^а, * И. И. Салахов^а, В. Н. Никонорова^а, Г. В. Гиляева^а, О. М. Трифонова^а

^аПАО “Нижнекамскнефтехим”, Нижнекамск, 423574 Россия

*e-mail: a-r-x2010@mail.ru

Поступила в редакцию 17.07.2022 г.

После доработки 29.05.2023 г.

Принята к публикации 29.05.2023 г.

Проведено исследование деструкции композитов на основе полиэтилена высокой плотности (ПЭВП), наполненных полисахаридами амилозы и амилопектина. Показано, что при низких дозировках полисахаридов (0.5 мас. %) не происходит изменение вязкостных, молекулярно-массовых и физико-механических характеристик образцов ПЭВП, а с повышением доли природного наполнителя (крахмал) до 1 и 5% наблюдается снижение механических свойств, однако значения деформационно-прочностных показателей соответствуют минимальным необходимым требованиям для пленочной упаковки. Выявлено, что после почвенного депонирования в течение одного года наибольшим изменениям свойств подвергся образец пленки из ПЭВП с содержанием кукурузного крахмала 5 мас. %. Изучение способности аэробных микроорганизмов к трансформации поверхности изученных пленочных композитов показало, что бактерии рода *Bacillus* способны эффективно колонизировать полиэтиленовые композиты. Выявлено, что среди идентифицированных микроорганизмов микромицеты родов *Penicillium* и *Trichoderma* способны наиболее активно изменять структуру полученных полимерных композитов, а наибольший эффект достигается при синергическом воздействии разных родов микромицетов.

Ключевые слова: полиэтилен, полисахарид амилозы и амилопектина, биодеструкция, микромицеты

DOI: 10.31857/S0026365622600596, **EDN:** HXVKYD

Еще до возникновения проблемы загрязнения окружающей среды пластиком был начат поиск альтернативного сырья для производства биоразлагаемых полимеров. Корни этих исследований уходят в 30-е годы XX в., когда промышленный автогигант Генри Форд исследовал возможность использования пластика на основе соевых бобов для различных комплектующих своих автомобилей (Тасекеев, 2009). В этом есть доля иронии, ведь индустрия пластмасс началась с использования в качестве сырья природных ингредиентов — натурального каучука и нитроцеллюлозы. Синтетические пластики, в частности, полиэтилен (ПЭ), начали широко применять лишь во время Второй Мировой войны из-за резкой нехватки резины и металла. С тех пор синтетические полимеры стали вытеснять натуральные материалы и в настоящее время прочно вошли в нашу жизнь. За этот период долговечность пластмасс значительно увеличилась, возросла их устойчивость ко многим факторам окружающей среды. Также в мире возросли и темпы их производства, которые достигли к 2018 г. 360 млн т. Необходимо отметить, что примерно 30% производимого пластика используется в качестве упаковочных материалов

(полиэтиленовые пленки, пакеты) (<https://takiedela/news/2020>).

Инертность пластмасс и устойчивость к микробной деградации приводят к их стремительному накоплению в окружающей среде, в связи с чем возникает проблема переработки и утилизации пластиковых отходов (Nakamae, 1997; Koutny et al., 2006; Shah, 2013). Только в России ежегодно на свалках оказывается около 2 млн т полимерных материалов (Bensch et al., 2010). В настоящее время для предотвращения загрязнения природной среды пластмассовыми отходами применяют захоронение и утилизацию путем сжигания, пиролиза или переработки (Мазитова и соавт., 2021). Однако эти методы экономически невыгодны, технически сложны и, самое главное, не приводят к существенному улучшению экологической ситуации.

Оптимальным решением является создание биоразлагаемых материалов для изделий с коротким сроком службы (упаковочные материалы, одноразовая посуда, авторучки, транспортные паллеты и т.д.), подавляющее большинство которых изготавливают из ПЭ. Этот пластик наиболее востребован не только в индустрии упаковки, но

и широко используется в пищевой и легкой промышленности, медицине и других отраслях.

Существующие в настоящее время биоразлагаемые полимеры, например, полилактиды или полигидроксиалканоаты, дороже традиционных полимеров (Тасекеев, 2009). Но даже если стоимость будет сопоставима, полимеры, особенно на основе полиолефинов, еще долго будут занимать ведущие позиции в производстве пластика.

В последнее время широкое распространение получили полимерные композиты на основе ПЭ с добавлением различных добавок растительного происхождения (полилактид, древесная мука, крахмал и др.), легко усваиваемых микроорганизмами, что позволяет добиться инициации биоразложения полиолефинов (Nowak et al., 2011; Агзамов и соавт., 2012; Сулова и соавт., 2014). Из многообразия природных наполнителей полисахарид амилозы и амилопектина (крахмал) наиболее перспективен, так как является недорогим, полностью биоразлагаемым и возобновляемым сырьем. При этом, его пониженные механические свойства и высокая растворимость в воде послужили толчком для разработки способов и методов пластификации или смешения с синтетическими полимерами для получения конкурентных коммерческих товаров (Аамер, 2006). Выбор кукурузного крахмала для данной цели обусловлен его повышенной дисперсностью, сферичностью его частиц и высокой проницаемостью (Blumenthal, Vochaton, 2010).

Необходимо отметить, что существенная роль в процессах деструкции материалов принадлежит микроорганизмам (Котова и соавт., 2021), которые отличаются большим многообразием ферментативных систем и проявляют свою активность в различных условиях концентрации кислорода, влажности, pH, температуры, наличию минералов и т.д. (Roy et al., 2008; Щербо, Антонова, 2008). Поэтому исследование разнообразия микроорганизмов, способствующих деструкции композитных материалов на основе ПЭ, крайне актуально.

Целью данной работы было изучение возможности деструкции почвенными микроорганизмами полимеров на основе полиэтилена с добавлением крахмала, а также выявление особенностей физико-механических характеристик таких композитных материалов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе были проведены испытания по наполнению промышленного бимодального (полученного по двухреакторной каскадной технологии) полиэтилена высокой плотности (ПЭВП) (ПТР_{190°C/2.16 кг} = 0.2 г/10 мин, $\rho = 0.948$ г/см³) производства ПАО “Нижнекамскнефтехим” кукурузным крахмалом высшего сорта ГОСТ 32159–2013 произ-

водства “Распак” (г. Москва) в дозировках 0.5, 1.0 и 5.0 мас. %. Данная бимодальная марка ПЭВП используется для получения высокопрочной пленки. Выбранные концентрации натурального наполнителя позволяют увеличить степень биодеструкции полиэтилена, при этом сохраняя удовлетворительные эксплуатационные свойства этих материалов.

Получение композитов на основе полиэтилена и крахмала. Получение композитов осуществляли путем механического перемешивания порошка ПЭ с крахмалом. Для пластификации крахмала добавляли глицерин в количестве 5% от массы натурального наполнителя. Далее гранулирование ПЭ осуществляли в лабораторных условиях на лабораторной системе PolyLab OS (“Thermo Finder Scientific”, США) (технологический режим экструзии: скорость вращения шнеков 60 об./мин, температура цилиндра экструдера: $T_1 = 205^\circ\text{C}$, $T_2 = 210^\circ\text{C}$, $T_3 = 215^\circ\text{C}$, $T_4 = 220^\circ\text{C}$). Получение полиэтиленовой пленки толщиной 1 мм осуществляли на лабораторном экструдере Plasti-Corder Brabender (“Brabender”, Германия) (технологический режим экструзии: скорость вращения шнеков 65 об./мин, толщина фильеры 0.3 мм, температура в зоне загрузки полимера 190–230°C, в зоне фильеры 250°C). Охлаждение формирующей пленки проводили при комнатной температуре.

Определение физико-механических и структурных характеристик композитов. Показатель текучести расплава (ПТР) определяли на экструзионном пластометре 5SA (“Ray-Ran”, Великобритания) в соответствии с ASTM 1238 при температуре 190°C и постоянной нагрузке 5.0 кг. Испытания физико-механических свойств проводили согласно ГОСТ 11262 на разрывной машине Tensometer T-2000 (“Alpha Technologies”, США). Эксперименты проводили в трех независимых повторностях, на основании которых рассчитывали среднее арифметическое и величину стандартного отклонения. О наличии изменений в составе полиэтиленовых композитов под действием микроорганизмов судили по убыли их массы, а также по данным инфракрасной (ИК) спектроскопии. Идентификацию структуры образцов проводили в течение 1 года с контрольным измерением каждые 90 сут на ИК-спектрометре Spectrum 100 (“Perkin Elmer”). Микроскопирование образцов проводили с помощью оптического поляризационного микроскопа Микромед ПОЛАР 3 (“MicroMed”, Россия) при увеличении 100×, 200× и 1000× в проходящем свете. Микрофотографии образцов были получены с помощью встроенного цифрового фотоаппарата Olympus CX-41. Молекулярно-массовое распределение полимеров определяли на высокотемпературном гель-хроматографе HLC-8321GPC/HT (“Tosoh High Temperature GPC System”, Германия) по ISO 16014-1:2012.

Расчет молекулярных характеристик проводили по полистирольной калибровке с использованием коэффициентов Марка–Куна–Хаувинка–Сакурады (2 повторения, отклонение не более 5%). Мониторинг массы образцов проводили в течение 1 года с контрольным измерением каждые 90 сут.

Определение термических характеристик композитов. Измерение кислородной индукции композитов ПЭ определяли методом синхронного термического анализа на приборе STA 409 PC (“Netzsch”, Германия) по ISO TR 10837. Идентификацию газов, выделяющихся при разложении композитов, проводили с помощью синхронного термического анализа, совмещенного с масс-спектрометрией на приборе STA 449C Jupiter+QMS 403C Aeolos Netzsch (“Netzsch”, Германия), оборудованном метанатором и насадочной колонкой длиной 3 м, заполненной адсорбентом Porapak Q, фракция 80/100мм.

Условия испытания композитов. Для определения оптимальных для биодеструкции условий культивирования композитные образцы в лаборатории инкубировали на питательных субстратах (почва с территории полигона твердых бытовых отходов (ТБО) г. Нижнекамск и водная почвенная вытяжка, которую получали из того же источника), а также на питательных средах Чапека–Докса с сахарозой и без нее для определения степени биодegradации композитов в присутствии дополнительного легкодоступного источника углерода.

Композиты взвешивали поштучно на аналитических весах ViBRA HT 224RCE погрешностью 0.0001 г (по 5 повторностей) и далее вертикально погружали в субстрат на глубину 10 см и выдерживали в лаборатории при температуре окружающей среды $25 \pm 5^\circ\text{C}$. Для активизации микрофлоры почву рыхлили и увлажняли раствором биогенных элементов в течение 7 сут. Раствор биогенных элементов имел следующий состав (г/дм³ дистиллированной воды): $\text{NaNO}_3 - 2.0$; $\text{KH}_2\text{PO}_4 - 1.0$; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0.5$; $\text{KCl} - 0.5$; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0.01$. Влажность почвы поддерживали на уровне 35–50% до конца эксперимента.

В почве и почвенной водной вытяжке изучали возможность деструкции композитов аборигенными микромицетами, выделенными с полигона ТБО г. Нижнекамск. Почву для опытов готовили следующим образом: почву сначала разрыхляли, удаляли случайные механические включения (обломки камней, корневищ и веток) и просеивали через сито с размером ячеек 2 мм, затем увлажняли до уровня 35–50% влажности. В среду Чапека–Докса вносили грибы, выделенные в данном исследовании из почвы путем многократных пересевов последовательных десятикратных разведений материала, отобранного с полигона ТБО,

на жидкой среде Сабуро, как описано в руководстве (Литвинов, 1967, 1969).

В качестве предобработки с целью интенсификации деструкции, пленочные композиты перед их использованием и внесением в питательную среду обрабатывали ультрафиолетом в боксе, оснащенном УФ-лампой с длиной волны 315–400 нм и интенсивностью 1215 мкВт/см² в течение 20 сут непрерывного УФ-облучения (Bensch et al., 2010). Выбор данного светового спектра обосновывался тем, что наиболее активное воздействие на полимеры оказывает энергия излучения в ближней УФ-части спектра (300–400 нм), которой достаточно для разрыва большинства ковалентных связей.

Выделение и условия культивирования почвенных грибов. Используя образец пленки с содержанием крахмала 5%, показавшей наибольшую деструкцию при нахождении в почве, провели скрининг грибов, способных трансформировать поверхность пленочных композитов на основе ПЭВП и полисахарида амилозы и амилопектина.

Грибы были выделены из субстрата, отобранного с территории ТБО г. Нижнекамск. Для их выделения и культивирования использовали следующие плотные (агаризованные) среды: мясопептонный агар (МПА) и среда Чапека–Докса. Среды стерилизовали при 1 атм в течение 20 мин.

Для выделения грибов, способных использовать в качестве источника углерода и энергии композиты на основе ПЭВП и крахмала, 1 г отобранного с полигона ТБО субстрата вносили к 250 мл среды Чапека–Докса без источника углерода, тщательно перемешивали, отфильтровывали от крупных частиц через 4 слоя стерильной марли и инкубировали с образцом синтезированного полимерного композита. Культивирование проводили в герметично закрытых колбах в шейкере-инкубаторе при 100 об./мин и 30°C в течение 5 мес.

По окончании срока инкубации в почвенной вытяжке из колб с образцом композита осуществляли ряд последовательных десятикратных разведений с последующим посевом на агаризованные среды. Посевы на МПА инкубировали в течение суток при 30°C , далее – при комнатной температуре. При выделении микромицетов посевы на среде Чапека–Докса выращивали в течение 7 сут при комнатной температуре ($20 \pm 2^\circ\text{C}$).

Идентификацию бактерий проводили методом матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации с времяпролетной масс-спектрометрией MALDI-TOF MS с использованием системы Bruker Biotyper (“Bruker Daltonics”, Германия), в который вошли: Microflex LT instrument и Flex-Control, программное обеспечение Biotyper 3.0. Штаммы культивировали на МПА: 300 мл МПА с 20 мл почвенной вытяжки, затем дважды пассиви-

ровали в аэробных условиях на питательном агаре ("Fluka/Sigma-Aldrich") при температуре 37°C. Для идентификации брали изолированные колонии микроорганизмов. Ионизацию бактериальных белков осуществляли с помощью специального реагента — матрицы (α -циано-4-гидроксикоричная кислота и раствор, содержащий 50% ацетонитрила и 2.5% трифторуксусной кислоты). Идентификацию бактерий проводили в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения Bruker Biotyper Real Time Classification, версия 3.1 ("Bruker Daltonics", Германия). Результат учитывали по данным значения коэффициента видовой идентификации. Результаты считали достоверными, если коэффициент совпадения (Score) имел значение от 2.0 и выше. До проведения бактериалогических исследований изоляты хранили при температуре -70°C в триптиказо-соевом бульоне с добавлением 20% глицерина.

Микромицеты определяли на основе их морфолого-культуральных и физиолого-биохимических признаков с использованием специализированного определителя (Bensch et al., 2010).

Через 12 мес. инкубации композиты извлекали из сред, кратковременно (5 с) промывали 40% этиловым спиртом как ПЭВП, так и крахмалонаполненные композиты для удаления микроорганизмов с их поверхности и затем высушивали при 60°C в течение 24 ч до постоянной массы, которую измеряли на аналитических весах ViBRA HT 224RCE ("Vibra Measure the Future", Япония).

Образцы полиэтиленовой композитной пленки инкубировали в жидкой среде Чапека—Докса — одной из основных питательных сред для культивирования микромицетов, поскольку микроскопические грибы, благодаря разнообразию и высокой активности ферментных систем (Nowak et al., 2011), играют наиболее важную роль в процессах биоразложения различных материалов как биотического, так и абиотического происхождения. В качестве контроля был взят исходный образец композита ПЭ с 5% крахмала (3 повторности). Почвенные микроорганизмы-деструкторы выделяли после 5 мес. инкубирования композитов на среде Чапека—Докса без дополнительных источников углерода.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние инкубации в почве на свойства пленочных образцов. Установлено, что после одного года инкубирования в почве произошло уменьшение массы у всех крахмалсодержащих пленочных образцов. Через 90 сут в образцах ПЭВП с массовым содержанием крахмала 0.5, 1.0 и 5.0 мас. % было отмечено водопоглощение, результатом которого стало увеличение массы образцов на 0.8, 1.3 и 2.1% соответственно ($\pm 0.001\%$). Но при более

продолжительной (1 год) инкубации начался процесс биодеградации, и масса образцов уменьшилась, соответственно, на 0.1 (ПЭВП + 0.5% крахмала), 2.2 (ПЭВП + 1.0% крахмала) и 10.8% (ПЭВП + 5.0% крахмала).

Таким образом, композит с наибольшим содержанием крахмала (5%) был в наибольшей степени подвержен деструкции. Предположительно, увеличение содержания крахмала как органической добавки способствует его преимущественному потреблению микроорганизмами и большей деструкции композитного материала на основе ПЭ. Это также было ранее показано на примере *Bacillus pumilus* и *B. cereus* в композитах ПЭВП при разложении в течение 60 сут на мусорной свалке (Roy et al., 2008; Агзамов и соавт., 2012; Котова и соавт., 2021). Необходимо отметить, что у пленочного образца ПЭВП без добавления крахмала в течение всего периода инкубации масса осталась неизменной.

Следующим шагом стало исследование изменения в ходе инкубации молекулярных, физико-механических, термоокислительных характеристик композитов и установление зависимостей данных параметров от содержания природного наполнителя для наполненных композитов в течение года. Результаты приведены в табл. 1 и 2.

Из приведенных данных видно (табл. 1, 2), что молекулярные характеристики композитного материала в значительной степени зависят от содержания природного наполнителя (крахмал), повышение содержания которого с течением времени приводит к существенному снижению средней молекулярной массы полимерных образцов, тем самым интенсифицируя их деградацию. Увеличение доли крахмала в полимере приводит, однако, к ухудшению физико-механических свойств ПЭ, хотя значения показателей соответствуют минимальным необходимым требованиям для пленочной фасовочной упаковки.

Большим внешним изменениям после инкубации в почве в течение одного года подверглись образцы ПЭВП с содержанием полисахаридов 1 и 5 мас. %. В начале эксперимента пленочные образцы были ровными и гладкими. Через 90 сут инкубации на поверхности образца с наибольшим содержанием крахмала появились шероховатости и темные мелкие пятна. Далее, после более продолжительной экспозиции (1 год), образец становился темным, пористым с большим содержанием темных включений, то есть продолжительная инкубация в почве привела к потере эксплуатационных свойств крахмалонаполненных образцов, особенно с 5% содержанием полисахаридного наполнителя.

Результаты исследования образующихся газов с помощью термического анализа, совмещенного с масс-спектрометрией, выявили, что с увеличе-

Таблица 1. Изменение молекулярных характеристик образцов ПЭВП, наполненных кукурузным крахмалом в разных соотношениях, до и после инкубации в почвенной среде в течение года

Показатель, ед. изм.		Доля наполнителя (кукурузный крахмал), %			
		0	0.5	1.0	5.0
M_n , кг/моль	Исходный	9.4	9.9	9.8	10.5
	После инкубации	9.7	10.1	10.5	16.2
M_w , кг/моль	Исходный	311.1	304.7	298.5	259.8
	После инкубации	302.5	297.5	279.1	61.1(↓)
M_w/M_n	Исходный	33.1	30.8	30.5	24.7
	После инкубации	31.2	29.5	26.6	3.8(↓)

Таблица 2. Изменение свойств деформационно-прочностных свойств и термоокислительной стабильности ПЭВП, наполненных кукурузным крахмалом в разных соотношениях, до и после инкубации в почвенной среде в течение года

Показатель, ед. изм.		Доля наполнителя (кукурузный крахмал), %			
		0	0.5	1.0	5.0
Прочность при разрыве, МПа	Исходный	27.2 ± 0.01	30.3 ± 0.01	19.1 ± 0.01	17.2 ± 0.01
	После инкубации	27.1 ± 0.01	12.1 ± 0.01	8.5 ± 0.01	2.1 ± 0.01
Относительное удлинение, %	Исходный	726 ± 2.0	720 ± 2.0	695 ± 2.0	260 ± 2.0
	После инкубации	710 ± 2.0	560 ± 2.0	350 ± 2.0	50 ± 0.5
Термостабильность при 200°C в среде O ₂ , мин	Исходный	120 ± 0.8	5.4 ± 0.1	5.1 ± 0.1	4.9 ± 0.1
	После инкубации	120 ± 0.8	5.9 ± 0.1	5.2 ± 0.1	6.1 ± 0.1

нием содержания крахмала углерод становится наиболее доступным для расщепления и преобразования в парниковые газы (табл. 3). С увеличением содержания органического наполнителя при термическом исследовании композитов после инкубации уменьшалась концентрация парниковых газов, то есть метан и диоксид углерода выделялись уже при выдерживании в почве в ходе проведения эксперимента. Таким образом, введение полисахарида амилозы и амилопектина придает свойства биодеградации композиту полиэтилена, что не наблюдается в контрольном образце (ПЭВП) без наполнителя.

В течение всего времени (1 года) инкубации проводили анализ разнообразия культивируемых микроорганизмов почвы. Путем высева на среду МПА определяли общее содержание аэробных гетеротрофных бактерий, а на агаризованной среде Чапека–Докса выявляли наличие микроскопических грибов (микроспоридиомицетов). Особое внимание уделяли микроспоридиомицетам, так как именно грибы за счет специализированных ферментных комплек-

сов играют ведущую роль в биодеградации полимерных материалов.

В первые 90 сут эксперимента наблюдали фазу инициации роста. В этот период микробное сообщество приспосабливалось к новым условиям культивирования и субстрату в виде композитного материала (ПЭ с 5% крахмала). После инкубации в почве в течение 9 сут образцов (ПЭ с 5% крахмала) общее количество бактерий и микроспоридиомицетов в почвенной среде возросло (с 5.8×10^6 до 1.6×10^9 КОЕ/г). Это позволяет сделать вывод о развитии в исследованных образцах (композит ПЭ с 5% крахмала) микробного сообщества, осуществляющего частичную деградацию композитов в течение 1 года инкубирования.

Исследование процесса биодеградации пленочных образцов в жидких средах. По результатам исследований первых месяцев эксперимента, так же как и при культивировании в почве, наблюдали увеличение массы образцов, видимо, связанное с поглощением влаги зернами крахмала, входящи-

Таблица 3. Результаты термического анализа образцов композитов ПЭВП с кукурузным крахмалом в разных соотношениях, до и после инкубации в почвенной среде в течение года

Наименование образца, содержание крахмала		Содержание компонента, (ед. ионного тока · время) × 10 ⁻⁹ А · с			
		$m/z = 15$ (CH ₄)	$m/z = 44$ (CO ₂)	$m/z = 18$ (H ₂ O, физ. связ.)	$m/z = 18$ (H ₂ O, хим. связ.)
ПЭВП	Исходный	55.8	246.6	354.3	171.2
	После инкубации	44.6	160.1	189.5	225.9
	Δ, %	-20.1	-35.1	-46.5	+32.0
ПЭВП + 0.5%	Исходный	59.5	229.3	259.0	155.0
	После инкубации	46.8	142.1	194.9	228.3
	Δ, %	-21.3	-38.0	-24.7	+47.3
ПЭВП + 1.0%	Исходный	48.3	216.0	141.1	166.2
	После инкубации	46.5	123.8	197.1	222.2
	Δ, %	-3.7	-42.7	-39.7	+33.7
ПЭВП + 5.0%	Исходный	46.4	356.1	Отс.	22.5
	После инкубации	42.6	135.0	207.0	126.6
	Δ, %	-8.2	-62.1	+100	+462.7

ми в состав композита. После года экспозиции, как и при постановке опыта на почвенных субстратах, во всех образцах, кроме контрольного, было отмечено уменьшение массы. И если на среде Чапека–Докса с добавлением сахарозы и аналогичной среде без сахарозы с малым (0.5–1%) содержанием крахмала деструкция незначительна и находится в пределах погрешности эксперимента (снижение массы образцов не более 1.0%), то в варианте опыта без сахарозы при высоком (5%) содержании крахмала масса образца снизилась на 16.4%, что говорит о процессе деструкции композитов именно в условиях углеродного голодания.

Значения рН сред в процессе культивирования в течение 90 сут снизились с 6.7 до 3.3–4.3, что подтверждает протекание биохимических процессов – подкисление происходит в результате выделения в среду культивирования продуктов клеточного метаболизма.

На микрофотографиях (рис. 1) видно, что композит с содержанием крахмала 5 мас. % в сравнении с композитом, содержащим крахмал в концентрации 1 мас. % (рис. 1б), подвергся большим структурным изменениям, что выражено в появлении “кратеров” и подтверждает данные о достаточно активном процессе деструкции.

Таким образом, деструкция пленочных крахмалонаполненных композитов полиэтилена происходит и в жидких средах, то есть возможна при попадании композитов из таких материалов в водоемы, что, однако, также ведет к появлению частиц микропластика в окружающей среде.

Выделение и идентификация микроорганизмов, оказывающих наибольшее влияние на биодеструкцию пленочных образцов. Бактерии, выделенные непосредственно из почвы полигона ТБО на среде Чапека–Докса без глюкозы (источника углерода), разнообразны и представлены бациллами, псевдомонадами, клебсиеллой и агробактериями. Единственной доминирующей группой культивируемых бактерий, колонизирующей поверхность полиэтиленового композита в почвенной среде, оказались представители рода *Bacillus* (табл. 4).

На основании полученных данных можно сделать вывод, что бактерии рода *Bacillus* преимущественно колонизируют полиэтиленовые композиты и, возможно, могут играть важную роль в деструкции ПЭ. В литературе подтверждается способность бацилл частично влиять на деградацию ПЭ. *B. pumilus*, *B. cereus* и *B. halodenitrificans* способны нарушать структуру полиэтилена низкого давления через 120 сут воздействия (Nafchi et al., 2013), по другим источникам, идентифицированные

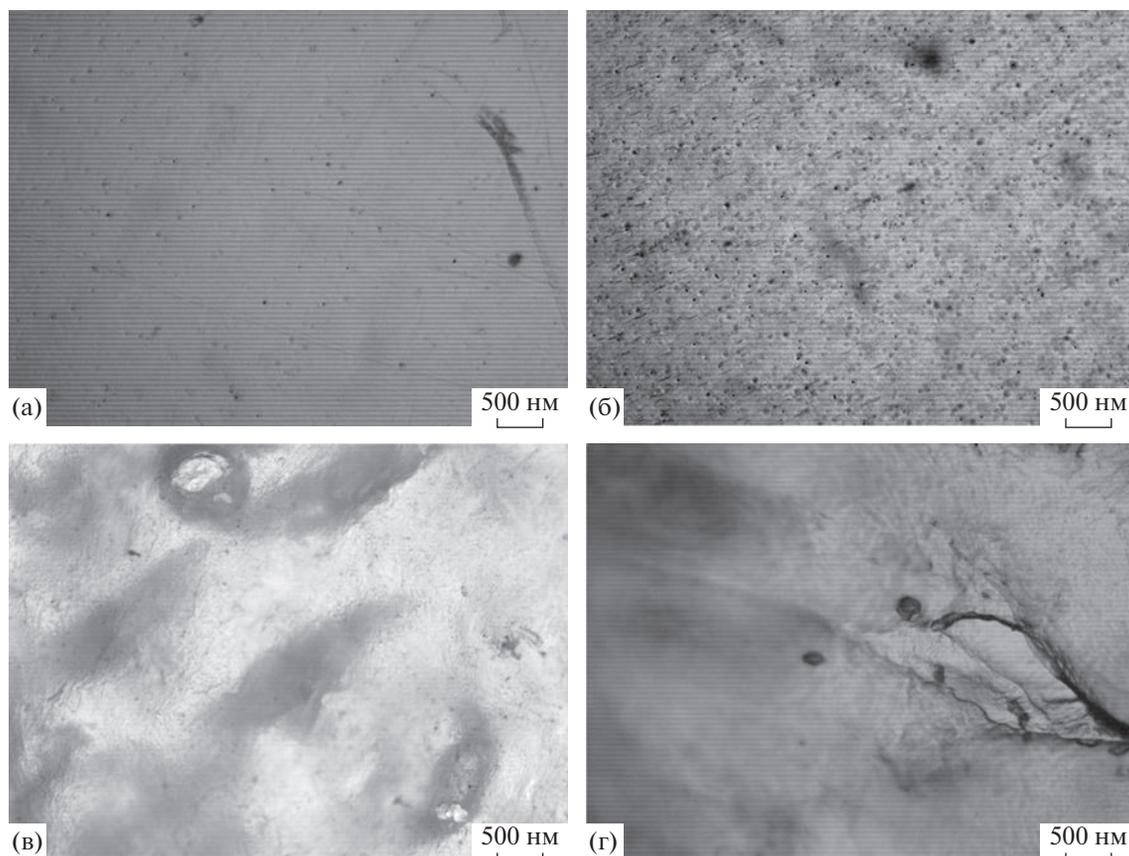


Рис. 1. Микрофотографии отмытых 40% этиловым спиртом (увеличение $\times 100$) композитов из полиэтилена высокой плотности и кукурузного крахмала до и после инкубирования в течение 1 года в среде Чапека–Докса без сахарозы: (а) – исходный ПЭВП с 1% крахмала; (б) – исходный ПЭВП с 5% крахмала; (в) – ПЭВП с 1% крахмала после инкубирования в питательной среде с микроорганизмами течение 1 года; (г) – ПЭВП с 5% крахмала после инкубирования в течение 1 года.

Таблица 4. Таксономическая принадлежность бактерий, выделенных с полиэтиленового композита с содержанием крахмала 5 мас. %, инкубированных в течение 20 сут при температуре $20 \pm 2^\circ\text{C}$

Изолят	Результат идентификации	Референтный штамм в базе данных NCBI	Процент сходства, %
E3_5	<i>Bacillus megaterium</i>	DSM 32T DSM	98.1 ± 0.1
E5_6	<i>Bacillus cereus</i>	994000168 LBK	95.5 ± 0.1
E11_14	<i>Bacillus mycoides</i>	DSM 2048T DSM	92.8 ± 0.11
E7_7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	19955_1 CHB	98.1 ± 0.1
F3_16	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> sp. <i>aurantiaca</i>	CIP 106718T HAM	96.4 ± 0.1
A6_9	<i>Klebsiella pneumoniae</i> spp. <i>pneumonia</i>	9295_1 CHB	95.7 ± 0.1
F7_18	<i>Agromyces mediolanus</i>	HNI108_DSM 20152T HKJ	97.1 ± 0.1
C4_1	<i>Bacillus megaterium</i>	DSM 32T DSM	93.4 ± 0.1
C6_2	<i>Bacillus cereus</i>	994000168 LBK	94.8 ± 0.1
C10_3	<i>Bacillus mycoides</i>	DSM 2048T DSM	95.1 ± 0.1

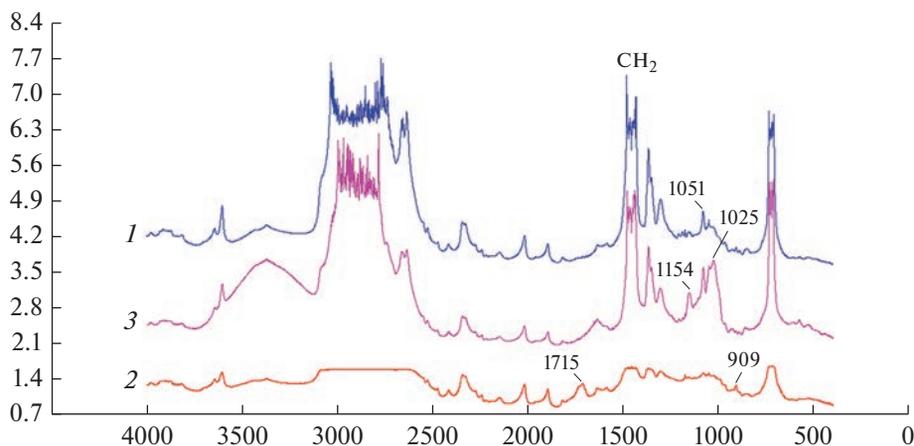


Рис. 2. ИК-спектры полиэтиленовых композитов с содержанием крахмала 5 мас. % без воздействия микроорганизмов и после биологической трансформации: 1 – полиэтиленовый композит с содержанием крахмала 5% (контроль); 2 – полиэтиленовый композит после обработки УФ-лучами; 3 – полиэтиленовый композит после 5 мес. биологической трансформации почвенными микроорганизмами.

нами *Pseudomonas aeruginosa* и *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* также проявляют способность к деградации ПЭ (Koutny et al., 2006; Sudhakar et al., 2008; Bensch et al., 2010, Dildi, 2011; Nowak et al., 2011; Wong, 2011; Rajandas et al., 2012; Агзамов и соавт., 2012; Blumenthal, Vochaton, 2013; Shah, 2013; Nafchi et al., 2013; Баранцевич, Баранцевич, 2014; RaziyaFathima, 2016; Encalada et al., 2018; Мазитова и соавт., 2021).

Также в присутствии композита из полиэтилена с содержанием 5 мас. % кукурузного крахмала как единственного источника углерода были выделены микроскопические грибы, принадлежащие, в соответствии с их определением исключительно по фенотипическим признакам, к родам *Aspergillus* (изолят 3.0, 3.3), *Trichoderma* (изолят 2.1, 3.1) и *Penicillium* (изолят 1.1).

Все идентифицированные таксоны микромицетов были протестированы на способность трансформировать поверхность полиэтиленовых композитов. Было оценено как индивидуальное, так и совместное действие микромицетов на структуру полимеров. Полиэтиленовый композит с полисахаридом амилозы и амилопектина имеет равномерное распределение наполнителя, что делает материал более гидрофильным.

Согласно результатам экспериментов, деградация (потеря массы 1.1%) композитов с содержанием крахмала 5 мас. % в жидких средах, характерна для полиэтиленовых композитов, обработанных сообществом микромицетов, куда входят изоляты 3.0, 3.3, 2.1, 3.1, 1.1, что предполагает определенное синергическое воздействие. Микромицеты обладают лигнинолитическим ферментами, преимущественно оксидантного типа действия, одним из основных ферментов этого комплекса является лакказа. Предполагается, что ПЭ также может

расщепляться окислительными ферментами лигнинолитического комплекса, как это было показано на примере бактерий *Bacillus* sp. и грибов *Aspergillus niger* и *A. oryzae*, выращенных на хитине (Shah et al., 2008).

При инкубировании полиэтиленовых композитов в почве наблюдали те же закономерности, выраженные в изменении их массы, но процент убыли массы полимеров под действием исследуемых микроорганизмов не превышает 0.9% при использовании культур *Penicillium* sp. (изолят 1.1) и *Trichoderma* sp. (изолят 3.1).

О степени трансформации полимерных композитов аборигенной почвенной микрофлорой судили по результатам ИК-спектроскопии (рис. 2).

Из рис. 2 видно, что после 5 мес. инкубации с почвенным микробным сообществом полиэтиленовые композиты претерпели изменения полимерной структуры. На ИК-спектре появляются полосы в области 1025 и 1154 cm^{-1} , по сравнению с исходным композитом снизилось содержание двойных связей, также наблюдали увеличение содержания СО-группы на 60%. Интенсивность полос в области 1200–1300 cm^{-1} также увеличилась. Это свидетельствует о присутствии различных промежуточных продуктов окисления, которые образуются при биологической трансформации композита полиэтилена, содержащего крахмал (Amer, 2006; Legonkova, 2006; Sudhakar, et al., 2008; Dildi, 2011; Nowak et al., 2011; Wong, 2011; Santo et al., 2013; Podkorytova, 2014; Берсенева, Кулемина, 2016; Nagarkar, Patel, 2019).

По данным микроскопирования и визуальной оценки воздействия микроорганизмов на полиэтиленовые композиты обнаружено, что топография их поверхности изменилась: исходно гладкая поверхность с незначительным количеством де-

фектов после 20 сут микробного воздействия покрылась неровностями и эрозиями, что стало более выраженным после 5 мес. воздействия микроорганизмов.

Таким образом, исследованы особенности биодеструкции и биологической трансформации композитов из бимодального полиэтилена высокой плотности и крахмала (0.5–5.0%). Выявлено, что в процессе исследований значительным изменениям (по физико-механическим показателям) подвергается образец ПЭВП с долей крахмала 5 мас. %. Установлено, что после одного года хранения исследуемого образца в виде пленки в почве и жидких питательных средах на его поверхности происходит существенный рост микроорганизмов, которые приводят к интенсификации выделения парниковых газов в результате деградации полимера.

Предположено, что в естественных условиях по мере воздействия температуры, влажности и других факторов окружающей среды на поверхности исследуемых композитов будут образовываться дефекты, наличие которых может способствовать проникновению внутрь микроорганизмов. Используя крахмал в качестве основного источника углерода, бактерии и грибы будут развиваться и, выделяя метаболиты, способствовать дополнительной деградации пленок, фрагментируя их. Предварительная длительная обработка УФ-облучением способствует ускорению биодegradации полиэтиленовых композитов.

Показано, что почвенные микроорганизмы, бактерии и микромицеты, способствуют уменьшению массы полимерных образцов и изменению соотношения различных функциональных групп (снизилось содержание двойных связей, также наблюдали увеличение содержания СО-группы на 60%), что говорит о способности к деструкции композитов из ПЭ. Доминирующими представителями среди культивируемых бактерий оказались представители рода *Bacillus*, а среди микромицетов преобладали изоляты *Penicillium*, *Trichoderma* и *Aspergillus*, способные наиболее активно изменять структуру полученных полимерных композитов. При этом наибольший эффект достигается при синергическом воздействии данных микромицетов.

В дальнейшем предполагается изучить амилаолитическую активность выделенных микроорганизмов, поскольку преимущественное потребление содержащегося в композите крахмала, как в почве, так и водной среде, очевидно, приводит к появлению микропластика, наличие которого в окружающей среде не способствует улучшению экологической обстановки. Необходимо, возможно, обратить внимание на создание композитов на основе биоразлагаемых полимеров, например, полилактоидов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Агзамов Р.З., Руссков Д.В., Минь Т.Т., Сироткин А.С., Спиридонова Р.Р.* О биологической деградации полимерных композиций на основе полиэтилена // Вестник Казанского технологического университета. 2012. Т. 15. № 18. С. 155–158.
- Agzamov R.Z., Russkov D.V., Min T.T., Sirotkin A.S., Spiridonova R.R.* On the biological degradation of polymer compositions based on polyethylene // Bulletin of Kazan Technological University. 2012. V. 15. № 18. P. 155–158.
- Баранцевич Е.П., Баранцевич Н.Е.* Применение MALDI-TOF масс-спектрометрии в клинической микробиологии // Трансляционная медицина. 2014. № 6. С. 23–28.
- Берсенева О.А., Кулемина О.А.* Полимеры нового поколения // Современная химия: Успехи и достижения / Материалы II Межд. науч. конф. (г. Чита, 2016 г.). С. 27–29.
- Berseneva O.A., Kulemina O.A.* New generation polymers // Modern Chemistry: Successes and Achievements / Materials of the II Int. Sci. Conf. (Chita, 2016). P. 27–29.
- Биоповреждения больничных зданий и их влияние на здоровье человека / Под ред. Щербо А.П., Антонова В.Б.. С.-Пб.: Изд-во С.-Пб. Мед. акад. послевуз. образов., 2008. С. 232.
- Bio-Damage of Hospital Buildings and Their Impact on Human Health / Ed. Shcherbo A.P., Antonova V.B. S.-Pb.: Publishing House S.-Pb. Honey. Acad. Postgraduate. Images, 2008. P. 232.
- Подкорытова А.В.* Морские растительные биополимеры // Межд. научно-практическая конф. “Биотехнология и качество жизни”. Москва, 2014. С. 498–499.
- Котова И.Б., Тактарова Ю.В., Цавкелова Е.А., Бонч-Осмоловская Е.А.* Микробная деградация пластика и пути ее интенсификации // Микробиология. 2021. Т. 90. С. 627–659.
- Kotova I.B., Taktarova Yu.V., Tsavkelova E.A., Bonch-Osmolovskaya E.A.* Microbial degradation of plastics and approaches to make it more efficient // Microbiology (Moscow). 2021. V. 90. P. 671–701.
- Литвинов М.А.* Методы изучения почвенных микроскопических грибов. М.: Наука, 1969. 123 с.
- Литвинов М.А.* Определитель микроскопических почвенных грибов. Л.: Наука, 1967. 303 с.
- Мазитова А.К., Аминова Г.К., Зарипов И.И., Вихарева И.Н.* Биоразлагаемые полимерные материалы и модифици-

- рующие добавки: современное состояние. Часть II // Нанотехнологии в производстве. Разработка новых полимерных материалов. 2021. Т. 13. С. 32–38.
<https://doi.org/10.15828/2075-8545-2021-13-1-32-38>
<https://takiedela.ru/news/2020/10/14/grinpis-plastikvotching-2/>.
- Патент РФ 2669865С1. Composition for obtaining biodegradable polymer material and biodegradable polymer material on it is basis, 2016.
- Суслова Т.Н., Никонорова В.Н., Сосновская Л.Б., Гилаева Г.В., Салахов И.И.* Оценка эффективности деструкции композиций на основе полиэтилена и крахмала // Вестник Казанского технологического университета. 2014. Т. 17. № 24. С. 120–123.
- Suslova T.N., Nikonorova V.N., Sosnovskaya L.B., Gilaeva G.V., Salakhov I.I.* Evaluation of the effectiveness of destruction of compositions based on polyethylene and starch // Bulletin of Kazan Technological University. 2014. V. 17. № 24. P. 120–123.
- Тасекеев М.С., Еремеева Л.М.* Производство биополимеров как один из путей решения проблем экологии и АПК: Аналит. обзор. Алматы: НЦ НТИ, 2009. С. 7.
- Aamer A.S.* Biological degradation of plastics: a comprehensive review // Biotechnol. Adv. 2006. V. 26. P. 246–265.
- Bensch K., Groenewald J.D., Dijksterhuis J., Starink-Willemse M., Andersen B., Summerell B.A., Shin H.-D., Dugan F.M., Schorers H.-J., Braun U., Grous R.W.* Species and ecological diversity within the *Cladosporium cladosporioides* complex (Davidiellaceae, Capnodiales) // Stud. Mycol. 2010. V. 67. P. 1–94.
<https://doi.org/10.3114/sim.2010.67.01>
- Blumenthal K., Bochaton L.* Archive: Waste indicators on generation and landfilling – monitoring sustainable development. – Access mode: Archive: Waste indicators on generation and landfilling – monitoring sustainable development – Statistics Explained (europa.eu) / Waste_indicators on generation and landfilling – monitoring sustainable development 2004–2010–2013.
- Encalada K., Aldás M.B., Proaño E., Valle V.* An overview of starch-based biopolymers and their biodegradability // Revista Ciencia e Ingeniería. 2018. V. 39. P. 245–258.
- Koutny M., Sancelme M., Dabin C., Pichon N., Delort A.-M., Lemaire J.* Acquired biodegradability of polyethylenes containing pro-oxidant additives // Polym. Degrad. Stab. 2006. V. 91. P. 1495–1503.
<https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2005.10.007>
- Dildi K.F.A.* Linear low density polyethylene – biodegradability using bacteria from marine benthic environment and photodegradability using ultraviolet light // Environmental Science. Kerala, India. 2011.
- Nagarkar R., Patel J.* Polyvinyl alcohol: a comprehensive study // Acta Sci. Pharm. Sciences. 2019. V. 3. № 4. P. 34–44.
- Nafchi A.M., Moradpour M., Saeidi M., Alias A.K.* Thermo-plastic starches: Properties, challenges, and prospects // Starch. 2013. V. 65. P. 61–72.
- Nakamae K., Nakano S., Tanigawa S.* // Jap. J. Polym. Sci. Technol. 1997. V. 54. № 8. P. 463–470.
- Nowak B., Pajak J., Drozd-Bratkowicz M., Rymarz G.* Microorganisms participating in the biodegradation of modified polyethylene films in different soils under laboratory conditions // Int. Biodeter. Biodegr. 2011. V. 65. P. 757–767.
- Rajandas H., Parimannan S., Sathasivam K., Ravichandran M., Yin L.S.* A novel FTIR-ATR spectroscopy based technique for the estimation of low-density polyethylene biodegradation // Polymer Testing. 2012. V. 31. P. 1094–1099.
- Raziya-fatima M.* Microbial degradation of plastic waste: a review // J. Pharma Chem. Biol. Sci. 2016. V. 4. P. 231–242.
- Roy P.K., Titus S, Surekha P., Tulsi E., Deshmukh C., Rajagopal C.* Degradation of abiotically aged LDPE films containing pro-oxidant by bacterial consortium // Polym. Degrad. Stab. 2008. V. 93. P. 1917–1922.
- Santo M., Weitsman R., Sivan A.* The role of the copper-binding enzyme – laccase – in the biodegradation of polyethylene by the actinomycete *Rhodococcus ruber* // Int. Biodeterior. Biodegr. 2013. V. 84. P. 204–210.
- Shah A.A.* Biodegradation of natural and synthetic rubbers: a review // Int. Biodeterior. Biodegr. 2013. V. 83. P. 145–157.
<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.05.004>
- Shah A.A., Hasan F., Hameed A., Ahmed S.* Biological degradation of plastics: A comprehensive review // Biotechnol. Adv. 2008. V. 26. P. 246–265.
- Sudhakar M., Doble M., Murthy P.S., Venkatesan R.* Marine microbe-mediated biodegradation of low- and high-density polyethylenes // Int. Biodeterior. Biodegr. 2008. V. 61. P. 203–212.
- Wong P.K.* Preparation and characterization of polymeric biocomposites using plant-based materials // A thesis submitted to the Department of Chemical Science, Faculty of Science, Universiti Tunku Abdul Rahman. 2011. P. 175.

Biodegradation Patterns of Composite Materials Based on High-Density Polyethylene and Starch

T. N. Suslova¹*, I. I. Salakhov¹, V. N. Nikonorova¹, G. V. Gilaeva¹, and O. M. Trifonova¹

¹PJSC “Nizhnekamskneftekhim”, Nizhnekamsk, 423574 Russia

*e-mail: a-r-x2010@mail.ru

Received July 17, 2022; revised May 29, 2023; accepted May 29, 2023

Abstract—The degradation properties of high-density polyethylene composites filled with amylose and amylopectin polysaccharides were studied. At low dosages of the polysaccharides (0.5% wt/wt), no change in vis-

cosity, molecular weight and physical and mechanical characteristics of HDPE samples were observed, while an increase in the proportion of the natural filler (starch) to 1 and 5% resulted in a decrease in mechanical properties, although the values of deformation and strength parameters satisfied the minimum necessary requirements for film packaging. After incubation in soil for one year, the sample of HDPE film with a corn starch content of 5% (wt/wt) was found to undergo the greatest changes in its properties. The study of ability of aerobic microorganisms to carry out the surface transformation of the studied film composites revealed that bacteria of the genus *Bacillus* efficiently colonized the polyethylene-starch composites. Among the identified microorganisms, micromycetes of the genus *Penicillium* and *Trichoderma* caused the most pronounced changes in the structure of the studied polymer composites, and the greatest effect was achieved in the case of synergistic action of different micromycetes genera.

Keywords: polyethylene, amylose and amylopectin polysaccharide, biodegradation, micromycetes

ВЫСОКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ УДАЛЕНИЯ ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ ПРИ ОЧИСТКЕ КОММУНАЛЬНЫХ СТОЧНЫХ ВОД ГОРОДА МОСКВЫ

© 2023 г. Ш. А. Бегматов^а, *, А. Г. Дорофеев^б, Н. В. Пименов^б, А. В. Марданов^а, Н. В. Равин^а

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

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

*e-mail: shabegmatov@gmail.com

Поступила в редакцию 03.04.2023 г.

После доработки 06.04.2023 г.

Принята к публикации 06.04.2023 г.

Несмотря на то, что большинство патогенных бактерий эффективно удаляются из сточных вод при их биологической очистке, некоторые патогены, в частности, *Arcobacter* могут сохраняться в очищенной воде. С помощью профилирования по генам 16S рРНК исследован состав микробных сообществ коммунальных сточных вод города Москвы до и после биологической очистки на Люберецких очистных сооружениях. В поступающей сточной воде преобладали фекальные загрязнители родов *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Arcobacter*, *Bacteroides*, *Streptococcus* и *Veillonella*, которые включают патогены человека. После очистки относительное содержание этих бактерий снижалось в 50–100 раз. В микробиоме очищенной воды преобладали бактерии, характерные для активного ила, в том числе, нитрификаторы *Nitrospira* и *Nitrosomonas*, а также фосфат- и гликоген-аккумулирующие микроорганизмы. Таким образом, патогенные бактерии, включая *Arcobacter*, эффективно удаляются на московских очистных сооружениях.

Ключевые слова: сточные воды, патоген, микробное сообщество, молекулярный анализ

DOI: 10.31857/S0026365623600153, **EDN:** BHXILR

Основной функцией очистных сооружений сточных вод является удаление из сточных вод органических и неорганических загрязнителей перед их сбросом в окружающую среду или направлением на повторное использование. Также очистные сооружения должны обеспечивать удаление из сточных вод фекальных загрязнителей и патогенных микроорганизмов (Kristensen et al., 2020). В число таких патогенов входят представители родов *Escherichia*, *Campylobacter*, *Salmonella* и *Shigella*, которые в процессе очистки сточных вод могут удаляться более чем на 99% (Mølgaard et al., 2002).

Обычно очистка сточных вод на крупных очистных сооружениях проходит в три этапа. Первый этап включает физические методы очистки воды (осветление), второй этап – биологическую очистку в биореакторах с активным илом (АИ), третий этап – окончательную доочистку воды, включающую обеззараживание с помощью ультрафиолетового облучения. Консорциум микроорганизмов АИ, развивающийся в биореакторах, осуществляет окисление органических веществ, удаляет азот и фосфаты. Поступающие со сточной водой микроорганизмы, в том числе патогены, могут адсор-

бироваться на частицах АИ и удаляться вместе с избыточным АИ, в результате чего в очищенной воде их доля оказывается намного более низкой (Mølgaard et al., 2002).

Обычно выявление фекальных загрязнителей и бактериальных патогенов проводится с применением классических методов – посева на селективные среды, либо с использованием ПЦР в реальном времени на маркерные гены. Скрининг на основе культивирования был “золотым” стандартом в оценке микробиологического качества сточных вод (Di Cesare et al., 2020). Однако эти методы обеспечивают детекцию только некоторых индикаторных видов, таких как *Escherichia coli* и другие энтеробактерии (Koivunen et al., 2003; Frigon et al., 2013). Поскольку многие патогены трудно культивировать в стандартных условиях, или их присутствие вообще не тестируют, реальная эффективность их удаления может оставаться неизвестной, что затрудняет оценку роли очистных сооружений в защите от попадания патогенных микроорганизмов в окружающую среду (Kristensen et al., 2020).

Применение молекулярных методов позволило расширить представления о разнообразии и ге-

нетическом потенциале микробных сообществ сточных вод и АИ очистных сооружений, а также о присутствии в них патогенных микроорганизмов (Hultman et al., 2018; Karaolia et al., 2021). Эти работы также показали, что, хотя большинство патогенов эффективно удаляются при биологической очистке сточных вод, некоторые из них (например, *Arcobacter*) сохраняются и входят в число доминирующих членов микробного сообщества и в очищенной воде (Kristensen et al., 2020).

Несмотря на то, что очистные сооружения Москвы являются одними из крупнейших в мире, большинство исследований связанных с ними микробных сообществ было выполнено классическими методами. Загайновой и соавт. (2022) с применением методов культивирования на всех этапах очистки были идентифицированы потенциально патогенные бактерии *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, *Raoultella ornithinolytica*, *Aeromonas hydrophila*, *A. caviae*, *A. molluscorum*, *Enterococcus hirae*, *E. faecium*, *E. faecalis*, *Clostridium perfringens*, *Streptococcus lutetiensis* и *S. suis*. Известно лишь несколько работ, в которых микробные сообщества сточных вод и активных илов очистных установок были исследованы с помощью современных молекулярно-генетических методов. Шеголькова и соавт. (2016) провели профилирование по генам 16S рРНК составов микробных сообществ сточных вод и активных илов на очистных сооружениях, обеспечивающих очистку городских сточных вод, сточных вод скотобоен и нефтеперерабатывающего завода. Содержание большинства известных патогенных микроорганизмов (*Streptococcus*, *Trichococcus* и др.), обнаруженных в поступающих на очистку сточных водах, значительно снижалось в активных илах (Shchegolkova et al., 2016). Структура микробных сообществ активных илов 9 крупномасштабных очистных сооружений коммунальных сточных вод г. Москвы была охарактеризована нами молекулярными методами (Begmatov et al., 2022). Однако в этих работах не проводился сравнительный анализ состава микробных сообществ сточных вод до и после очистки, что не позволяет выявить изменения их состава и определить эффективность удаления патогенных микроорганизмов.

Целью данного исследования являлась характеристика состава микробных сообществ сточной воды до и после биологической очистки на Люберецких очистных сооружениях г. Москвы. Этот комплекс очистных сооружений, имеющий производительность 3 млн м³/сут, является крупнейшим в Европе и обеспечивает прием и очистку хозяйственно-бытовых и промышленных сточных вод. Объектами исследования являлись образцы осветленной сточной воды после первичного отстаивания и воды, прошедшей биологическую очистку в биореакторе, использующем трехстадийный анаэробный/аноксидный/аэробный процесс, извест-

ный как технология Кейптаунского университета (UCT).

Химический состав воды определяли в испытательном центре “МГУЛАБ” с использованием методик ионной хроматографии и спектрофотометрии. Для характеристики состава микробного сообщества отбирали пробы воды (по 5 л), затем клетки собирали с помощью центрифугирования. Суммарную ДНК выделяли с помощью набора DNeasy Power Soil Pro Kit (“Qiagen”). Вариабельный V3–V4 регион гена 16S рРНК амплифицировали с использованием универсальных праймеров 341F (5'-CCTAYG GGDBGWCWSCAG) и 806R (5'-GGA CTA CNVGGG THTCTAAT) (Frey et al., 2016). ПЦР фрагменты секвенировали на Illumina MiSeq (в формате 2 × 300 нуклеотидов). Пересекающиеся парные чтения объединяли с помощью FLASH v.1.2.11 (Magoc et al., 2011). Прочтения из обоих образцов были объединены, исключены низкокачественные и химерные последовательности. Прошедшие фильтрацию последовательности фрагментов гена 16S рРНК были кластеризованы в оперативные таксономические единицы (ОТЕ) на уровне 97% идентичности. Для определения доли ОТЕ в каждом из образцов, на последовательности ОТЕ были наложены исходные чтения (включая низкокачественные и синглтоны) с минимальной идентичностью 97% на всей длине. Для выполнения всех этих процедур использовался пакет программ USEARCH v.11 (Edgar, 2010). Таксономическую идентификацию ОТЕ проводили с использованием алгоритма VSEARCH v.2.14.1 по базе данных SILVA v.138 (Rognes et al., 2016). Последовательности фрагментов гена 16S рРНК депонированы в базе NCBI Sequence Read Archive (SRA) и доступны через BioProject PRJNA945245.

Данные химического анализа сточных вод показали, что применяемая технология UCT позволяет эффективно удалить из сточных вод органические вещества (характеризуется биологическим и химическим потреблением кислорода), азот и фосфор (табл. 1).

Для характеристики состава сообществ было использовано 19750 и 14930 прошедших фильтрацию последовательностей фрагментов гена 16S рРНК для образцов сточной воды до и после очистки соответственно. На уровне вида в образцах было детектировано 1186 и 1467 ОТЕ. О более высоком разнообразии микробного сообщества очищенной воды свидетельствует и индекс Шеннона (5.45, в воде до очистки – 4.81).

Как и ожидалось, составы микробных сообществ сильно отличались. После очистки воды относительная численность 307 родов уменьшилась более чем в 2 раза, доли 306 родов увеличились более чем в 2 раза, а для 45 родов доли в сообществах существенно не изменились (изменения численности менее чем в 2 раза). В табл. 2

Таблица 1. Основные характеристики сточных вод

Показатель, единица измерения	Осветленная сточная вода	Очищенная сточная вода
Биохимическое потребление кислорода (за 5 сут инкубации), мг/дм ³	183 ± 26	1.31 ± 0.18
Химическое потребление кислорода, мг/дм ³	343 ± 51	58 ± 12
Ионы аммония, мг/дм ³	52.6 ± 4.2	<0.05
Нитрат ионы, мг/дм ³	<0.1	<0.1
Нитрит ионы, мг/дм ³	<0.1	0.17 ± 0.02
Сульфат ионы, мг/дм ³	53.3 ± 6.9	72.6 ± 9.4
Фосфат ионы, мг/дм ³	8.4 ± 1.1	0.74 ± 0.10

приведены данные об относительной численности родов, составлявших не менее 1% микробиома, в образцах осветленной сточной воды до биологической очистки (ОСВ) и в очищенной воде (ОЧВ).

Среди бактерий, преимущественно детектированных в ОСВ, преобладали представители фекальной микробиоты, которых часто обнаруживают в сточных водах: *Collinsella* (Azcarate-Peril et al., 2021), *Bacteroides*, *Prevotella*, *Arcobacter* (Fisher et al., 2014) и близкие к нему рода семейства *Arcobacteraceae*, *Blautia* (Koskey et al., 2014), *Faecalibacterium*, *Veillonella* и др. К потенциальным патогенам относятся представители *Bacteroides*, *Arcobacteraceae*, *Streptococcus*, *Acinetobacter*, *Aeromonas* и *Veillonella* (Altwegg et al., 1989; Wexler, 2007; Collado et al., 2011; Antunes et al., 2014), суммарная доля которых в ОСВ составляла 44.5% микробиома. Все эти бактерии эффективно удалялись при очистке и составляли лишь 1.2% сообщества в ОЧВ. В частности, эффективность удаления *Arcobacter* составляла более 98%, хотя ранее сообщалось о низкой эффективности удаления этого патогена из сточных вод (Kristensen et al., 2020). Ранее проведенные исследования 14 установок по очистке коммунальных сточных вод в Дании показали, что доля *Arcobacter* в поступающей на очистку воде составляла от 0.9 до 15%, а в полностью очищенной воде – от 1.6 до 13%, причем в их числе были обнаружены патогенные для человека *A. cryaerophilus* и *A. butzleri*. Поэтому распространение патогенных представителей рода *Arcobacter* со сточными водами может быть серьезной проблемой (Kristensen et al., 2020). Вероятно, АИ в Московских очистных сооружениях хорошо адсорбирует клетки *Ar-*

cobacter, в отличие от АИ установок, исследованных Kristensen et al. (2020).

В микробиоме очищенной воды преобладали бактерии, характерные для активных илов очистных сооружений и играющие важную роль в удалении азота (*Nitrospira* и *Nitrosomonas*) и фосфора (*Dechloromonas*), а также гликоген-аккумулирующие бактерии *Ca. Competibacter*. Многочисленность этих функциональных групп согласуется с высокой эффективностью удаления азота и фосфора. Также были обнаружены микроорганизмы филумов *Bacteroidota* (env.OPS_17), *Chloroflexi* (1-20, A4b класса *Anaerolineae*), *Proteobacteria* (*Chitinivorax*), *Nanoarchaeota* и *Patescibacteria*, входившие в число доминирующих групп в ранее охарактеризованных микробиомах активных илов московских очистных сооружений (Begmatov et al., 2022). По-видимому, эти бактерии размножаются в активном иле и, частично вымываясь из него, поступают в очищенную воду.

Таким образом, анализ состава микробных сообществ сточных вод на Люберецких очистных сооружениях показал, что все наиболее многочисленные в поступающей на очистку воде потенциальные патогены, включая представителей рода *Arcobacter*, удаляются с высокой эффективностью, их доли в микробиоме воды снижаются в 50–100 раз. Поскольку общая концентрация микроорганизмов в очищенной воде, как правило, на 2 порядка ниже, чем поступающих на очистку стоках (Kristensen et al., 2020), эффективность удаления патогенов оказывается еще выше.

Таблица 2. Изменение относительной численности доминирующих представителей микробных сообществ в результате очистки сточных вод

Филум	Род	Доля в ОСВ (%)	Доля в ОЧВ (%)
Рода, доля которых уменьшилась в очищенной воде			
<i>Actinobacteriota</i>	<i>Collinsella</i>	1.52	0.04
<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroides</i>	2.23	0.05
	<i>Cloacibacterium</i>	1.04	0.15
	<i>Macellibacteroides</i>	1.69	0.07
	<i>Prevotella_9</i>	1.11	0.03
	<i>Campylobacterota</i>	<i>Arcobacter</i>	13.89
<i>Campylobacterota</i>	Arcobacteraceae*	3.42	0.15
	<i>Pseudarcobacter</i>	1.66	0.05
	<i>Sulfurospirillum</i>	1.19	0.05
	<i>Firmicutes</i>	<i>Blautia</i>	2.22
<i>Faecalibacterium</i>		1.53	0.01
<i>Streptococcus</i>		12.30	0.23
<i>Trichococcus</i>		2.33	0.12
<i>Veillonella</i>		1.68	0.02
<i>Fusobacteriota</i>		<i>Hypnocyclicus</i>	1.94
<i>Proteobacteria</i>	<i>Acinetobacter</i>	6.71	0.35
	<i>Aeromonas</i>	2.59	0.16
	<i>Tolumonas</i>	1.26	0.01
Итого		60.30	1.80
Рода, доля которых увеличилась в очищенной воде			
<i>Bacteroidota</i>	env.OPS_17	0.03	1.02
<i>Chloroflexi</i>	1-20	0.06	1.39
	A4b	0.02	1.45
<i>Цyanobacteria</i>	Ancylothrix_8PC	0.00	1.23
	Tychonema_CCAP_1459-11B	0.00	2.98
<i>Nanoarchaeota</i>	<i>Woesearchaeales</i>	0.11	7.01
<i>Nitrospirota</i>	<i>Nitrospira</i>	0.18	3.68
<i>Patescibacteria</i>	Ca. Nomurabacteria	0.09	2.71
<i>Proteobacteria</i>	Ca. Competibacter	0.51	11.30
	<i>Chitinivorax</i>	0.01	1.32
	<i>Dechloromonas</i>	0.77	1.90
	<i>Nitrosomonas</i>	0.03	2.57
Итого		1.80	38.55

* Отдельный род семейства *Arcobacteraceae* в таксономии SILVA v.138.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант 22-74-00022, характеристика сточных вод и молекулярный анализ микробных сообществ) и Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Ш.А. Бегматов – выделение метагеномной ДНК, анализ последовательностей генов 16S рРНК, подготовка статьи; А.В. Марданов – секвенирование генов 16S рРНК; А.Г. Дорофеев и Н.В. Пименов – отбор образцов; Н.В. Равин – анализ данных и подготовка статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Загайнова А.В., Асланова М.М., Курбатова И.В., Ракова В.М., Федец З.Е., Пай Г.В., Грицюк О.В., Панькова М.Н., Ножвилов К.А., Абрамов И.А., Иванова П.А., Недачин А.Е., Автономова А.А., Стародубова Н.Ю., Савостикова О.Н. Оптимизация методов санитарно-микробиологического и санитарно-паразитологического контроля сточных вод // Гигиена и санитария. 2022. Т. 101. С. 545–555.

Altwegg M., Geiss H.K. *Aeromonas* as a human pathogen // Crit. Rev. Microbiol. 1989. V. 16. P. 253–286.

Antunes L.C, Visca P., Townner K.J. *Acinetobacter baumannii*: evolution of a global pathogen // Pathog Dis. 2014. V. 71. P. 292–301.

Azcarate-Peril M.A., Roach J., Marsh A., Chey W.D., Sandborn W.J., Ritter A.J., Savaiano D.A., Klaenhammer T.R. A double-blind, 377-subject randomized study identifies *Ruminococcus*, *Coprococcus*, *Christensenella*, and *Collinsella* as long-term potential key players in the modulation of the gut microbiome of lactose intolerant individuals by galacto-oligosaccharides // Gut Microbes. 2021. V. 13. Art. 1957536. <https://doi.org/10.1080/19490976.2021.1957536>

Begmatov S., Dorofeev A.G., Kadnikov V.V., Beletsky A.V., Pimenov N.V., Ravin N.V., Mardanov A.V. The structure of microbial communities of activated sludge of large-scale wastewater treatment plants in the city of Moscow // Sci. Rep. 2022. V. 12. Art. 3458. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-07132-4>

Collado L., Figueras M.J. Taxonomy, epidemiology, and clinical relevance of the genus *Arcobacter* // Clin. Microbiol. Rev. 2011. V. 24. P. 174–192.

Di Cesare A., De Carluccio M., Eckert E.M., Fontaneto D., Fiorentino A., Corno G., Prete P., Cucciniello R., Proto A., Rizzo L. Combination of flow cytometry and molecular analysis to monitor the effect of UVC/H₂O₂ vs UVC/H₂O₂/Cu-IDS processes on pathogens and antibiot-

ic resistant genes in secondary wastewater effluents // Water Res. 2020. V. 184. Art. 116194. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116194>

Edgar R.C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST // Bioinformatics. 2010. V. 26. P. 2460–2461.

Fisher J.C., Levican A., Figueras M.J., McLellan S.L. Population dynamics and ecology of *Arcobacter* in sewage // Front. Microbiol. 2014. V. 5. Art. 525. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00525>

Frey B., Rime T., Phillips M., Stierli B., Hajdas I., Widmer F., Hartmann M. Microbial diversity in European alpine permafrost and active layers // FEMS Microbiol. Ecol. 2016. V. 92. Art. fiw018. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw018>

Frigon D., Biswal B.K., Mazza A., Masson L., Gehr R. Biological and physicochemical wastewater treatment processes reduce the prevalence of virulent *Escherichia coli* // Appl. Environ. Microbiol. 2013. V. 79. P. 835–844.

Hultman J., Tamminen M., Pärnänen K., Cairns J., Karkman A., Virta M. Host range of antibiotic resistance genes in wastewater treatment plant influent and effluent // FEMS Microbiol. Ecol. 2018. V. 94. Art. fiy038. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiy038>

Karaolia P., Vasileiadis S., Michael S., Karpouzas D., Fatta-Kassinos D. Shotgun metagenomics assessment of the resistome, mobilome, pathogen dynamics and their ecological control modes in full-scale urban wastewater treatment plants // J. Hazard. Mater. 2021. P. 418. Art.126387. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126387>

Koivunen J., Siitonen A., Heinonen-Tanski H. Elimination of enteric bacteria in biological-chemical wastewater treatment and tertiary filtration units // Water Res. 2003. V. 37. P. 690–698.

Koskey A.M., Fisher J.C., Eren A.M., Ponce-Terashima R., Reis M.G., Blanton R.E., McLellan S.L. *Blautia* and *Prevotella* sequences distinguish human and animal fecal pollution in Brazil surface waters // Environ. Microbiol. Rep. 2014. V. 6. P. 696–704. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12189>

Kristensen J.M., Nierychlo M., Albertsen M., Nielsen P.H. Bacteria from the genus *Arcobacter* are abundant in effluent from wastewater treatment plants // Appl. Environ. Microbiol. 2020. V. 86. Art. e03044-19. <https://doi.org/10.1128/AEM.03044-19>

Magoc T., Salzberg S. FLASH: Fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies // Bioinformatics. 2011. V. 27. P. 2957–2963.

Mølgaard K., Nickelsen C., Jansen J. Hygienic quality of wastewater from municipal treatment plant. Report no. 684. Danish Environmental Protection Agency, Odense, Denmark. 2002. <https://www2.mst.dk/udgiv/publikationer/2002/87-7972-078-1/pdf/87-7972-080-3.pdf>

Rognes T., Flouri T., Nichols B., Quince C., Mahé F. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics // PeerJ. 2016. V. 4. <https://doi.org/10.7717/peerj.2584>

Shchegolkova N.M., Krasnov G.S., Belova A.A., Dmitriev A.A., Kharitonov S.L., Klimina K.M., Melnikova N.V., Kudryavtseva A.V. Microbial community structure of activated sludge in treatment plants with different wastewater compositions // Front. Microbiol. 2016. P. 7. Art. 90. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00090>

Wexler H.M. *Bacteroides*: the good, the bad, and the nitty-gritty // Clin. Microbiol. Rev. 2007. V. 20. P. 593–621.

High Efficiency of Removal of Pathogenic Microorganisms at Wastewater Treatment Plants in the City of Moscow

Sh. A. Begmatov^{1, *}, A. G. Dorofeev², N. V. Pimenov², A. V. Mardanov¹, and N. V. Ravin¹

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

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

**e-mail: shabegmatov@gmail.com*

Received April 3, 2023; revised April 6, 2023; accepted April 6, 2023

Abstract—While most pathogenic bacteria are efficiently removed from wastewater during biological treatment, some pathogens, notably *Arcobacter*, may be abundant in the purified water. Using 16S rRNA gene profiling, the composition of microbial communities of municipal wastewater in the city of Moscow was studied before and after biological purification at the Lyubertsy wastewater treatment plant. Fecal contaminants of the genera *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Arcobacter*, *Bacteroides*, *Streptococcus*, and *Veillonella*, which include human pathogens, predominated in the influent wastewater. After treatment, the relative abundance of these bacteria decreased by 50–100 times. Predominant organisms in the microbiome of the effluent water were bacteria characteristic of activated sludge, including the nitrifiers of the genera *Nitrospira* and *Nitrosomonas*, as well as phosphate- and glycogen-accumulating microorganisms. Thus, pathogenic bacteria, including *Arcobacter*, are effectively removed at the Moscow wastewater treatment plant.

Keywords: wastewater, pathogen, microbial community, molecular analysis

ОСОБЕННОСТИ ДЕСТРУКЦИИ ПОЛИЛАКТИДА В ПРИСУТСТВИИ
ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *BACILLUS*© 2023 г. В. В. Миронов^а, *, Е. С. Трофимчук^б, В. В. Острикова^а, А. В. Плуталова^б,
М. А. Москвина^б, А. А. Щелушкина^а, Е. В. Черникова^б, Д. Ш. Соколова^а^аИнститут микробиологии им. С.Н. Виноградского, Федеральный исследовательский центр
“Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071 Россия^бХимический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

*e-mail: 7390530@gmail.com

Поступила в редакцию 25.04.2023 г.

После доработки 10.05.2023 г.

Принята к публикации 11.05.2023 г.

В работе показано, что микроорганизмы рода *Bacillus* по-разному воздействуют на деструкцию упаковочного материала из полилактида. Деструкцию проводили на агаризованной среде при температуре 55°C и pH 5.9 в течение 14 сут. Впервые обнаружено, что при инкубации с культурой *B. licheniformis* S8 абиотический гидролиз значительно замедляется и проходит параллельно с основным – ферментативным с последовательным отщеплением мономерных звеньев от конца макромолекулы и образованием низкомолекулярных продуктов, используемых микроорганизмами в качестве субстрата, что способствует уменьшению массы полилактида на 5.1% при сохранении его молекулярной массы и снижении дисперсности молекулярных масс. В присутствии бактерий *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis* subsp. *spizizenii* и *B. subtilis* subsp. *inaquosorum* масса полимера не снижалась, однако значительно уменьшалась молекулярная масса, как при абиотическом гидролизе.

Ключевые слова: полилактид, биодеструкция, масса образца, молекулярная масса, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii*, *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum*

DOI: 10.31857/S0026365623600207, **EDN:** QOBSIK

Одним из решений глобальной угрозы загрязнения окружающей среды отходами с содержанием пластиков является замена трудноразлагаемых пластиков на биоразлагаемые из возобновляемых ресурсов (Ivleva et al., 2021). Среди таких полимеров особое внимание привлекает полилактид (ПЛ), который способен разлагаться как в окружающей среде, так и в условиях промышленного компостирования (Kale et al., 2007; Hosni et al., 2019; Миронов и соавт., 2022). Однако механизмы разложения ПЛ и роль микроорганизмов в его деградации при компостировании остаются малоизученными (Karamanlioglu et al., 2017). Считается, что микроорганизмы способны активно подключаться к разложению ПЛ только после его предварительной частичной деструкции в результате химического (абиотического) гидролиза или окисления до молекулярной массы примерно 10 кДа и ниже, т.е. когда полимер становится водорастворимым (Husárová et al., 2014). Однако в некоторых работах описано, что экзоферменты, которые выделяют микроорганизмы, могут влиять на разложение высокомолекулярного ПЛ, что сопровождается потерей массы полимера (Lee et al., 2016; Stepczyńska et al., 2018; Richert et al., 2021).

Опубликован ряд работ, посвященных микроорганизмам, вызывающим ферментативную деструкцию ПЛ. Способность разлагать ПЛ выявлена у некоторых представителей рода *Bacillus* (Yuan et al., 2020). Ранее нами было показано, что семейство *Bacillaceae*, включая бактерии рода *Bacillus*, является одним из основных в прокариотическом сообществе микроорганизмов компостируемых органических отходов в термофильной стадии, составляя 16–44% (Mironov et al., 2021a, 2021b). Ферменты, участвующие в деструкции ПЛ, принадлежат к классу гидролаз. К ним относятся, например, протеаза (*B. amyloliquefaciens*), эстераза и алкалаза (*B. licheniformis*) (Prema et al., 2014, 2015; Lee et al., 2016). Значительное влияние на биоразложение оказывают температура и pH среды (Jong et al., 2001; Mitchell et al., 2015). Скорость деструкции ПЛ значительно возрастает при достижении температуры стеклования этого полимера (~60°C) и pH ~ 12. Однако вопрос, связанный с определением роли ферментативного гидролиза при участии активных микроорганизмов в разложении ПЛ при повышенной температуре, остается дискуссионным.

Цель работы заключается в определении роли биоразложения на начальных стадиях гидролитической деструкции ПЛ в присутствии четырех чистых культур рода *Bacillus*, выделяющих экзоферменты класса гидролаз, которые могут проявлять каталитическую активность в гидролизе ПЛ.

Для исследования были выбраны микроорганизмы *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis* subsp. *spizizenii*, *B. subtilis* subsp. *inaquosorum*, выделенные нами ранее из компостируемых органических отходов, и штамм *B. licheniformis* S8, выделенный сотрудниками лаборатории нефтяной микробиологии из рассолов соленого озера Эльтон (Волгоградская обл.) (Соколова, 2013). Посев культур бактерий производили на плотной агаризованной среде в чашках Петри (триптон – 1 г л⁻¹, дрожжевой экстракт – 2.5 г л⁻¹, глюкоза – 1 г л⁻¹, агар – 1.5%; рН 5.9). На каждую чашку помещали по три пленки ПЛ. Предварительно пленки взвешивали и обеззараживали спиртом. В качестве контрольных были использованы варианты с добавлением в чашки Петри стерильной дистиллированной воды. Пленки инкубировали при 55°C в течение 14 сут. В работе использовали образцы аморфных пленок ПЛ (средняя молекулярная масса M_n 76 кДа, дисперсия молекулярных масс D_M 2.2; температуры: стеклования $T_{ст}$ 63°C, кристаллизации $T_{крист}$ 119°C, плавления $T_{пл}$ 149°C; концентрация воды в объеме ПЛ 1.2 мас. %) размером 5 × 5 (±1) мм и толщиной 200 (±5) мкм, вырезанные из промышленного изделия (прозрачный лоток, производитель – компания “NatureWorks”, США). Средние молекулярные массы полимеров определяли методом гелъпроникающей хроматографии (ГПХ) на хроматографе 1260 Infinity II GPC/SEC Multidetector System (“Agilent”, США), оснащенный рефрактометрическим и вискозиметрическим детекторами, а также детектором светорассеяния и двумя колонками PLgel 5 μm MIXED B. В качестве растворителя использовали тетрагидрофуран. Молекулярные массы определяли по калибровочной кривой с использованием узкодисперсных стандартов ПММА ($M = 5 \times 10^2 - 1 \times 10^7$). Оценку потери массы образцов ПЛ проводили гравиметрически с помощью аналитических весов Pioneer PX224 (“OHAUS”, Китай). Морфологию ПЛ изучали методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) на микроскопе Jeol JSM-IT200 (“JEOL”, Япония) в ЦКП “Коллекция UNIQEM” ФИЦ Биотехнологии РАН при ускоряющем напряжении 15 кВ. Предварительно образцы напыляли слоем золота толщиной 25 нм на установке IB-3 (“Eiko”, Япония). Данные обрабатывали методом дисперсионного анализа при уровне значимости $p < 0.05$ с использованием пакета Microsoft Excel 2010 (“Microsoft”, США). Коэффициенты Стьюдента были

определены для доверительной вероятности $\alpha = 0.95$.

В наших опытах после инкубации с культурой *B. licheniformis* S8 наблюдалось уменьшение дисперсности молекулярных масс ПЛ от 2.2 до 1.85, что указывает на некоторое уменьшение разброса макромолекул по молекулярным массам, при этом M_n практически не изменялась – на 8% при ошибке метода ГПХ 5%. Однако в случае использования культур *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis* subsp. *spizizenii*, *B. subtilis* subsp. *inaquosorum* происходило существенное уменьшение молекулярной массы ПЛ: M_n менялась от 76 до 35 кДа, а дисперсность по молекулярным массам сохранялась на том же уровне. Очевидно, что механизм разложения ПЛ в присутствии различных представителей рода *Bacillus* различался. Гравиметрический анализ показал, что под действием культуры *B. licheniformis* S8 масса пленок полимера уменьшилась на $5.07 \pm 0.04\%$, а под действием остальных культур изменение массы образцов не обнаружено. Воздействие микроорганизмов на пленки исследовали методом СЭМ. Во всех вариантах инкубации с культурами поры на поверхностях образцов были немногочисленны, но на них присутствовали микроорганизмы и продукты их жизнедеятельности (рис. 1, в1–е1), особенно заметные в случае культур *B. amyloliquefaciens* (рис. 1, г1), *B. subtilis* subsp. *spizizenii* (рис. 1, д1) и *B. subtilis* subsp. *inaquosorum* (рис. 1, е1). Вероятнее всего, бактерии прикреплялись на поверхность пленки, а их гидролитически активные ферменты проникали через поры в объем полимера вместе с водой, ускоряя процессы разложения. Микроскопия сколов образцов показывает, что в объеме ПЛ после инкубации с культурами наблюдалось большое количество пор $(1.8-7.4) \times 10^4$ мм⁻² с размерами 0.15–1.6 мкм (рис. 1, в2–е2; табл. 1). Распределения образовавшихся пор по размерам для каждого случая представлены на рис. 1 (в3–е3).

В качестве контрольного эксперимента пленку ПЛ помещали в стерильную дистиллированную воду при 55°C на 14 сут. В этом случае масса пленки не изменялась, но в то же время M_n снижалась с 76 до 29 кДа. На микрофотографиях видно, что и в этих условиях образовывались поры субмикронного уровня на поверхности (рис. 1, б1) и в объеме (рис. 1, б2) полимера, концентрация которых составляла 1.1×10^5 мм⁻² (табл. 1). Эти результаты свидетельствуют о протекании достаточно активного химического (абиотического) гидролиза ПЛ со статистическим разрывом цепей и понижением температуры стеклования полимера. При этом снижение молекулярной массы ПЛ, а также концентрация образовавшихся в объеме пор в контроле с водой значительно, чем с культурами *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*

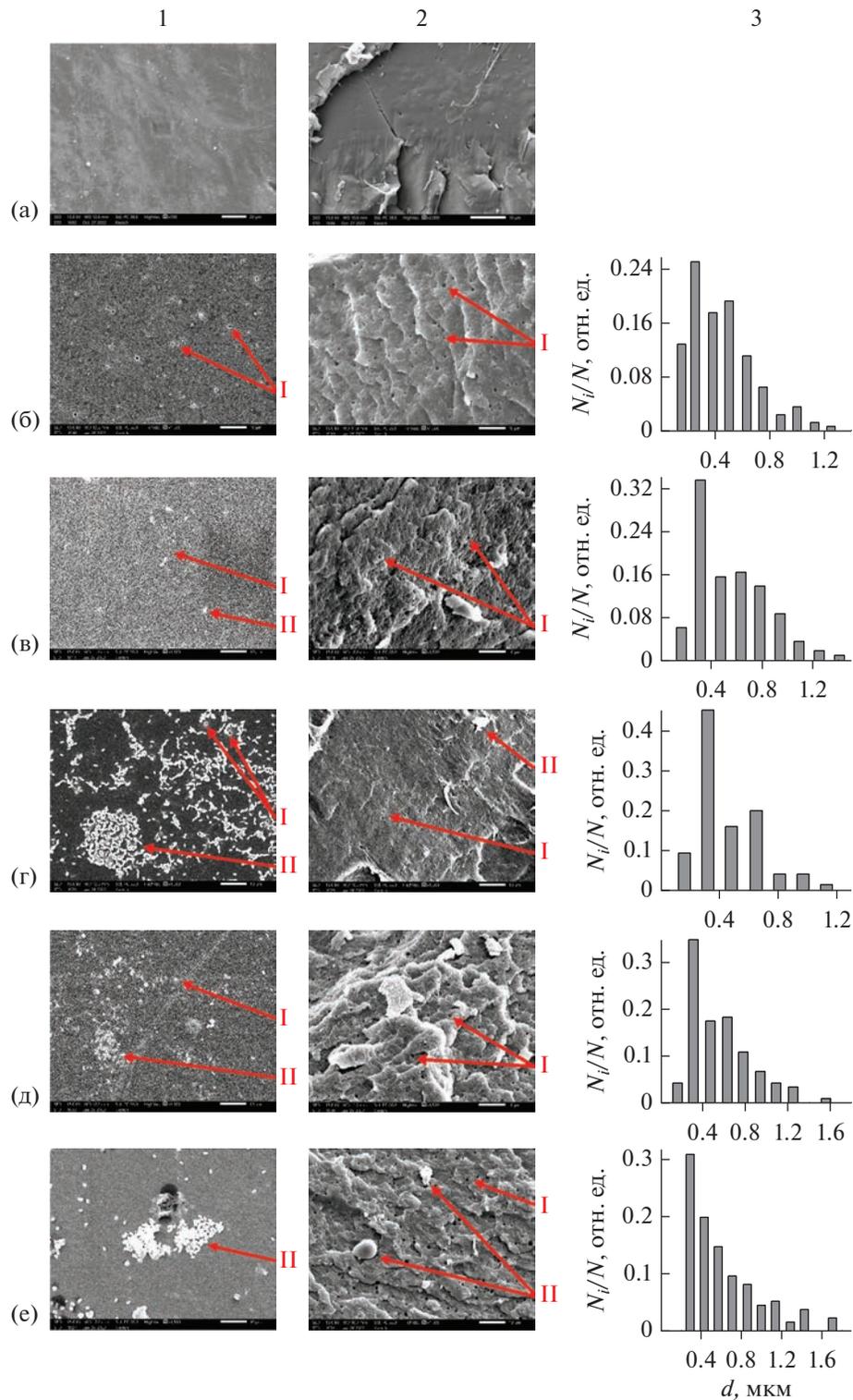


Рис. 1. СЭМ микрофотографии поверхности (1), скола (2) образцов ПЛ и распределение пор по размерам в объеме (3): исходный (а), контроль с водой (б) и после инкубации с *B. licheniformis* S8 (в), *B. amyloliquefaciens* (г), *B. subtilis* subsp. *spizizenii* (д) и *B. subtilis* subsp. *inaquosorum* (е). I – поры; II – клетки микроорганизмов и продукты их жизнедеятельности; d – диаметр пор, мкм; N_i/N – отношение количества пор i -го диаметра к общему количеству пор.

Таблица 1. Характеристики образцов ПЛ после их выдерживания при 55°C в течение 14 сут в присутствии различных микроорганизмов

Условия	Потеря массы, %	Молекулярно-массовые характеристики		Параметры пористой структуры	
		M_n , кДа	\bar{M}_w	d_{cp} , мкм	количество пор на 1 мм ²
Образец без обработки	—	76	2.2	—	—
H ₂ O, стерильная	0	29	1.94	0.44	1.1×10^5
Агар, <i>B. licheniformis</i> S8	5.1	67	1.86	0.55	4.8×10^4
Агар, <i>B. amyloliquefaciens</i>	0	35	2.07	0.45	1.8×10^4
Агар, <i>B. subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i>	0	38	1.94	0.56	5.2×10^4
Агар, <i>B. subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i>	0	Нд	Нд	0.61	7.4×10^4

subsp. *inaquosorum* и *B. subtilis* subsp. *spizizenii*. Ранее в работе Pantani et al. (2016) было доказано, что вода диффундировала в объем образца и, действуя как пластификатор, понижала температуру стеклования полимера. Подвижность сегментов макромолекул возрастала, что приводило к кристаллизации ПЛ, увеличению концентрации воды в его аморфных областях и ускорению абиотического гидролиза.

В работах Zaaba et al. (2020) и Jong et al. (2001) показано, что деструкция ПЛ с разрывом сложноэфирной связи основной цепи может проходить по двух механизмам: (i) быстро, с последовательным отщеплением мономерных звеньев от конца макромолекулы или (ii) медленно, случайным образом со статистическим разрывом цепей ПЛ. В первом случае средняя молекулярная масса практически не изменяется, а во втором — она снижается в ходе эксперимента. Известно (Belbella et al., 1996), что в случае абиотического гидролиза деполимеризация с отщеплением концевых групп, как правило, протекает в щелочных (при pH 9 и выше) или в очень кислых средах (pH ниже 2); в этих условиях происходит значимое уменьшение массы полимерного образца при мало изменяющейся молекулярной массе. Такие процессы по механизму (i) обычно протекают достаточно быстро (по крайней мере, быстрее, чем статистический разрыв). В других условиях (в нейтральной и слабокислой средах) масса образца обычно долго остается постоянной, а его молекулярная масса начинает достаточно быстро уменьшаться, что соответствует механизму (ii). Важно отметить, что при реализации механизма (ii) скорость деструкции в объеме может увеличиваться в результате накопления кислых продуктов реакции и автокатализа, чего не происходит в щелочных средах. Поэтому для механизма (i) скорость гидролитиче-

ской деструкции на поверхности гораздо выше, чем в объеме (условия для поверхностной эрозии), а для механизма (ii), напротив, скорость в объеме, как правило, выше.

Среда, использованная в данном эксперименте, имеет pH 5.9, что, по данным Schliecker et al. (2003), не оказывает существенного влияния на скорость разложения ПЛ по сравнению с нейтральной средой (контроль в воде). Однако в присутствии *B. licheniformis* S8 реализуется механизм (i), что, вероятно, указывает на биоразложение высокомолекулярного ПЛ уже на начальном этапе деструкции. Важным остается вопрос, почему не происходит деструкции полимера по механизмам (i) и (ii) одновременно. Вероятно, скорости этих реакций различаются по крайней мере на порядок, поэтому при начале деструкции по механизму (i) протеканием второй реакции можно пренебречь. Также нужно учитывать небольшую концентрацию воды (1.2 мас. %), которая содержится в объеме гидрофобного ПЛ. Поскольку одна молекула воды разрывает одну сложноэфирную связь, то есть выбор — оторвать концевую группу (деполимеризация) или в центре макромолекулы (статистический разрыв). Если есть условия для быстрой деполимеризации, например, с участием эстеразы *B. licheniformis* (Prema et al., 2015), тогда молекулы воды в основном будут тратиться на этот механизм, а на статистический разрыв полимера молекул воды будет расходоваться небольшое количество. В то же время, процесс деполимеризации макромолекул с образованием низкомолекулярных продуктов на поверхности, где воды достаточно, протекает быстро, что приводит к поверхностной эрозии и уменьшению массы образца за счет использования микроорганизмами низкомолекулярных продуктов в качестве субстрата. Таким образом,

установлено, что при инкубации с культурой *B. licheniformis* S8 вероятность протекания абиотического гидролиза значительно снижается и проходит параллельно с основным – ферментативным по механизму (i) с последовательным отщеплением мономерных звеньев от конца макромолекулы и образованием низкомолекулярных продуктов, используемых микроорганизмами в качестве субстрата.

Инкубация ПЛ с культурами *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis* subsp. *spizizenii*, *B. subtilis* subsp. *inaquosorum* не сопровождалась потерей массы пленок, однако молекулярная масса полимера заметно падала, а также изменялась морфология поверхности и сколов пленок. Можно предположить, что в этом случае деструкция проходила по механизму (ii) со случайным разрывом цепей ПЛ по всему объему полимерной пленки. Данные результаты свидетельствуют о протекании абиотического гидролиза, как и в экспериментах с водой. Причина снижения скорости биоразложения заключается в постепенном уменьшении массовой доли воды в среде за счет испарения. Вероятно, биоразложение в данном случае начинается после значительного уменьшения молекулярной массы ПЛ.

Таким образом, в работе впервые установлено наличие микробной деструкции ПЛ на начальных стадиях деструкции без стадии предварительного уменьшения молекулярной массы полимера (*B. licheniformis* S8). Показано, что мезофильные микроорганизмы *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis* subsp. *spizizenii* и *B. subtilis* subsp. *inaquosorum* не способны разлагать ПЛ при повышенной температуре на начальных стадиях процесса. Полученные результаты способствуют лучшему пониманию механизмов микробной деструкции и целенаправленному выбору штаммов микроорганизмов-деструкторов ПЛ.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена с использованием оборудования, приобретенного за счет средств Программы развития Московского университета.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-24-00237, <https://rscf.ru/project/23-24-00237/>.

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

- Миронов В.В., Трофимчук Е.С., Загустина Н.А., Иванова О.А., Вантеева А.В., Бочкова Е.А., Острикова В.В., Чжан Ш. Твердофазная биодegradация полилактида (обзор) // Прикл. биохимия и микробиология. 2022. Т. 58. С. 537–550.
- Mironov V.V., Trofimchuk E.S., Zagustina N.A., Ivanova O.A., Vanteeva A.V., Bochkova E.A., Ostriкова V.V., Zhang S. Solid-phase biodegradation of polylactide (review) // Appl. Biochem. Microbiol. 2022. V. 58. P. 537–550.
- Соколова Д.Ш. Образование биоэмульгаторов и поверхностно-активных веществ галотолерантными и термотолерантными штаммами *Bacillus licheniformis* S10 и S8 // Материалы Седьмого московского межд. конгресса “Биотехнология: состояние и перспективы развития”. Москва. 19–22.03.2013. Ч. 2. С. 206.
- Belbella A., Vauthier Ch., Fessi H., Devissaguet J.-Ph., Puisseux F. *In vitro* degradation of nanospheres from poly(D,L-lactides) of different molecular weights and polydispersities // Int. J. Pharmaceut. 1996. V. 129. P. 95–102.
- Mironov V., Vanteeva A., Sokolova D., Merkel A., Nikolaev Y. Microbiota dynamics of mechanically separated organic fraction of municipal solid waste during composting // Microorganisms. 2021a. V. 9. Art. 1877.
- Mironov V., Vanteeva A., Merkel A. Microbiological activity during co-composting of food and agricultural waste for soil amendment // Agronomy. 2021b. V. 11. Art. 928.
- De Jong S., Arias E., Rijkers D., van Nostrum C., Bosch J.K.-V.D., Hennink W. New insights into the hydrolytic degradation of poly(lactic acid): Participation of the alcohol terminus // Polymer. 2001. V. 42. P. 2795–2802.
- Hosni A.S., Pittman J.K., Robson G.D. Microbial degradation of four biodegradable polymers in soil and compost demonstrating polycaprolactone as an ideal compostable plastic // Waste Manag. 2019. V. 97. P. 105–114.
- Husárová L., Pekárová S., Stloukal P., Kucharzcy P., Verney V., Commereuc S., Ramone A., Koutny M. Identification of important abiotic and biotic factors in the biodegradation of poly(l-lactic acid) // Int. J. Biol. Macromol. 2014. V. 71. P. 155–162.
- Ivleva N.P. Chemical analysis of microplastics and nanoplastics: challenges, advanced methods, and perspectives // Chem. Rev. 2021. V. 121. P. 11886–11936.
- Kale G., Auras R., Singh S.P. Comparison of the degradability of poly(lactide) packages in composting and ambient exposure conditions // Packag. Technol. Sci. 2007. V. 20. P. 49–70.
- Karamanlioglu M., Preziosi R., Robson G.D. Abiotic and biotic environmental degradation of the bioplastic polymer poly(lactic acid): a review // Polym. Degrad. Stab. 2017. V. 137. P. 122–130.
- Lee S.H., Yeo S.Y. Improvement of hydrophilicity of polylactic acid (PLA) fabrics by means of a proteolytic enzyme from *Bacillus licheniformis* // Fibers and Polymers. 2016. V. 17. P. 1154–1161.

- Mitchell M.K., Hirt D.E. Degradation of PLA fibers at elevated temperature and humidity // Polym. Eng. Sci. 2015. V. 55. P. 1652–1660.
- Prema S., Uma Maheswari Devi Palempalli. Degradation of polylactide film by depolymerase from *Bacillus amyloliquefaciens* // Int. J. Sci. Engin. Res. 2014. V. 5. P. 520–525.
- Prema S., Uma Maheswari Devi Palempalli. Degradation of polylactide plastic by PLA depolymerase isolated from thermophilic *Bacillus* // Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci. 2015. V. 4. P. 645–654.
- Pantani R., De Santis F., Auriemma F., De Rosa C., Di Girolamo R. Effects of water sorption on poly(lactic acid) // Polymer. 2016. V. 99. P. 130–139.
- Richert A., Dąbrowska G.B. Enzymatic degradation and biofilm formation during biodegradation of polylactide and polycaprolactone polymers in various environments // Int. J. Biol. Macromol. 2021. V. 176. P. 226–232.
- Schliecker G., Schmidt C., Fuchs S., Kissel T. Characterization of a homologous series of d,l-lactic acid oligomers; a mechanistic study on the degradation kinetics *in vitro* // Biomaterials. 2003. V. 24. P. 3835–3844.
- Stepczyńska M., Rytlewski P. Enzymatic degradation of flax-fibers reinforced polylactide // Int. Biodeterior. Biodegr. 2016. V. 126. P. 160–166.
- Yuan J., Ma J., Sun Y., Zhou T., Zhao Y., Yu F. Microbial degradation and other environmental aspects of microplastics/plastics // Sci. Total Environ. 2020. V. 715. Art. 136968.
- Zaaba N.F., Jaafar M. A review on degradation mechanisms of polylactic acid: hydrolytic, photodegradative, microbial, and enzymatic degradation // Polym. Eng. Sci. 2020. V. 60. P. 2061–2075.

Poly lactide Degradation in the Presence of Members of the Genus *Bacillus*

V. V. Mironov¹, *, E. S. Trofimchuk², V. V. Ostriko¹, A. V. Plutalova², M. A. Moskvina², A. A. Shchelushkina¹, E. V. Chernikova², and D. S. Sokolova¹

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

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

*e-mail: 7390530@gmail.com

Received April 25, 2023; revised May 10, 2023; accepted May 11, 2023

Abstract—Microorganisms of the genus *Bacillus* were shown to have different effects on the degradation of polylactide packaging material. The degradation experiment was carried out on an agar medium at a temperature of 55°C and pH 5.9 for 14 days. This is the first report on the abiotic hydrolysis significantly slowing down during incubation with *B. licheniformis* S8 and occurring in parallel with the main process, enzymatic hydrolysis. The latter involved sequential cleavage of monomer units from the end of the macromolecule and the formation of low molecular weight products used by microorganisms as a substrate; it contributed to a decrease in the mass of polylactide by 5.1%, while maintaining its molecular weight and decreasing the dispersion of molecular weights. In the presence of bacteria *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis* subsp. *spizizenii*, and *B. subtilis* subsp. *inaquosorum*, the polymer weight did not decrease, but the molecular weight decreased significantly, similar to abiotic hydrolysis.

Keywords: polylactide, biodegradation, sample weight, molecular weight, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii*, *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum*