

ISSN 0026-3656

Том 93, Номер 2

Март – Апрель 2024



# МИКРОБИОЛОГИЯ



НАУКА

— 1727 —

# СОДЕРЖАНИЕ

Том 93, номер 2, 2024

## КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

- Планктонные микробные сообщества термокарстовых озер центральной Якутии демонстрируют высокое разнообразие некультивируемых прокариот с неохарактеризованными функциями  
*О. С. Самылина, О. И. Габышева, В. А. Габышев, Кадников В. В., А. В. Белецкий, А. И. Косякова, А. Ю. Каллистова, Н. В. Пименов* 101
- Метагеномный анализ осадков карстового меромиктического озера Черный Кичиер выявил большое количество некультивируемых *Thermoplasmatota*  
*В. В. Кадников, А. С. Саввичев, И. И. Русанов, А. В. Белецкий, Н. В. Пименов* 109
- Одностадийная биотрансформация фитостерина в тестостерон рекомбинантными штаммами *Mycolicibacterium neoaurum*  
*Д. Н. Текучева, М. В. Карпов, В. В. Фокина, Т. И. Тимакова, А. А. Шутов, М. В. Донова* 115
- Продукционный потенциал соленой р. Чернавка (Приэльтонье)  
*Т. А. Канапацкий, О. С. Самылина, Л. В. Головатюк, И. И. Русанов, Е. Е. Захарова, В. В. Кевбрин, Т. Д. Зинченко, Н. В. Пименов* 122
- Биотехнологический потенциал микробиома почв  
*Н. А. Манучарова, А. П. Власова, М. А. Коваленко, Е. А. Овчинникова, А. Д. Бабенко, Г. А. Терегулова, Г. В. Уваров, А. Л. Степанов* 128
- Идентификация переноса электронов в системе ферредоксинов и ферредоксинредуктаз *Mycolicibacterium smegmatis*  
*Д. О. Эпиктетов, М. В. Карпов, М. В. Донова* 133
- Создание векторов для редактирования генома дрожжей-сахаромицетов на основе системы CRISPR-Cas9  
*А. Г. Матвеев, А. С. Михайличенко, Г. А. Журавлева* 139
- Rhodococcus qingshengii* G1Mm1 как основа биосенсора для определения фунгицида карбендазима  
*Т. Н. Кувичкина, Е. Н. Капаруллина, Н. В. Доронина, А. Н. Решетилов* 145
- Новый галоалкалофильный представитель рода *Salisediminibacterium*, способный эффективно восстанавливать хромат  
*А. В. Игнатенко, Т. В. Хижняк* 149
- Биопленки со стен Каповой пещеры как источник продуцентов гидролаз  
*У. Курди, Г. Ю. Яковлева, О. Н. Ильинская* 154
- Биогеография бактериальных сообществ планктона и бентоса оз. Хубсугул (Монголия)  
*О. И. Белых, А. Ю. Краснопеев, Е. Г. Сорокикова, С. А. Потапов, Жадамбаа Н., Т. И. Белых, И. В. Тихонова* 159
- Активность грибов рода *Trichoderma*, выделенных в Восточной Сибири, против фитопатогенных микроорганизмов  
*В. Е. Кузнецова, Е. А. Матвеева, Л. А. Беловежец* 164
- Бактериальные сообщества, ассоциированные с пресноводным моллюском *Kamtschaticana kamtschatica* (Middendorff, 1850), в Северо-восточной Сибири  
*А. С. Аксенов, О. Я. Кисиль, А. С. Червоchina, И. С. Хребтова, К. С. Манцурова, Ю. В. Беспалая, О. В. Аксенова* 168

Влияние модификаций О-полисахаридов на успешность бактериальной колонизации растений <i>Г. Л. Бурьгин, А. А. Ханина, М. В. Филиппова</i>	173
Пептидные паттерны МАМР бактериальных флагеллинов и их взаимодействия с растительными рецепторами: биоинформатический и коэволюционный аспекты <i>С. Ю. Щеголев, Г. Л. Бурьгин, Ю. В. Красова, Л. Ю. Матора</i>	179
Экспрессия гена Р450-монооксигеназы гриба <i>Curvularia</i> sp. в бактериях <i>Escherichia coli</i> и подтверждение функции 7-гидроксилирования <i>В. В. Коллеров, С. В. Тарлачков, А. А. Шутов, М. В. Донова</i>	189
Влияние белка PotN на активность белков GlnR и PotA в клетках <i>Lentilactobacillus hilgardii</i> <i>З. И. Исхакова, Д. Э. Журавлева, А. Р. Каюмов</i>	193
Специфический ответ бактериальных клеток на действие β-иона <i>Д. Е. Сидорова, О. Е. Мелькина, О. А. Кокшарова, Е. Н. Вагнер, И. А. Хмель, В. А. Плюта</i>	198
Влияние стоков очистных сооружений на распространение антибиотикорезистентных микроорганизмов в водной среде <i>Т. Ю. Измалкова, О. И. Сазонова, И. А. Кошелева.</i>	203
Влияние биоаугментации <i>Bacillus subtilis</i> , <i>B. amyloliquefaciens</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> на эффективность компостирования пищевых отходов <i>В. В. Миронов, А. А. Щелушкина, В. В. Острикова, А. А. Клюкина, А. В. Вантеева, И. А. Мольдон, В. Г. Жуков, И. Б. Котова, Ю. А. Николаев</i>	208
T4-подобные цианофаги оз. Байкал: генетическое разнообразие и биогеография <i>С. А. Потапов, И. В. Тихонова, Е. Л. Кречетова, О. И. Белых</i>	213
Фекальная микробиота забайкальских верблюдов ( <i>Camelus bactrianus</i> ) при различных условиях содержания <i>Е. В. Лаврентьева, Т. Г. Банзаракцаева, Д. Д. Цыренова, В. Б. Дамбаев, Ш. А. Бегматов, А. В. Марданов, Д. Д. Бархутова</i>	217
Активность щелочной фосфатазы и фосфатаза-активные бактерии в водной толще оз. Байкал и его основных притоках <i>М. Ю. Суслова, Г. В. Подлесная, И. В. Томберг, М. В. Сакирко, О. И. Белых</i>	223
Деструкция биопленок грамположительных и грамотрицательных бактерий сериновой протеазой PapC из <i>Aspergillus ochraceus</i> <i>Д. Р. Байдамшина, А. Рафия Наср, С. К. Комаревцев, А. А. Осмоловский, К. А. Мирошников, А. Р. Каюмов, Е. Ю. Тризна</i>	228
Роль ионов меди в повышении грибостойкости современных полимерных композиционных материалов <i>Г. Ю. Яковлева, Е. А. Кацюруба, Е. С. Фуфыгина, М. П. Данилаев, О. Н. Ильинская</i>	234
Использование проточной цитофлуориметрии для оценки жизнеспособности мутантов по факторам терминации трансляции дрожжей <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Е. П. Ефремова, О. М. Землянко, Г. А. Журавлева</i>	239
Лекарственная устойчивость различных генотипов <i>Mycobacterium tuberculosis</i> в Омской области России <i>А. А. Вязовая, И. В. Костюкова, А. А. Герасимова, Д. Р. Терентьева, О. А. Пасечник, И. В. Мокроусов</i>	244

## ПЛАНКТОННЫЕ МИКРОБНЫЕ СООБЩЕСТВА ТЕРМОКАРСТОВЫХ ОЗЕР ЦЕНТРАЛЬНОЙ ЯКУТИИ ДЕМОНИСТРИРУЮТ ВЫСОКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ НЕКУЛЬТИВИРУЕМЫХ ПРОКАРИОТ С НЕОХАРАКТЕРИЗОВАННЫМИ ФУНКЦИЯМИ

© 2024 г. О. С. Самылина<sup>а, \*</sup>, О. И. Габышева<sup>б</sup>, В. А. Габышев<sup>б</sup>, В. В. Кадников<sup>с</sup>, А. В. Белецкий<sup>с</sup>, А. И. Косякова<sup>а</sup>, А. Ю. Каллистова<sup>а</sup>, Н. В. Пименов<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, 117312, Россия

<sup>б</sup>Институт биологических проблем криолитозоны СО РАН — обособленное подразделение ФИЦ “Якутский научный центр СО РАН”, Якутск, 677980, Россия

<sup>с</sup>Институт биоинженерии им. К.Г. Скрябина, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, 117312, Россия

\*e-mail: olga.samyлина@gmail.com

Поступила в редакцию 15.10.2023 г.

После доработки 17.10.2023 г.

Принята к публикации 17.10.2023 г.

Термокарстовые (аласные) озера Центральной Якутии имеют важное климатическое и хозяйственное значение, но сведения о микробных сообществах и микробных процессах в этих озерах в настоящее время практически отсутствуют. В данной работе охарактеризованы гидрохимические особенности и представлен первичный анализ разнообразия планктонных микробных сообществ трех аласных озер Центральной Якутии — Тюнгиюлю, Табы и Харыялах. Показано, что по физико-химическому составу вод исследованные озера являются довольно типичными для этого региона, имеют повышенную щелочность и трофность, но по микробиологическим параметрам различаются между собой. В исследованных планктонных сообществах преобладали хемогетеротрофные прокариоты, однако значительная доля последовательностей гена 16S рРНК принадлежала некультивируемым микроорганизмам, функциональный потенциал которых пока неизвестен.

**Ключевые слова:** термокарстовые озера, аласы, микробное разнообразие, ген 16S рРНК, Центральная Якутия, климат

DOI: 10.31857/S0026365624020013

Согласно недавним оценкам, криолитозона Северного полушария занимает от 14 до 22% площади суши (Obu et al., 2019). Многолетнемерзлые породы (вечная мерзлота, пермафрост) особенно широко распространены в России (Сибирь), США (Аляска) и Канаде. Сравнительные исследования динамики таких пород в голоцене и в течение последних десятилетий показали, что районы, где преобладает богатая льдом многолетняя мерзлота, очень чувствительны к изменениям температуры и других климатических факторов (Ulrich et al., 2019). В условиях глобального потепления климата одним из проявлений деградации вечной мерзлоты является активация термокарстовых процессов, приводящая к появлению просадочных форм рельефа и образованию термокарстовых озер. Такие процессы широко распространены в России в регионах сплошной вечной мерзлоты, в том числе в Центральной Якутии.

Термокарстовые котловины Центральной Якутии называются аласами. Они представляют собой пологосклонные и плоскодонные котловины диаметром до нескольких километров (иногда до нескольких десятков километров). На Центрально-якутской низменности выявлено около 16 тыс. таких котловин общей площадью порядка 440 тыс. га (Босиков, 1991; Suzuki et al., 2001). Склоны аласов, как правило, покрыты луговой растительностью, а в центре расположено озеро, что исторически обуславливало их хозяйственную значимость для коренного населения и, как следствие, приводило к высокому антропогенному воздействию на аласы и расположенные в них озера (Босиков, 1991). Аласные озера Центральной Якутии довольно разнообразны по своим морфометрическим и гидрохимическим характеристикам, но в большей степени представлены небольшими мелководными водоемами с повышенной общей минерализацией

и щелочностью (Коругина et al., 2020; Ushnitskaya et al., 2021).

При оттаивании многолетнемерзлых пород и формировании аласных систем в водоемы поступает захороненное органическое вещество, становясь доступным для микробной трансформации (Kallistova et al., 2019). Хозяйственная деятельность человека (в т.ч. скотоводство) дополнительно приводит к поступлению большого количества современной органики в аласные озера. Таким образом, меняющиеся климатические и антропогенные факторы, а также разнообразие гидрохимического состава вод аласных водоемов, влияют на структуру микробных сообществ и особенности протекания процессов трансформации органического вещества.

Климатическое значение аласных систем Центральной Якутии заключается в высоких скоростях эмиссии метана с их территорий, причем именно водоемы характеризуются максимальными выбросами этого парникового газа (Desyatkin et al., 2016). Высвобождение метана происходит как из тающих газонасыщенных многолетнемерзлых пород, так и в результате дисбаланса между микробными процессами метаногенеза и метаноокисления при разложении поступающего в водоем захороненного и современного органического вещества (Kallistova et al., 2019).

Несмотря на колоссальную климатическую и хозяйственную значимость аласных озер Центральной Якутии, работы по изучению микробных сообществ и микробных процессов в этих озерах в настоящее время практически отсутствуют. Поэтому целью данной работы стал первичный анализ разнообразия планктонных микробных сообществ трех аласных (термокарстовых) озер Центральной Якутии.

Район исследований находится на территории Центральной Якутии на 62 параллели с.ш., в среднем течении р. Лена в зоне сплошного распространения многолетней мерзлоты. Большое влияние на климатические условия региона оказывает формирующийся в зимнее время в центре Азии сибирский антициклон, мощный отрог которого занимает всю Восточную Сибирь. На особенности климата значительно влияют частые вторжения воздушных масс со стороны Ледовитого океана с очень малым содержанием водяного пара летом. Климат резко континентальный с продолжительной суровой зимой и коротким жарким летом. По данным, полученным на портале [www.worldclim.org](http://www.worldclim.org), среднегодовая температура воздуха для района отбора проб колеблется от  $-12.4$  до  $-8.7^{\circ}\text{C}$ , максимальная среднемесячная температура в летний период — от  $22.2$  до  $25.0^{\circ}\text{C}$ . Продолжительность отсутствия льда на водоемах составляет 120–125 дней (Аржакова и соавт., 2007).

Наши работы проводились в середине июля 2023 г. на трех аласных озерах — Тюнгилю, Табы и Харыялах (табл. 1), котловины которых образовались в результате протаивания подземных льдов многолетней мерзлоты. Оз. Тюнгилю было выбрано для исследования, поскольку является известным объектом изучения эмиссии парниковых газов  $\text{CO}_2$  и  $\text{CH}_4$  (Desyatkin et al., 2016, 2018), а также частым объектом других направлений изучения (Коругина et al., 2020; Ushnitskaya et al., 2021). Два других озера были выбраны случайным образом.

Химико-аналитические работы были выполнены с применением методов, описанных в руководстве по химическому анализу поверхностных вод суши (Семенов, 1977). Измерения произведены с использованием спектрофотометра ПЭ-5300ВИ (“Экротим”, Россия), флуориметра Флюорат-02 (“Люмэкс”, Россия) и атомно-абсорбционного спектрометра ААС АAnalyst400 (“PerkinElmer”, США). Температуру воды измеряли электронным термометром Checktemp (“HANNA Instruments”, США), водородный показатель — иономером Мультистест ИПЛ-101 (“Семико НПП”, Россия). Содержание метана определяли методом фазово-равновесной дегазации (McAuliffe, 1971).

Для характеристики состава микробных сообществ отбирали пробы воды (по 0.5 л), микроорганизмы концентрировали фильтрацией через мембранный фильтр с размером пор 0.22 мкм. Фильтр с биомассой растирали в жидком азоте. Выделение ДНК, амплификацию, секвенирование, анализ фрагментов гена 16S рРНК, кластеризацию последовательностей в оперативные таксономические единицы (ОТЕ), удаление химерных последовательностей и таксономическую идентификацию ОТЕ проводили по методикам, описанным в Gruzdev et al. (2023). Нуклеотидные последовательности фрагментов генов 16S рРНК депонированы в базу данных Sequence Read Archive NCBI в BioProject PRJNA1027611.

Вода озер в приповерхностном слое, где проводился пробоотбор, была достаточно хорошо прогрета (табл. 1). Для оз. Харыялах и Табы отмечен недостаток растворенного кислорода, в оз. Тюнгилю этот показатель был в пределах нормы. В соответствии со значениями рН оз. Табы и Тюнгилю следует отнести к мезощелочному, оз. Харыялах — к олигощелочному типу. Особенностью бессточных термокарстовых озер следует считать то, что на различных стадиях развития таких водоемов происходит повышение минерализации вод, как, например, в оз. Табы и Тюнгилю, которые, согласно классификации С. П. Китаева (Китаев, 2007), относятся к мезогалинным. Вода оз. Харыялах при этом является умереннопресной. По компонентному составу воды оз. Тюнгилю и Табы относятся к натриево-хлоридному типу, а оз. Харыялах — к гидрокарбонатно-кальциевому.



**Таблица 1.** Аналитические данные, полученные для трех исследованных термокарстовых озер центральной Якутии (значения  $\pm$  ст. откл., если применимо)

Параметры	Озера		
	Тюнгиюлю	Табы	Харыялах
<b>Географические параметры озер</b>			
Географические координаты, град. (с.ш.; в.д.)	62.202739; 130.655056	62.132187; 130.268169	62.10725; 128.37102
Высота над уровнем моря, м	140	147	283
Длина, м	600	803	1690
Ширина, м	600	551	800
Площадь зеркала воды, тыс. кв. м	237.6	305.1	922.4
Протяженность береговой линии, км	1.93	2.22	4.52
<b>Физико-химические параметры вод</b>			
Температура воды в момент взятия проб, °С	17.70	27.40	20.30
Водородный показатель (рН), единицы	9.68 $\pm$ 0.02	9.07 $\pm$ 0.02	8.63 $\pm$ 0.01
Кислород (O <sub>2</sub> ), мг/дм <sup>3</sup>	6.70 $\pm$ 0.08	4.88 $\pm$ 0.07	5.14 $\pm$ 0.11
Метан, мкмоль/дм <sup>3</sup>	0.86	4.48	39.31
Минерализация, мг/дм <sup>3</sup>	3148.2 $\pm$ 10.36	1723.70 $\pm$ 10.85	375.61 $\pm$ 1.84
Жесткость, ммоль/дм <sup>3</sup>	14.44 $\pm$ 0.06	7.70 $\pm$ 0.03	3.88 $\pm$ 0.00
Кальций, мг/дм <sup>3</sup>	14.43 $\pm$ 0.00	18.44 $\pm$ 0.00	42.28 $\pm$ 0.00
Магний, мг/дм <sup>3</sup>	166.70 $\pm$ 0.69	82.38 $\pm$ 0.34	21.51 $\pm$ 0.00
Натрий, мг/дм <sup>3</sup>	724.00 $\pm$ 7.07	548.00 $\pm$ 7.07	40.80 $\pm$ 0.71
Калий, мг/дм <sup>3</sup>	54.00 $\pm$ 0.10	94.40 $\pm$ 0.10	17.10 $\pm$ 0.10
Гидрокарбонаты, мг/дм <sup>3</sup>	778.62 $\pm$ 0.00	415.55 $\pm$ 2.59	210.15 $\pm$ 1.04
Хлориды, мг/дм <sup>3</sup>	700.14 $\pm$ 2.51	382.33 $\pm$ 0.75	21.27 $\pm$ 0.00
Сульфаты, мг/дм <sup>3</sup>	710.40 $\pm$ 0.00	182.60 $\pm$ 0.00	22.50 $\pm$ 0.00
Азот аммонийный (N-NH <sub>4</sub> ), мг/дм <sup>3</sup>	1.51 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.02	0.48 $\pm$ 0.01
Азот нитритный (N-NO <sub>2</sub> ), мг/дм <sup>3</sup>	0.03 $\pm$ 0.00	0.17 $\pm$ 0.00	0.05 $\pm$ 0.00
Азот нитратный (N-NO <sub>3</sub> ), мг/дм <sup>3</sup>	0.46 $\pm$ 0.00	0.52 $\pm$ 0.00	0.10 $\pm$ 0.00
Фосфор минеральный (P-PO <sub>4</sub> ), мг/дм <sup>3</sup>	0.013 $\pm$ 0.00	0.106 $\pm$ 0.00	0.007 $\pm$ 0.00
Фосфор общий (P общ), мг/дм <sup>3</sup>	1.00 $\pm$ 0.00	2.00 $\pm$ 0.00	0.13 $\pm$ 0.01
Железо общее (Fe <sub>общ</sub> ), мг/дм <sup>3</sup>	1.85 $\pm$ 0.03	2.00 $\pm$ 0.01	1.66 $\pm$ 0.01
Кремний (Si-SiO <sub>2</sub> ), мг/дм <sup>3</sup>	1.44 $\pm$ 0.01	2.05 $\pm$ 0.01	1.34 $\pm$ 0.03
Цветность, градусы	64 $\pm$ 0.01	89 $\pm$ 0.00	129 $\pm$ 1.02
ЛООВ (по величине БПК <sub>5</sub> ), мг/дм <sup>3</sup>	2.31 $\pm$ 0.08	4.88 $\pm$ 0.06	3.64 $\pm$ 0.06
ТООВ (по величине ХПК), мг/дм <sup>3</sup>	76.00 $\pm$ 0.00	66.50 $\pm$ 0.14	107.00 $\pm$ 0.28
<b>Индексы альфа-разнообразия микробных сообществ</b>			
Berger-Parker	0.05	0.53	0.17
Chao1	392.10	402.10	302.20
Simpson	0.02	0.31	0.07
Shannon_e	4.74	2.30	3.55

\*БПК<sub>5</sub> — биохимическое потребление кислорода за 5 сут; ЛООВ — легкоокисляемые органические вещества, определяемые по БПК<sub>5</sub>; ТООВ — трудноокисляемые органические вещества, определяемые по ХПК; ХПК — химическое потребление кислорода.

Воды оз. Харыялах являются среднежесткими, оз. Табы — жесткими, оз. Тюнгиюлю — очень жесткими. Повышенным показателем цветности выделялось оз. Харыялах, которое, вместе с оз. Табы, является мезополигуменным. Самый низкий показатель цветности был у оз. Тюнгиюлю, которое относится к мезогумозным. Для исследованных водоемов было характерно повышенное содержание легкоокисляемых органических веществ (ЛООВ) и высокое содержание трудноокисляемых органических

веществ (ТООВ). Кроме того, везде были отмечены высокая концентрация аммонийного азота с максимальными показателями для оз. Тюнгиюлю и минимальными — для оз. Харыялах. Содержание нитритов было также высоким (максимальные значения в оз. Табы). Содержание нитратов изменялось в широких пределах, достигая максимума в оз. Тюнгиюлю и Табы. Максимальная концентрация минерального и общего фосфора была характерна для оз. Табы и Тюнгиюлю. Содержание общего

железа было высоким во всех озерах. Содержание метана в воде варьировало значительно: от 0.9 мкмоль/дм<sup>3</sup> (оз. Тюнгюлю) до 39 мкмоль/дм<sup>3</sup> (оз. Харьялах) (табл. 1).

Высокие концентрации соединений азота, фосфора, высокая цветность, ЛООВ и ТООВ объясняются антропогенной нагрузкой (скотоводство, бытовые стоки и т.п.), которую так или иначе испытывают все исследованные озера и которая проявляется в поступлении с водосбора органического вещества и биогенных элементов. Как следствие, повышается трофность озер. Согласно классификации R. G. Wetzel (2001) по содержанию минерального азота оз. Тюнгюлю и Табы являются гипертрофными водоемами, оз. Харьялах — β-эвтрофным. По концентрации фосфора все водоемы относятся к гипертрофным. Таким образом, три исследованных озера, расположенные относительно недалеко друг от друга, значительно различаются между собой по гидрохимическим особенностям. Общей характеристикой для всех озер можно считать их повышенную щелочность и трофность. Полученные нами данные согласуются с результатами более масштабной работы Л. А. Ушнической и соавт. (2021) по гидрохимической характеристике разнотипных озер Усть-Алданского района Центральной Якутии. Таким образом, исследованные в нашей работе озера гидрохимически являются довольно типичными для этого региона.

Анализ разнообразия фрагментов гена 16S рРНК показал, что во всех планктонных сообществах доминировали бактерии, в то время как археи составляли минорную часть (рис. 1). Диаграмма Венна показала большие отличия сообществ по составу микроорганизмов. Только 2.2% ОТЕ были общими в трех озерах (рис. 2). Индексы альфа-разнообразия указывают на то, что прокариотные сообщества оз. Тюнгюлю и Табы были более разнообразны, чем в оз. Харьялах (табл. 1).

В планктонных сообществах оз. Тюнгюлю преобладали гетеротрофные бактерии класса *Gammaproteobacteria* (22.2%) и фил *Verrucomicrobiota* (16.4%) и *Bacteroidota* (21.5%) (рис. 1). Явных доминантов среди ОТЕ выявлено не было: из 392 ОТЕ всего 25 имели относительную численность более 1 и до 5%. Тем не менее интересным является тот факт, что большинство из выявленных последовательностей ОТЕ не могли быть надежно идентифицированы, поскольку имели ближайших родственников среди некультивируемых представителей на уровне семейств и более высоких таксонов.

В оз. Табы половину от всех ОТЕ составляли бактерии филума *Bdellovibrionota* (54%) близкие к некультивируемому патогену дафний “*Spirobacillus cienkowski*” (Rodrigues et al., 2008). Ассоциированность этого микроорганизма с дафниями в данной работе нами не установлена, а сам результат представляется удивительным и требует

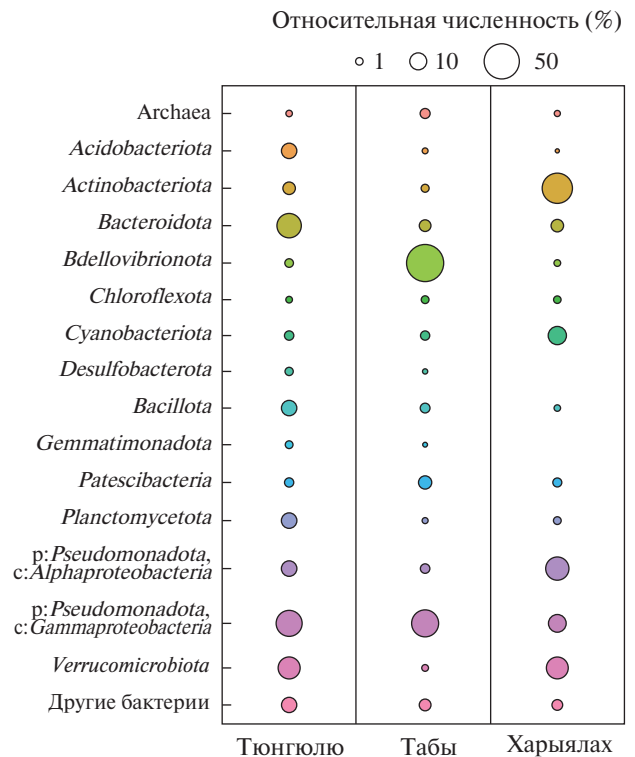


Рис. 1. Разнообразие планктонных микробных сообществ трех аласных озер Центральной Якутии на уровне филогенетических групп.

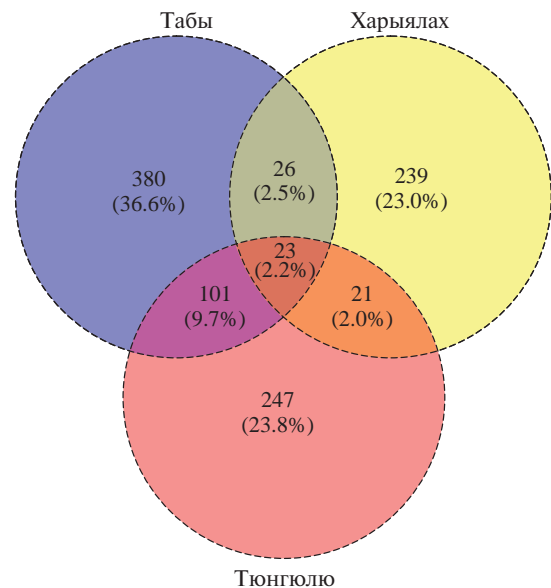


Рис. 2. Количество общих и уникальных ОТЕ в планктонных сообществах трех аласных озер Центральной Якутии (диаграмма Венна).

будущей перепроверки. Вторыми по численности в этом озере были представители класса *Gammaproteobacteria* сем. *Comamonadaceae* (26.2%), родственные представителям рода *Limnohabitans* и двум близким родам *Hydrogenophaga* и *Malikia*.

Гетеротрофные представители рода *Limnohabitans* широко распространены в пресноводных озерах, преимущественно с околонеutralными и щелочными значениями pH по всему миру, имеют несколько филогенетических линий и считаются важным звеном трофической сети планктонного сообщества (утилизируют ЛООВ), хотя большинство представителей до сих пор либо некультивируемые, либо сложные в культивировании (Kasalický et al., 2013). Представители рода *Hydrogenophaga* являются хемоорганотрофами или хемолитоавтотрофами, использующими  $H_2$  в качестве источника энергии (Willems et al., 1989), в то время как отличительной особенностью представителей рода *Malikia* является способность внутриклеточно накапливать полигидроксиалканоаты и полифосфаты (Spring et al., 2005).

Оз. Харыялах отличалось по составу микроорганизмов от оз. Тюнгюлю и Табы (рис. 1). Здесь в планктоне доминировали представители фил *Actinobacteriota* (36.1%), *Verrucomicrobiota* (16.8%) и класса *Alphaproteobacteria* (18.5%). Также в воде этого озера большую долю составляли последовательности филы *Cyanobacteriota* (9.8%). Наибольшую представленность (16.4%) в сообществе имели последовательности, идентифицированные как группа CL500–29\_marine\_group (сем. *Pumato bacteraceae*, *Actinobacteriota*). Эти микроорганизмы некультивируемые, информации об их экологии и функциональной значимости мало. Известно, что они распространены как в морских, так и в озерных условиях и считаются универсальными гетеротрофами, способными использовать различные растворенные органические вещества в аэробных условиях (Zhou et al., 2020). Еще 10.8% от общей численности ОТЕ составляли последовательности, относящиеся к кладе hgcI (сем. *Sporichthyaceae*, *Actinobacteriota*). Представители этой клады некультивируемые, широко распространены в пресноводных местообитаниях, имеют генетические предпосылки к способности усваивать углеводы и богатые азотом органические соединения (Ghylin et al., 2014). Кроме того, клада hgcI обладает генетическим потенциалом для использования солнечного света через актинородопсин, что может способствовать анаэробной фиксации углерода и указывает на возможность как гетеротрофного, так и автотрофного образа жизни (Ghylin et al., 2014).

Среди *Verrucomicrobiota* доминировали последовательности ОТЕ, идентифицированные только до уровня семейства *Chthoniobacteraceae* (11.4%), что не позволяет оценить их роль в сообществе.

В составе *Alphaproteobacteria* преобладали аэробные, хемоорганогетеротрофные пресноводные бактерии “*Candidatus Fonsibacter ubiquis*” (13.5%), ранее известные как SAR11 клады IIIb или LD12 (Henson et al., 2018). В настоящее время

известен только один культивируемый представитель этой клады (Henson et al., 2018); еще один вид “*Candidatus Fonsibacter lacus*” описан на основании метагеномных данных (Tsmntzi et al., 2019). В геноме “*Ca. Fonsibacter ubiquis*” выявлены потенциальные гомологи генов синтеза, транспорта и разложения метилфосфонатов (гомология *gprsb* от 25 до 46%), что может свидетельствовать об участии этого организма в аэробном метаногенезе (Kallistova et al., 2023). Считается, что “*Candidatus Fonsibacter ubiquis*” адаптирован к олиготрофным условиям с простыми соединениями углерода (Henson et al., 2018), что делает его обнаружение в  $\beta$ -эвтрофном оз. Харыялах интересной находкой, требующей дальнейшего изучения.

Озеро Харыялах было единственным из трех изученных, где была выявлена высокая представленность цианобактерий (фила *Cyanobacteriota*), среди которых преобладали одноклеточные (неидентифицированные представители семейства *Prochlorococcaceae* и представители родов *Microcystis*). В недавней работе по разнообразию и экологической характеристике цианобактерий и водорослей термокарстовых озер Якутии на основании многолетних морфологических наблюдений также отмечается преобладание одноклеточных цианобактерий (Корюгина et al., 2020), но прямые сопоставления, к сожалению, невозможны.

Таким образом, большинство как доминирующих, так и минорных ОТЕ, обнаруженных в исследованных планктонных сообществах трех аласных озер Центральной Якутии, представляли некультивируемых микроорганизмов с неясными функциями, хотя можно констатировать, что в изученных сообществах преобладают хемогетеротрофные прокариоты. В воде термокарстовых озер других регионов, в частности, Канады (Negandhi et al., 2014, 2016) и Ямала (Savvichev et al., 2021), также было показано преобладание и высокое разнообразие органотрофных бактерий филумов *Bacteroidetes*, *Pseudomonadota*, *Actinobacteria* и *Verrucomicrobia*. В поверхностных горизонтах водной толщи высока доля одноклеточных цианобактерий семейств *Prochlorococcaceae* (автоматически идентифицируется как *Cyanobiaceae*) и гетероцистных цианобактерий, идентифицируемых как *Nostocaceae* (Savvichev et al., 2021), что также сопоставимо с нашими результатами.

Ранее нами были выполнены первые в России комплексные исследования микробных процессов цикла метана в термокарстовых и полигенетических озерах Ямальского полуострова и выявлены различные пути метаногенеза, а также интенсивное аэробное и анаэробное окисление метана не только в осадках (Kallistova et al., 2021), но и водной толще (Savvichev et al., 2021). Содержание метана в воде ямальских озер было сопоставимым с концентрациями, выявленными нами в трех



исследованных озерах Центральной Якутии. И, как и в воде озер Ямала, метанотрофные микроорганизмы были немногочисленны — отмечены только в воде оз. Харыялах (0.26% от всех ОТЕ) и принадлежали исключительно к порядку *Methylococcales* и представителям семейств *Methylomonadaceae* (род не идентифицирован) и *Methylococcaceae* (род *Methyloparacoccus*). Метаногенные археи выявлены в основном в воде оз. Табы с самым низким содержанием растворенного кислорода. Их относительная численность также мала (0.33% от всех ОТЕ), а разнообразие представлено семействами *Methanobacteriaceae*, *Methanomicrobiaceae* и *Methanosaetaceae*.

Таким образом, наши данные указывают на то, что планктонные микробные сообщества аласных озер Центральной Якутии разнообразны и изобилуют некультивируемыми прокариотами с пока неизвестным функциональным потенциалом. Научная и практическая значимость микробиологических исследований таких озер в Якутии заключается в необходимости понимания динамики функционирования микробных сообществ в условиях резко континентального климата с преобладанием низких температур, а также в потенциальной возможности управлять микробными процессами цикла углерода (эмиссией парниковых газов) в условиях глобальных климатических изменений. Кроме того, наши данные позволяют предположить, что аласные озера Центральной Якутии могут служить источником поиска новых промышленно значимых штаммов (как, например, фосфат-аккумуляторы рода *Malikia*), приспособленных к низкотемпературным условиям, типичным для различных регионов России.

### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность академику РАН, д.г.-м.н. А. Ю. Розанову и начальнику отдела по науке и сохранению биоразнообразия Национального парка “Ленские Столбы” Л. В. Шелуховской за предоставленную возможность посетить Центральную Якутию и содействие в организации поездки.

### ФИНАНСИРОВАНИЕ

Полевые работы, обработка образцов и анализ молекулярно-биологических данных выполнены сотрудниками ФИЦ Биотехнологии РАН при поддержке проекта РНФ № 22-14-00038 и госзадания ФИЦ Биотехнологии РАН. Полевые работы и гидрохимические анализы выполнены Габышевым В. А. и Габышевой О. И. в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ по проектам № FWRS-2021-0023, ЕГИСУ НИОКТР № АААА-А21-121012190038-0

и № FWRS-2021-0026, ЕГИСУ НИОКТР АААА-А21-121012190036-6.

### 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

- Аржакова С.К., Жирков И.И., Кусатов К.И., Андронов И.М. Реки и озера Якутии: краткий справочник. Якутск: Бичик, 2007. 176 с.
- Босиков Н.П. Эволюция аласов Центральной Якутии. Якутск: ИМЗ СО РАН, 1991. 128 с.
- Кутаев С.П. Основы лимнологии для гидробиологов и ихтиологов. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2007. 395 с.
- Семенов А.Д. Руководство по химическому анализу поверхностных вод суши. Л.: Гидрометеиздат, 1977. 540 с.
- Brown J., Ferrains O.J., Heginbottom J.A., Melnikov E.S. Circum-Arctic map of permafrost and ground-ice conditions // National Snow and Ice Data Center. 1997. <https://doi.org/10.3133/cp45>
- Desyatkin A.R., Fedorov P.P., Nikolaev A.N., Borisov B.Z., Desyatkin R.V. Methane emission during thermokarst lake flood in Central Yakutia // Vestnik of North-Eastern Federal University. 2016. № 2 (52). P. 5–14 (in Russian).
- Desyatkin A., Takakai F., Nikolaeva M. Landscape micro-zones within thermokarst depressions of Central Yakutia under present climatic conditions // *Geosciences*. 2018. V. 8. Art. 439. <https://doi.org/10.3390/geosciences8120439>
- Ghylin T.W., Garcia S.L., Moya F., Oyserman B.O., Schwientek P., Forest K.T., Mutschler J., Dwulit-Smith J., Chan L.K., Martinez-Garcia M., Sczyrba A., Stepanauskas R., Grossart H.P., Woyke T., Warnecke F., Malmstrom R., Bertilsson S., McMahon K.D. Comparative single-cell genomics reveals potential ecological niches for the freshwater acI *Actinobacteria* lineage // *ISME J*. 2014. V. 8. P. 2503–2516. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.135>
- Gruzdev E.V., Begmatov S.A., Beletsky A.V., Mardanov A.V., Ravin N.V., Kadnikov V.V. Structure and seasonal variability of groundwater microbial communities in the City of Moscow // *Microbiology (Moscow)*. 2023. V. 92. P. 192–203. <https://doi.org/10.1134/S0026261722603293>

- Henson M.W., Lanclos 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. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0092-2>
- 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. <https://doi.org/10.1134/S0026261721020065>
- Kallistova A.Yu., Kosyakova A.I., Rusanov I.I., Kadnikov V.V., Beletsky A.V., Koval' D.D., Yusupov S.K., Zekker I., Pimenov N.V. Methane production in a temperate freshwater lake during an intense cyanobacterial bloom // Microbiology (Moscow). 2023. V. 92. P. 638–649. <https://doi.org/10.1134/S0026261723601586>
- Kallistova A.Yu., Savvichev A.S., Rusanov I.I., Pimenov N.V. Thermokarst lakes, ecosystems with intense microbial processes of the methane cycle // Microbiology (Moscow). 2019. V. 88. P. 649–661. <https://doi.org/10.1134/S0026261719060043>
- Kasalický V., Jezbera J., Hahn M.W., Šimek K. The diversity of the Limnohabitans genus, an important group of freshwater bacterioplankton, by characterization of 35 isolated strains // PLoS One. 2013. V. 8. Art. e58209. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058209>
- Kopyrina L., Pshennikova E., Barinova S. Diversity and ecological characteristic of algae and cyanobacteria of thermokarst lakes in Yakutia (northeastern Russia) // Oceanol. Hydrobiol. Stud. 2020. V. 49. P. 99–122. <https://doi.org/10.1515/ohs-2020-0010>
- McAuliffe C.C. GC determination of solutes by multiple phase equilibrium // Chem. Technol. 1971. V. 1. P. 46–51.
- Negandhi K., Laurion I., Lovejoy C. Bacterial communities and greenhouse gas emissions of shallow ponds in the High Arctic // Polar Biol. 2014. V. 37. P. 1669–1683. <https://doi.org/10.1007/s00300-014-1555-1>
- Negandhi K., Laurion I., Lovejoy C. Temperature effects on net greenhouse gas production and bacterial communities in arctic thaw ponds // FEMS Microbiol. Ecol. 2016. V. 92. Art. fiw117. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw117>
- Obu J., Westermann S., Bartsch A., Berdnikov N., Christiansen H.H., Dashtseren A., Delaloye R., Elberling B., Etzelmüller B., Kholodov A., Khomutov A., Kääb A., Leibman M.O., Lewkowicz A.G., Panda S.K., Romanovsky V., Way R.G., Westergaard-Nielsen A., Wu T., Yamkhin J., Zou D. Northern hemisphere permafrost map based on TTOP modelling for 2000–2016 at 1 km<sup>2</sup> scale // Earth Sci. Rev. 2019. V. 193. P. 299–316. <https://doi.org/10.1016/j.earscirev.2019.04.023>
- Rodrigues J.L., Duffy M.A., Tessier A.J., Ebert D., Mouton L., Schmidt T.M. Phylogenetic characterization and prevalence of “*Spirobacillus cienkowskii*,” a red-pigmented, spiral-shaped bacterial pathogen of freshwater *Daphnia* species // Appl. Environ. Microbiol. 2008. V. 74. P. 1575–1582. <https://doi.org/10.1128/AEM.02438-07>
- Savvichev A., Rusanov I., Dvornikov Y., Kadnikov V., Kallistova A., Veslopolova E., Chetverova A., Leibman M., Sigalevich P., Pimenov N., Ravin N., Khomutov A. The water column of the Yamal tundra lakes as a microbial filter preventing methane emission // Biogeosciences. 2021. V. 18. P. 2791–2807. <https://doi.org/10.5194/bg-18-2791-2021>
- Spring S., Wagner M., Schumann P., Kämpfer P. *Malikia granosa* gen. nov., sp. nov., a novel polyhydroxyalkanoate- and polyphosphate-accumulating bacterium isolated from activated sludge, and reclassification of *Pseudomonas spinosa* as *Malikia spinosa* comb. nov. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2005. V. 55. P. 621–629. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63356-0>
- Suzuki R., Hiyama T., Strunin M., Ohata T., Koike T. Airborne observation of land surface by video camera and spectrometers around Yakutsk // Activity Report of GAME-Siberia 2000, GAME Publication 26. 2001. P. 61–64.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2019.03.007>
- Ulrich M., Matthes H., Schmidt J., Fedorov A.N., Schirrmeister L., Siegert C., Schneider B., Strauss J., Zielhofer C. Holocene thermokarst dynamics in Central Yakutia — A multi-core and robust grain-size endmember modeling approach // Quat. Sci. Rev. 2019. V. 218. P. 10–33. <https://doi.org/10.1016/j.quascirev.2019.06.010>
- Ushnitskaya L.A., Gorodnichev R.M., Pestryakova L.A. Morphometric and hydrochemical characteristics of lakes in rural settlements Ust-Aldansky District (Central Yakutia) // Regional Geosystems. 2021. V. 45. № 2. P. 214–226 (in Russian). <https://doi.org/10.52575/2712-7443-2021-45-2-214-226>
- Wetzel R.G. Limnology: Lake and river ecosystems. San Diego: Acad. Press, 2001. 1006 p.
- Willems A., Busse J., Goor M., Pot B., Falsen E., Jantzen E., Hoste B., Gillis M., Kersters K., Auling G., De Ley J. *Hydrogenophaga*, a new genus of hydrogen-oxidizing bacteria that includes *Hydrogenophaga flava* comb. nov. (Formerly *Pseudomonas flava*), *Hydrogenophaga palleronii* (Formerly *Pseudomonas palleronii*), *Hydrogenophaga pseudo flava* (Formerly *Pseudomonas pseudo flava* and “*Pseudomonas carboxydoflava*”), and *Hydrogenophaga taeniospiralis* (Formerly *Pseudomonas taeniospiralis*) // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 1989. V. 39. P. 319–333. <https://doi.org/10.1099/00207713-39-3-319>
- Zhou S., Sun Y., Yu M., Shi Z., Zhang H., Peng R., Li Z., Cui J., Luo X. Linking shifts in bacterial community composition and function with changes in the dissolved organic matter pool in ice-covered Baiyangdian Lake, Northern China // Microorganisms. 2020. V. 8. Art. 883. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8060883>

## Planktonic Microbial Communities of Thermokarst Lakes of Central Yakutia Demonstrate a High Diversity of Uncultivated Prokaryotes with Uncharacterized Functions

O. S. Samylina<sup>1, \*</sup>, O. I. Gabysheva<sup>2</sup>, V. A. Gabyshev<sup>2</sup>, V. V. Kadnikov<sup>3</sup>, A. V. Beletsky<sup>3</sup>,  
A. I. Kosyakova<sup>1</sup>, A. Yu. Kallistova<sup>1</sup>, and N. V. Pimenov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Winogradsky Institute of Microbiology, Research Center of Biotechnology,  
Russian Academy of Sciences, Moscow, 117312 Russia*

<sup>2</sup>*Institute for Biological Problems of Cryolithozone, Siberian Branch,  
Russian Academy of Sciences, Yakutsk 677980 Russia*

<sup>3</sup>*Skryabin Institute of Bioengineering, Research Center of Biotechnology,  
Russian Academy of Sciences, Moscow, 117312 Russia*

\**e-mail: olga.samylina@gmail.com*

Received October 15, 2023; revised October 17, 2023; accepted October 17, 2023

**Abstract**—Although thermokarst alask lakes of Central Yakutia are of great climatic and economic importance, there is currently virtually no information on microbial communities and microbial processes in these lakes. This paper characterizes the hydrochemical features and presents a primary analysis of the diversity of planktonic microbial communities in three alask lakes of Central Yakutia — Tyungulyu, Taby, and Kharyyalakh. It was shown that in terms of the water physicochemical composition, the studied lakes were quite typical for this region; they had increased alkalinity and trophicity, but differed from each other in microbiological indicators. Chemoheterotrophic prokaryotes predominated in the studied planktonic communities, but a significant proportion of the 16S rRNA gene sequences were most similar to uncultured microorganisms whose functional potential is still unknown.

**Keywords:** thermokarst lakes, alask, microbial diversity, 16S rRNA gene, Central Yakutia, climate

## МЕТАГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ ОСАДКОВ КАРСТОВОГО МЕРОМИКТИЧЕСКОГО ОЗЕРА ЧЕРНЫЙ КИЧИЕР ВЫЯВИЛ БОЛЬШОЕ КОЛИЧЕСТВО НЕКУЛЬТИВИРУЕМЫХ *THERMOPLASMATOTA*

© 2024 г. В. В. Кадников<sup>а</sup>, \*, А. С. Саввичев<sup>б</sup>, И. И. Русанов<sup>б</sup>, А. В. Белецкий<sup>а</sup>, Н. В. Пименов<sup>б</sup>

<sup>а</sup>Институт биоинженерии им. К.Г. Скрябина, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, 117312 Россия

<sup>б</sup>Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, 117312 Россия

\*e-mail: vkadnikov@bk.ru

Поступила в редакцию 01.11.2023 г.

После доработки 09.11.2023 г.

Принята к публикации 09.11.2023 г.

Проведены исследования микробного сообщества донных осадков карстового озера Черный Кичиер. Осадки характеризовались высоким содержанием сероводорода, растворенного метана, а также органического вещества. Прямые измерения с применением радиоизотопов показали высокую интенсивность микробных процессов деструкции органического вещества. В микробном сообществе найдены некультивируемые археи филума *Thermoplasmatota*. Анализ метагенома выявил представителей пяти порядков — *Methanomassiliicoccales*, *Thermoprofundales* (первое название Marine Benthic Group D и DHVEG-1), DTX01, SG8-5 и *Candidatus Gimiplasmatales* (бывший UBA10834). Ранее считалось, что эти археи являются исключительно обитателями крайне бедных органическим веществом глубинных морских осадков. Такая находка меняет представление о роли архей пяти порядков филума *Thermoplasmatota* в деструкционном сегменте цикла углерода.

**Ключевые слова:** *Thermoplasmatota*, меромиктические водоемы, донные отложения, микробные сообщества, 16S рРНК, метагеном

DOI: 10.31857/S0026365624020028

Донные осадки морских и континентальных водоемов являются уникальной экосистемой, в которых формируются микробные сообщества, существующие за счет деструкции органического вещества, поступающего из водной толщи (Кузнецов, 1970; Sarone, Kiene, 1988). Состав микробных сообществ донных отложений зависит, в первую очередь, от трофического статуса водоема, а также от минерализации и степени окисления осадка (Земская и соавт., 2021; Nan et al., 2020). Особым типом местообитаний сложных микробных сообществ являются осадки карстовых меромиктических водоемов. В восстановленных осадках таких водоемов со значительным содержанием сероводорода формируются микробные сообщества с наиболее высокой долей некультивируемых архей (Kadnikov et al., 2019).

Целью настоящего исследования было изучение состава микробного сообщества донных отложений богатого органическим веществом карстового озера.

В качестве природного объекта было выбрано меромиктическое озеро Черный Кичиер, в котором уже проводились микробиологические исследования (Gorlenko et al., 1983; Gorbunov, Umanskaya,

2020). Озеро Кичиер (56.07036° с.ш., 48.34592° в.д.) расположено на территории национального парка “Марий Чодра” в республике Марий Эл. В формировании водоема участвуют сульфатные воды из глубинных палеозойских водоносных горизонтов. Озеро Черный Кичиер имеет максимальную глубину около 10 м. Суммарная минерализация глубинных вод составляет 2 г/л. Плотностное расслоение препятствует перемешиванию водной толщи и является причиной стратификации. Придонный водный слой и донные осадки в оз. Черный Кичиер сохраняют постоянные восстановленные условия (Kuznezow, Gorlenko, 1973; Gorbunov, Umanskaya, 2020).

*Thermoplasmatota* – широко распространенный филум архей, состоящий из нескольких классов: *Aciduliprofundales*, *Thermoplasmatales*, *Methanomassiliicoccales* и “*Candidatus Poseidoniales*” (первое название Marine Group II). Впервые эти организмы были обнаружены в поверхностных морских водах, однако впоследствии было показано, что некоторые представители *Thermoplasmatota* обитают в глубоких водах и осадках океанов (Rinke et al., 2019). В собранном метагеноме



“*Candidatus Pontarchaea*” (первое название Marine Group III) обнаружены гены фотолиазы и родопсина, а также гены деградации пептидов и липидов, что указывает на возможность фотогетеротрофного и гетеротрофного метаболизма, известного у архей (Baker et al., 2020). *Thermopfundales* (первое название Marine Benthic Group D (MBGD) и DHVEG-1) предполагает миксотрофный метаболизм, что определяется наличием генов внеклеточных пептидаз, а также генов, определяющих восстановительный ацетил-КоА путь Вуд-Льюнгдала (Zhou et al., 2019). Новые представители *Thermoplasmata*, известные под индексом RBG-16-68-12, найдены в глубоководных осадках восточной акватории Мексиканского залива на глубине более 3000 м (Dong et al., 2019). На сегодняшний день данные по распространению и экологической функции архей RBG-16-68-12 в морских и континентальных осадках крайне ограничены.

Донные осадки озера отбирали лимнологическим стратометром со стеклянной трубкой. Из трубки пробы осадков переносили в 5-мл пластиковые шприцы с отрезанной носовой частью, которые, после наполнения образцом структурно ненарушенного осадка, без доступа воздуха закрывали газонепроницаемой пробкой. Содержание сероводорода, а также значение щелочности определяли стандартными методами. Содержание метана в пробах определяли методом фазово-равновесной дегазации. Определение содержания  $C_{\text{орг}}$  в образцах осадков выполняли на анализаторе TOC-L CPN + SSM-5000Au (“Shimadzu”) в ИО РАН. Интенсивности микробных процессов темновой ассимиляции углекислоты (ТАУ), образования (МГ) и окисления метана (МО) определяли радиоизотопным методом с использованием меченых соединений —  $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$  и  $^{14}\text{CH}_4$  (Pimenov, Bonch-Osmolovskaya, 2006; Savvichev et al., 2021).

Для характеристики состава микробных сообществ отбирали 2 г осадка с разных горизонтов колонки. Выделение ДНК, приготовление библиотеки для секвенирования, кластеризацию в оперативные таксономические единицы проводили согласно ранее описанным методам (Kadnikov et al.,

2019). Нуклеотидные последовательности фрагментов генов 16S рРНК депонированы в базу данных Sequence Read Archive NCBI в BioProject PRJNA1007459.

Метагеномную ДНК секвенировали с помощью системы Illumina HiSeq2500 (“Illumina”, США) по методике, описанной ранее (Kadnikov et al., 2019). Всего просеквенировали около 91.4 Гб парных чтений ( $2 \times 150$  нт) с последующей фильтрацией по качеству ( $Q > 33$ ). Чтения были собраны в контиги с помощью программы MetaSPAdes v. 3.7.1, как описано ранее (Kadnikov et al., 2019). Полученные контиги группировали в кластеры с помощью программы CONCOCT, что соответствует отдельным микробным геномам (metagenome-assembled genome, MAG) (Alneberg et al., 2014). Полноту собранных MAG и уровень их загрязнения контигами, принадлежащих другим микроорганизмам, оценивали с помощью программы CheckM (Parks et al., 2015). Таксономическое положение собранных геномов определяли по базе данных GTDB с помощью программы GTDB-Tk v. 0.1.3 (Parks et al., 2018).

Донные осадки озера, в поверхностном слое жидкие, пелитовые, черного цвета, восстановленные, с сильным запахом сероводорода, включали растительные остатки. Глубже 2–5 см осадок немного уплотнялся и приобретал алевроитовую и песчаную фракцию. Содержание метана в осадке оз. Черный Кичиер было однородным и варьировало от 870 до 1300 мкмоль  $\text{дм}^{-3}$  (табл. 1).

Содержание органического вещества было очень высоким в поверхностном слое осадка (42% от веса сухого вещества) и уменьшалось с глубиной до 30% на горизонте 28–34 см. Высокое значение величины щелочности в поверхностном горизонте осадка (Alk 11.0 мг экв  $\text{л}^{-1}$ ) по сравнению с нижележащими горизонтами (Alk 5.2–8.0) свидетельствует о высокой интенсивности микробных процессов деструкции органического вещества, протекающих с выделением  $\text{CO}_2$ . Интенсивность темновой ассимиляции  $\text{CO}_2$  (ТАУ), как наиболее общий показатель активности микробных процессов, была весьма высока в поверхностном слое осадка

**Таблица 1.** Физико-химические свойства и активность микробных процессов в донных осадках меромиктического озера Черный Кичиер

Горизонт осадка	Alk	$\text{CH}_4$	$C_{\text{орг}}$	ТАУ	МГ	МО	Индексы альфа-разнообразия микробных сообществ			
							мг экв $\text{дм}^{-3}$	мкмоль $\text{дм}^{-3}$	%	мкмоль $\text{дм}^{-3}$ $\text{сут}^{-1}$
0–6	11.0	870	42	15.0	0.32	4.9	0.08	20640	0.02	5.86
6–12	8.0	1100	37	7.2	0.44	4.4	0.06	2292	0.01	6.12
12–18	6.0	1030	35	5.1	0.29	3.4	0.08	2171	0.02	5.82
18–28	5.2	1300	33	2.1	0.20	3.7	0.10	2066	0.02	5.82
28–34	5.5	1100	30	1.1	0.21	6.1	0.08	1979	0.01	5.79



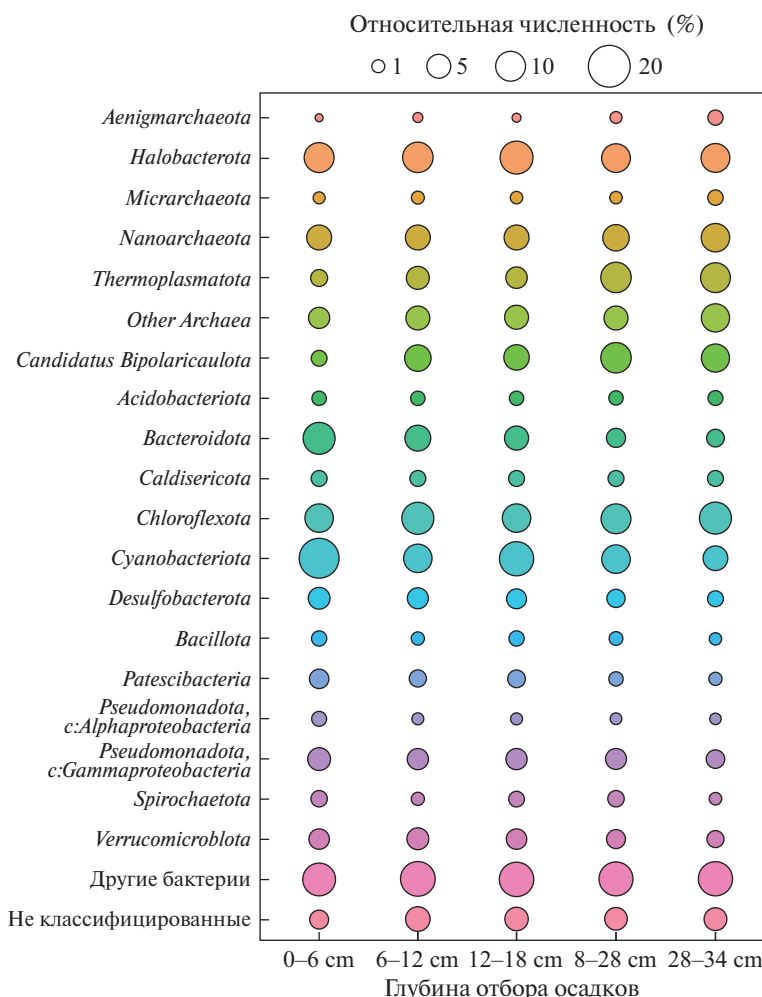


Рис. 1. Состав микробного сообщества в осадках озера Черный Кичиер по результатам высокопроизводительного секвенирования фрагментов гена 16S рРНК.

(15 мкмоль дм<sup>-3</sup>) и быстро снижалась с глубиной осадка (табл. 1). Интенсивность гидрогенотрофного МГ варьировала от 0.20 до 0.44 мкмоль дм<sup>-3</sup> сут<sup>-1</sup>, а МО от 3.6 до 6.1 мкмоль дм<sup>-3</sup> сут<sup>-1</sup>. Все показатели активности микробных процессов оказались близки к известным величинам скоростей микробных процессов в осадках минерализованного бессточного эвтрофного оз. Ши́ра (Саввичев и соавт., 2005), а также в осадках меромиктического оз. Кисло-Сладкое, расположенного на побережье Белого моря (Саввичев и соавт., 2014). Таким образом, по всем выявленным гидрохимическим и биогеохимическим признакам, а также по интенсивности микробных процессов оз. Черный Кичиер является эвтрофным меромиктическим водоемом.

Анализ разнообразия фрагментов гена 16S рРНК показал, что во всех образцах осадка доминировали бактерии, в то время как археи составляли от 23 до 38% сообщества (рис. 1). Индексы альфа-разнообразия указывают на то, что прокариотные сообщества разных слоев осадка разнообразны и имеют примерно 2000 видов (табл. 1).

Придонные слои воды и осадки озера Черный Кичиер представляют собой анаэробные местообитания. Во всех слоях осадка было обнаружено достаточно большое количество цианобактерий, которые, скорее всего, представляют мортмассу (mortmass), осевшую из верхних слоев водной толщи. Кроме цианобактерий, в осадках были представлены филы *Bacteroidota*, *Chloroflexota*, *Desulfobacterota* и *Verrucomicrobiota*. Среди бактерий преобладали гетеротрофные бактерии класса *Gammaproteobacteria* (22.2%), а также филумов *Verrucomicrobiota* (16.4%) и *Bacteroidota* (21.5%) (рис. 1). Среди архей доминировали гидрогенотрофные и ацетокластические метаногены филума *Halobacterota*. Некультивируемые археи были представлены филумами *Aenigmarchaeota*, *Nanoarchaeota*, *Micrarchaeota* и *Thermoplasmata*.

Филум *Thermoplasmata* был представлен группой MBGD, которая с глубиной увеличивала свою долю (рис. 1). Для получения геномов представителей микробного сообщества мы просеквенировали метагеном образца осадка с глубины

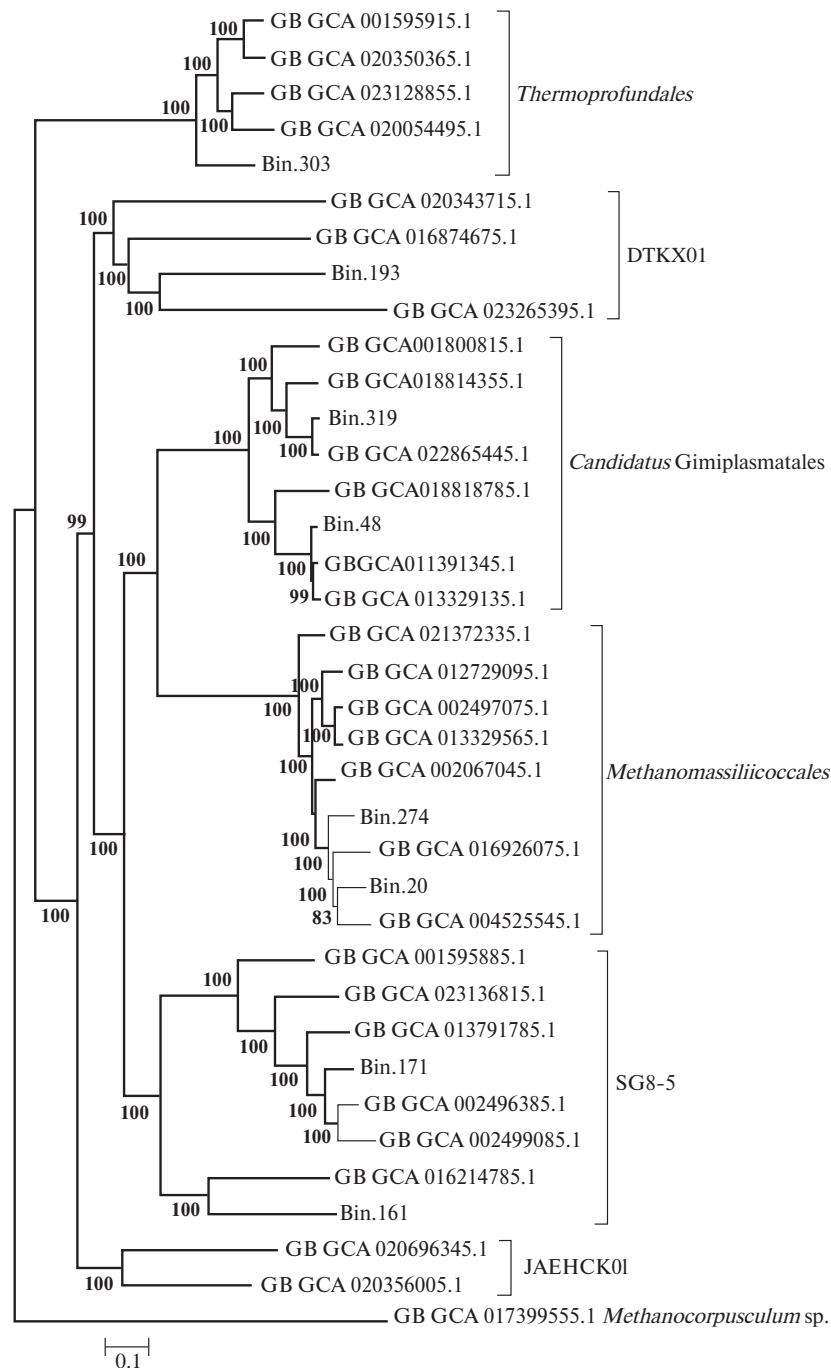


Рис. 2. Филогенетическое дерево, построенное с использованием сопоставления 53 консервативных белков, полученных из MAG *Thermoplasmata*.

28–34 см. Собранные контиги были кластеризованы в 47 MAGs, имеющих полноту свыше 80% и загрязнение менее 10% по оценке CheckM на основе анализа присутствия набора консервативных однокопийных маркерных генов. Таксономическая классификация MAG выявила те же самые основные архейные и бактериальные филумы, которые были обнаружены с помощью 16S рРНК. Чтобы получить представление о метаболических возможностях основных представителей филума

*Thermoplasmata*, мы подробно проанализировали 8 MAGs. Все они имели полноту более 85% и составляли 2.1% от всего метагенома (контиги более 1500 нт). Эти MAGs были отнесены к 5 порядкам — *Methanomassiliococcales*, *Thermoprofundales* (в прошлом называемых Marine Benthic Group D и DHVEG-1), DTKX01, SG8-5 и “*Candidatus Gimiplasmatales*” (бывший UBA10834) (рис. 2) (Hu et al., 2021; Zheng et al., 2022).

Во всех геномах отсутствовали гены, отвечающие за гликолиз и ЦТК, что показывает их неспособность к использованию глюкозы как источника углерода для роста. Глюконеогенез был представлен только в двух MAGs — bin303 и bin161. Ассимиляция формальдегида по RuMP пути была обнаружена в трех MAGs (bin303, bin193, bin161). Автотрофная фиксация углерода по пути Вуда–Льюнгдала была показана только для bin20, bin274 и bin48. Также в bin20 и bin274 были обнаружены гены, ответственные за метаногенез. Метаногенез совместно с путем Вуда–Льюнгдала считается одним из древнейших для образования энергии и фиксации углерода у архей (Borrel et al., 2016).

Таким образом, нами впервые показано, что некультивируемые археи филума *Thermoplasmatota* содержатся в значительном количестве в составе микробного сообщества богатого органическим веществом и сероводородом донного осадка континентального водоема. Ранее считалось, что эти археи являются исключительно обитателями крайне бедных органическим веществом глубинных морских осадков. Такая находка меняет представление о роли архей пяти порядков филума *Thermoplasmatota* в деструкционном сегменте цикла углерода.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность коллективу санатория Кичиер (Республика Марий Эл) за организационную помощь в оборудовании временной лаборатории.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Полевые работы, обработка образцов и анализ молекулярно-биологических данных выполнены сотрудниками ФИЦ Биотехнологии РАН при поддержке проекта РНФ № 22-14-00038. Радиоизотопные исследования выполнены И.И. Русановым в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования.

## 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

Земская Т.И., Букин С.В., Ломакина А.В., Павлова О.Н. Микроорганизмы донных отложений Байкала — самого

глубокого и древнего озера мира // *Микробиология*. 2021. Т. 90. С. 286–303.

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

Кузнецов С.И. Микрофлора озер и ее геохимическая деятельность. Л.: Наука, 1970. 440 с.

Саввичев А.С., Русанов И.И., Rogozin D.Yu., Захарова Е.Е., Лунина О.Н., Брянцева И.А., Юсупов С.К., Пименов С.К., Дегерменджи А.Г., Иванов М.В. Микробиологические и изотопно-геохимические исследования меромиктических озер Хакасии в зимний сезон // *Микробиология*. 2005. Т. 74. С. 552–561.

Savvichev A.S., Rusanov I.I., Zakharova E.E., Lunina O.N., Bryantseva I.A., Yusupov S.K., Pimenov N.V., Ivanov M.V., Rogozin D.Yu., Degermendzhi A.G. Microbiological and isotopic-geochemical investigations of meromictic lakes in Khakasia in winter // *Microbiology (Moscow)*. 2005. V. 74. P. 477–485.

Саввичев А.С., Лунина О.Н., Русанов И.И., Захарова Е.Е., Веслополова Е.Ф., Иванов М.В. Микробиологические и изотопно-геохимические исследования озера Кисло-Сладкое — меромиктического водоема в Кандалакшском заливе Белого моря // *Микробиология*. 2014. Т. 83. № 2. С. 191–203.

Savvichev A.S., Lunina O.N., Rusanov I.I., Zakharova E.E., Veslopolova E.F., Ivanov M.V. Microbiological and isotopic geochemical investigation of lake Kislo-Sladkoe, a meromictic water body at the Kandalaksha Bay shore (White Sea) // *Microbiology (Moscow)*. 2014. V. 83. P. 56–66.

Aleberg J., Bjarnason B.S., De Bruijn I., Schirmer M., Quick J., Ijaz U.Z., Lahti L., Loman N.J., Andersson A.F., and Quince C. Binning metagenomic contigs by coverage and composition // *Nat. Methods*. 2014. V. 11. P. 1144–1146.

Baker B.J., De Anda V., Seitz K.W., Dombrowski N., Santoro A.E., Lloyd K.G. Diversity, ecology, and evolution of Archaea // *Nat. Microbiol.* 2020. V. 5. P. 887–900.  
<https://doi.org/10.1038/s41564-020-0715-z>

Borrel G., Adam P.S., and Gribaldo S. Methanogenesis and the Wood–Ljungdahl pathway: an ancient, versatile, and fragile association // *Genome Biol. Evol.* 2016. V. 8. P. 1706–1711.

Capone D.G., Kiene R.P. Comparison of microbial dynamics in marine and freshwater sediments — contrasts in anaerobic carbon catabolism // *Limnol. Oceanogr.* 1988. V. 33. P. 725–749.

Gorbunov M.Yu., Umanskaya M.V. Karst lakes of Mari Chodra National Park: stratification and vertical distribution of phototrophic plankton 4th Conference on actual problems of specially protected natural areas // *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.* 2020. V. 607. Art. 012019.  
<https://doi.org/10.1088/1755-1315/607/1/012019>

Gorlenko V.M., Dubinina G.A., Kuznetsov S.I. The ecology of aquatic microorganisms. Stuttgart: E. Schweizerbartsche Verlagsbuchhandlung, 1983. 252 p.

Dong X., Greening C., Rattray J.E., Chakraborty A., Chuvichina M., Mayumi D., Dolfing J., Li C., Brooks J.M., Bernard B.B., Groves R.A., Lewis I.A., Hubert C.R.J. Metabolic potential of uncultured bacteria and archaea associated with petroleum seepage in deep-sea sediments // *Nat. Commun.* 2019. V. 10. Art. 1816.  
<https://doi.org/10.1038/s41467-019-09747-0>

- Han X., Schubert C.J., Fiskal A., Dubois N., Lever M.A. Eutrophication as a driver of microbial community structure in lake sediments // *Environ. Microbiol.* 2020. V. 22. P. 3446–3462.
- Hu W., Pan J., Wang B., Guo J., Li M., Xu M. Metagenomic insights into the metabolism and evolution of a new *Thermoplasmata* order (*Candidatus Gimiplasmatales*) // *Environ. Microbiol.* 2021. V. 23. P. 3695–3709.
- Kadnikov V.V., Savvichev A.S., Mardanov A.V., Beletsky A.V., Merkel A.Y., Ravin N.V., Pimenov N.V. Microbial communities involved in the methane cycle in the near-bottom water layer and sediments of the meromictic subarctic Lake Svetloe // *Antonie van Leeuwenhoek.* 2019. V. 112. P. 1801–1814. <https://doi.org/10.1007/s10482-019-01308-1>
- Kadnikov V.V., Mardanov A.V., Beletsky A.V., Banks D., Pimenov N.V., Frank Y.A., Karnachuk O.V., Ravin N.V. A metagenomic window into the 2-km-deep terrestrial subsurface aquifer revealed multiple pathways of organic matter decomposition // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2018. V. 94. Art. fty152.
- Kuznezov S.I., Gorlenko V.M. Limnologische und Mikrobiologische Eigenschaften von Karstseen der A.S.R. Mari // *Arch. Hydrobiol.* 1973. V. 71. P. 475–486.
- Parks D.H., Imelfort M., Skennerton C.T., Hugenholtz P., Tyson G.W. CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes // *Genome Res.* 2015. V. 25. P. 1043–1055.
- Parks D.H., Chuvochina M., Waite D.W., Rinke C., Skarshewski A., Chaumeil P.A., Hugenholtz P. A standardized bacterial taxonomy based on genome phylogeny substantially revises the tree of life // *Nat. Biotechnol.* 2018. V. 36. P. 996–1004.
- Pimenov N.V., Bonch-Osmolovskaya E.A. 2 *in situ* activity studies in thermal environments // *Method. Microbiol.* 2006. V. 35. P. 29–53.
- Rinke C., Rubino F., Messer L.F., Youssef N., Parks D.H., Chuvochina M., Brown M., Jeffries T., Tyson G.W., Seymour J.R., Hugenholtz P. A phylogenomic and ecological analysis of the globally abundant Marine Group II archaea (*Ca. Poseidoniales* ord. nov.) // *ISME J.* 2019. V. 13. P. 663–675. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0282-y>
- Savvichev A., Rusanov I., Dvornikov Y., Kadnikov V., Kallistova A., Veslopolova E., Chetverova A., Leibman M., Sigalevich P., Pimenov N., Ravin N., Khomutov A. The water column of the Yamal tundra lakes as a microbial filter preventing methane emission // *Biogeosci.* 2021. V. 18. P. 2791–2807. <https://doi.org/10.5194/bg-18-2791>
- Zheng P.F., Wei Z., Zhou Y., Li Q., Qi Z., Diao X., Wang Y. Genomic evidence for the recycling of complex organic carbon by novel *Thermoplasmata* clades in deep-sea sediments // *Msystems.* 2022. V. 7. Art. e00077–22.
- Zhou Z., Liu Y., Lloyd K.G., Pan J., Yang Y., Gu J.-D., Li M. Genomic and transcriptomic insights into the ecology and metabolism of benthic archaeal cosmopolitan, *Thermopfundales* (MBG-D archaea) // *ISME J.* 2019. V. 13. P. 885–901. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0321-8>

---



---

## SHORT COMMUNICATIONS

---



---

### Metagenomic Analysis of Bottom Sediments of the Karst Meromictic Lake Black Kichier Revealed Abundant Unculturable *Thermoplasmata*

V. V. Kadnikov<sup>1, \*</sup>, A. S. Savvichev<sup>2</sup>, I. I. Rusanov<sup>2</sup>, A. V. Beletskii<sup>1</sup>, and N. V. Pimenov<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Skryabin Institute of Bioengineering, Research Centre of Biotechnology,  
Russian Academy of Sciences, Moscow, 117312 Russia

<sup>2</sup>Winogradsky Institute of Microbiology, Research Centre of Biotechnology,  
Russian Academy of Sciences, Moscow, 117312 Russia

\*e-mail: vkadnikov@bk.ru

Received November 1, 2023; revised November 9, 2023; accepted November 9, 2023

**Abstract**—Investigations into the microbial community of bottom sediments in the karst lake Black Kichier were conducted. These sediments exhibited elevated levels of sulfide, dissolved methane, and organic matter. Direct radiotracer experiments revealed substantial rates of microbial processes involved in the decomposition of organic matter. Uncultivated archaea belonging to the phylum *Thermoplasmata* were identified within the microbial community. Metagenomic analysis unveiled representatives from five orders: *Methanomassiliicoccales*, *Thermopfundales* (formerly known as Marine Benthic Group D and DHVEG-1), DTX01, SG8-5, and *Candidatus Gimiplasmatales* (formerly UBA10834). These archaea were previously believed to occur exclusively in deep marine sediments characterized by extreme organic matter scarcity. This discovery reshapes our understanding of the role played by *Thermoplasmata* archaea, spanning five orders, in the degradation segment of the carbon cycle.

**Keywords:** *Thermoplasmata*, meromictic lakes, bottom sediments, microbial communities, 16S rRNA, metagenome



УДК 579.222.4

## ОДНОСТАДИЙНАЯ БИОТРАНСФОРМАЦИЯ ФИТОСТЕРИНА В ТЕСТОСТЕРОН РЕКОМБИНАНТНЫМИ ШТАММАМИ *MYCOLICIBACTERIUM NEOAURUM*

© 2024 г. Д. Н. Текучева<sup>а, \*</sup>, М. В. Карпов<sup>а</sup>, В. В. Фокина<sup>а</sup>, Т. И. Тимакова<sup>а</sup>,  
А. А. Шутов<sup>а</sup>, М. В. Донова<sup>а</sup>

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

\*e-mail: tekuchevadn@gmail.com

Поступила в редакцию 13.10.2023 г.

После исправления 26.10.2023 г.

Принята к опубликованию 28.10.2023 г.

Конститутивная гетерологичная экспрессия в штаммах *Mycolicibacterium neoaurum*, продуцентах ценных C<sub>19</sub>-стероидов, генов, кодирующих грибную 17β-гидроксистероиддегидрогеназу (17β-ГСД), ответственную за восстановление кислородного заместителя в стероидном ядре по положению С-17, и микобактериальную глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу (Г6ФД), способствующую синтезу кофермента НАД(Ф)Н, необходимого для активности 17β-ГСД, позволило существенно повысить выход С-17 гидроксистероидов: тестостерона (Т) и 1(2)-дегидротестостерона (дТ). При этом рекомбинантные штаммы, созданные на основе *M. neoaurum* ВКМ Ас-1815D и *M. neoaurum* NRRL В-3805 Δ *kstD*, накапливали преимущественно Т, а *M. neoaurum* ВКМ Ас-1816D – одновременно Т и дТ.

**Ключевые слова:** трансформация стероидов, тестостерон, фитостерин, миколицибактерии, гетерологичная экспрессия, цельноклеточный катализ

DOI: 10.31857/S0026365624020033

Потребности мирового фармацевтического рынка в стероидных препаратах уступают первенство только антибиотикам (Fernandez-Cabezón et al., 2017). Тестостерон (Т, андрост-4-ен-17β-ол-3-он) и его производные применяются при эндокринных нарушениях и заболеваниях обмена веществ, таких как ожирение, недостаточность обмена белков, липидов, микро- и макроэлементов, возрастные изменения и другие.

Использование фитостероидов в биотехнологическом производстве стероидных синтонов и конечных субстанций обеспечивает снижение их себестоимости (Допова, 2017). Биотрансформацией фитостероидов получают ценные ключевые C<sub>19</sub>-синтоны: андростендион (АД), андростадиендион (АДД), 9α-гидроксиандрост-4-ен-3,17-дион (9α-ОН-АД). Далее из АД и АДД возможно получить путем химического синтеза практически все фармацевтически ценные стероидные соединения, например, половые гормоны, включая тестостерон, а также гидрокортизон, минералокортикоиды и другие (García et al., 2012; Допова, 2023).

Быстрорастущие непатогенные актинобактерии рода *Mycolicibacterium* (*M. smegmatis*, *M. fortuitum* и *M. neoaurum*) способны окислять боковую цепь

стероидов и трансформировать стероидное ядро. Наличие в клеточной стенке миколовых кислот (Daffe et al., 1993) является крайне важным для обеспечения активного транспорта и биодоступности стероидов для ферментных систем клеток миколицибактерий. Для повышения выхода АД и АДД при биоконверсии фитостерина активно применяются мутантные и рекомбинантные штаммы рода *Mycolicibacterium* (Shao et al., 2019; Zhou et al., 2020).

3-кетостероид-Δ<sup>1</sup>-дегидрогеназы (КстД) представляют собой флавоферменты, которые катализируют депротонирование С1(α) и С2(β) в стероидном кольце А, и являются ключевыми в превращении АД в АДД (van der Geize et al., 2000). Искусственным генетическим нокаутом ключевого гена *kstD* был создан штамм *M. neoaurum* NRRL В-3805 Δ *kstD* (Lorraine, Smith, 2017). Делеция в гене *kstD* должна приводить к преимущественному накоплению АД в ходе каскадной реакции окисления алифатической цепи фито- и холестерина. Однонуклеотидная замена в гене *kstD* (Bragin et al., 2013) определяет преимущественное накопление АД штаммом Ас-1815D и, напротив, АДД штаммом Ас-1816D (Egorova et al., 2009; Tekucheva et al., 2022).



Биотехнологический способ получения Т в одну стадию в одном биореакторе является экологически и экономически более привлекательным по сравнению с многостадийными технологиями, включающими химический синтез. Создание среды культивирования, способствующей активному росту штамма *M. neoaurum* и дисперсному распределению слабо растворимого фитостерина, а также подбор оптимальных условий аэрации и режима внесения глюкозы, позволили существенно повысить выход Т (Tekucheva et al., 2022). Интенсивная аэрация способствует росту культуры и окислению боковой цепи фитостерина (Szentirmai, 1990), напротив, слабая аэрация способствует НАДН-зависимому процессу восстановления АД до Т (Tekucheva et al., 2022).

Основными стратегиями метаболической инженерии для повышения продуктивности и селективности трансформации стерина штаммами *Mycolicibacterium* являются: 1) блокировка метаболических путей деградации стероидного ядра и синтеза побочных продуктов (Пошехонцева и соавт., 2023); 2) введение новых или более эффективных ферментов целевых реакций (данная работа); 3) улучшение транспорта стероидов в клетку (He et al., 2018; Xiong et al., 2020); 4) оптимизация путей, не связанных с модификацией стероидов, но влияющих на регенерацию их коферментов (Su et al., 2018; данная работа), синтез АТФ (Zhou et al., 2020), уровень активных форм кислорода (Shao et al., 2019).

Известно 14 подтипов 17 $\beta$ -ГСД суперсемейства короткоцепочечных дегидрогеназ-редуктаз (SDR), катализирующих обратимое окисление/восстановление заместителя в положении С-17 различных стероидов (Marchais-Oberwinkler et al., 2011). В геномах близкородственных штаммов *M. neoaurum* ВКМ Ас-1815D и Ас-1816D выявлен ген *hds4A* (Bragin et al., 2013), являющийся ортологом гена из штамма *M. neoaurum* ATCC25795, кодирующего 17 $\beta$ -гидроксистероиддегидрогеназу (17 $\beta$ -ГСД). Миколицибактериальная 17 $\beta$ -ГСД окисляет Т до АД и дТ до АДД (Xu et al., 2016). 17 $\beta$ -оксостероид-редуктазная активность штаммов *M. neoaurum* ВКМ Ас-1815D и Ас-1816D является НАД(Н)-зависимой (Tekucheva et al., 2022).

Количественная оценка активности соответствующих ферментов позволила заключить, что гетерологичная коэкспрессия генов, кодирующих грибную 17 $\beta$ -ГСД из штамма *Cochliobolus lunatus* и бактериальную глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу (Г6ФД) из штамма *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv в клетках миколицибактерий является лучшей стратегией для получения штамма с повышенной 17-оксостероид-редуктазной-активностью (Karpov et al., 2019).

Целью настоящей работы являлось создание рекомбинантных штаммов *M. neoaurum*, трансформирующих фитостерин в высоких (5–20 г/л) концентрациях в тестостерон, на основе гетерологической

экспрессии генов, кодирующих эукариотическую 17 $\beta$ -ГСД *C. lunatus* и бактериальную Г6ФД *M. tuberculosis* H37Rv, под конститутивным промотором *Phsp60* в составе бицистронной конструкции.

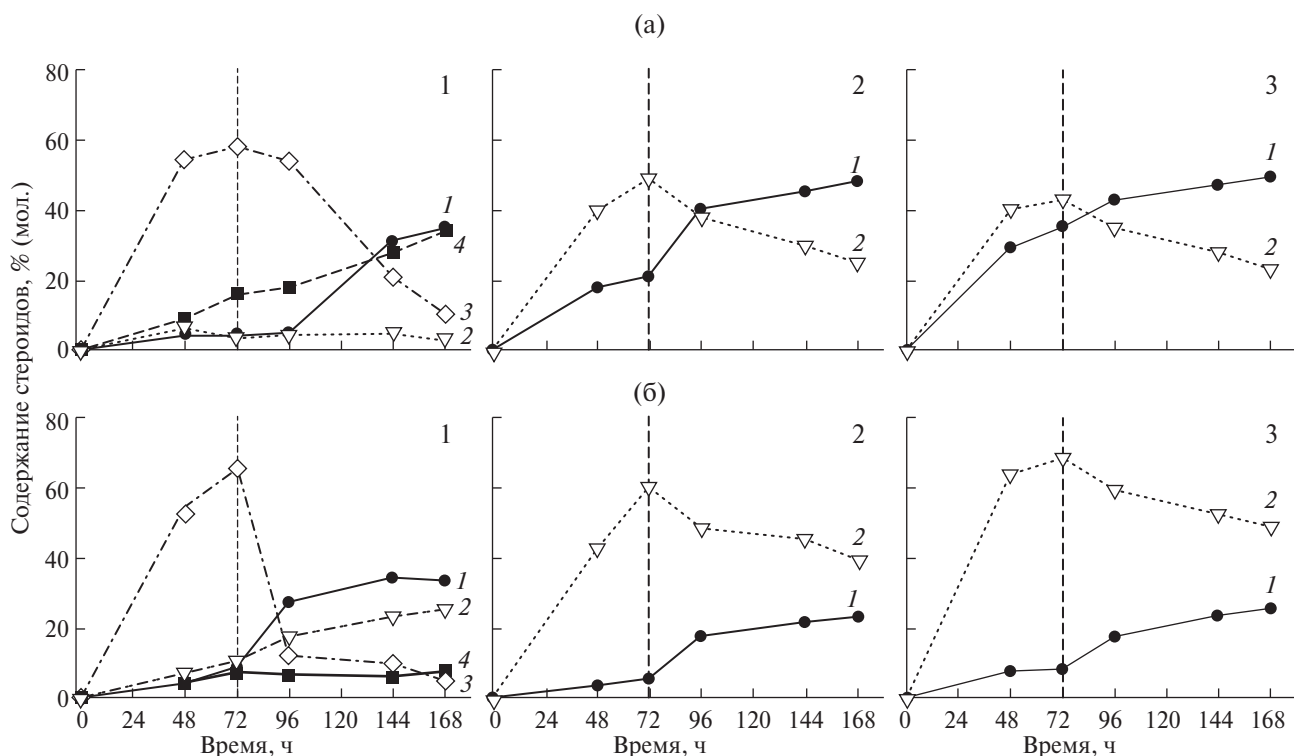
**Реактивы.** В работе использованы реактивы: фитостерин с общим содержанием стерина 95.47% (“Jiangsu Spring Fruit Biological Products Co.”, Китай); дрожжевой экстракт (“Difco”, США); кукурузный экстракт (“Sigma”, Франция); соевый пептон (“Hi Media”, Индия); метилированный  $\beta$ -цикодекстрин W7 M1.8 (“Wacker Chemie”, Германия); Tween-80 (“Panreac”, Испания), полножирная соевая мука (ООО “Протеин-плюс”, Россия); агароза (“Invitrogen”, Великобритания); ДНК-модифицирующие ферменты и наборы для экстракции ДНК (“Thermo Fisher”, США); реагенты и колонки для препаративного выделения и очистки плазмидной ДНК (“QIAGEN”, США) и другие реактивы квалификации х.ч. или ч.д.а.

**Микроорганизмы, штаммы и условия культивирования.** Штаммы *M. neoaurum* ВКМ Ас-1815D и Ас-1816D получены из Всероссийской коллекции микроорганизмов Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН (ВКМ), *M. neoaurum* NRRL B-3805  $\Delta$ *kstD* (B-3805 D) – от доктора М. Смит (Университет Йорка, Великобритания) (Loraine, Smith, 2017). *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (“Thermo Fisher Scientific”, США) использовали для клонирования плазмидных конструкций. Для селекции в среды вносили 20 и 50 мкг/мл канамицина для трансформированных плазмидами штаммов *E. coli* и *M. neoaurum*, соответственно.

**Создание рекомбинантных штаммов.** Химически синтезированная ДНК-последовательность генов, кодирующих грибную 17 $\beta$ -ГСД из *C. lunatus* и бактериальную Г6ФД второго типа из *M. tuberculosis* H37Rv (Strizhov et al., 2016), была клонирована в составе одного оперона по сайтам рестрикции *NdeI* и *HindIII* в экспрессионном векторе pMV261N (Fufaeva et al., 2023) под контролем конститутивного промотора *Phsp60* из *Mycobacterium bovis*. Полученная рекомбинантная плазмида pMVN25 и вектор pMV261N были перенесены электропорацией в клетки миколицибактерий, как описано в работе Loraine, Smith (2017), с использованием прибора MicroPulser (“Bio-Rad”, США).

**Культивирование штаммов, проведение и анализ продуктов трансформации фитостерина.** Выращивание инокулята, проведение трансформации фитостерина целыми клетками (с ежедневным добавлением 5 г/л глюкозы), приготовление среды для процесса (вариант В с заменой пальмитат-стеарата натрия на Tween-80), а также методы анализа стероидов приведены в работе Tekucheva et al. (2022).

**Математическая обработка данных.** Молярный выход продуктов трансформации (% (мол.)) оценивали как процентное отношение молярных концентраций продукта к субстрату. Эксперименты



**Рис. 1.** Трансформация 5 г/л фитостерина родительскими штаммами *M. neoaurum* ВКМ Ас-1816D (16), ВКМ Ас-1815D (26), NRRL В-3805  $\Delta kstD$  (36) и рекомбинантными штаммами, несущими бицистронную генетическую конструкцию под регуляцией конститутивного промотора, созданными на их основе (1а, 2а, 3а, соответственно). Вертикальной пунктирной чертой обозначен момент перехода из окислительного в восстановительный режим. 1 – Т; 2 – АД; 3 – АДД; 4 – дТ.

повторялись 2–4 раза. Стандартное отклонение составляло не более 4–9% и не приведено на рисунке 1, в таблице 1 и приложении для более ясного представления данных.

В качестве платформ для создания рекомбинантных продуцентов были использованы штаммы *M. neoaurum* ВКМ Ас-1816D, ВКМ Ас-1815D, NRRL В-3805  $\Delta kstD$ . Сконструированная плазмида pMVN25 (доп. материалы, рис. S1) позволила осуществить в клетках миколицибактерий совместную конститутивную экспрессию синтетических генов, кодирующих 17 $\beta$ -ГСД и Г6ФД. Созданные рекомбинанты *M. neoaurum* ВКМ Ас-1816D (pMV261N) (сокращенно 1816 N25), ВКМ Ас-1815D (pMV261N) (1815 N25), NRRL В-3805  $\Delta kstD$  (pMV261N) (В-3805D N25) не отличались от родительских штаммов по культурально-морфологическим свойствам при росте на плотной среде, а также по скорости роста в жидкой среде (доп. материалы, рис. S2).

Трансформация фитостерина длилась 120 ч и проходила в два этапа: 1) в окислительном этапе (интенсивная аэрация, 0–72 ч) происходило преимущественное накопление С-17-оксостероидов (АД и/или АДД), 2) в восстановительном этапе (сниженная аэрация, 72–120 ч) накапливались С-17-гидроксистероиды (Т и/или дТ).

Доминантным продуктом на окислительном этапе для штаммов *M. neoaurum* ВКМ Ас-1816D и 1816 N25 был АДД, его концентрация достигала 65.2 и 58.4% (мол.), соответственно. Более низкое накопление АДД при использовании рекомбинанта 1816 N25 связано с восстановлением АДД до дТ (рис. 1а); в отличие от родительского штамма, 17-ГСД активность в штамме 1816 N25 проявлялась в окислительном режиме при активной аэрации (рис. 1а, 1б).

В восстановительном этапе наблюдалось активное накопление Т как у родительского (Ас-1816D), так и у рекомбинантного (1816 N25) штаммов. Однако у рекомбинанта 1816 N25 образующиеся Т и дТ являются доминантными продуктами, формирование которых возможно по двум путям: 1) АДД  $\rightarrow$  дТ  $\rightarrow$  Т; 2) АДД  $\rightarrow$  АД  $\rightarrow$  Т. Изучение последовательности ферментативных реакций, осуществляемых 17 $\beta$ -ГСД и КстД, приводящих к превращению пути (1) или (2) в рекомбинантном штамме 1816 N25, является предметом дальнейших исследований. У родительского штамма Ас-1816D биоконверсия идет по пути (2), о чем свидетельствует параллельное накопление АД и Т при снижении содержания АДД в среде. У некоторых штаммов миколицибактерий двойное восстановление АДД (АДД  $\rightarrow$  АД  $\rightarrow$  Т) было более эффективным для

**Таблица 1.** Выход С-17 гидроксистероидов в процессе трансформации 5 и 20 г/л фитостерина родительскими и рекомбинантными штаммами миколицибактерий (н/о — не обнаружено (ниже порога чувствительности метода); н/п — неприменимо)

№ п/п	Штамм	Нагрузка фитостерина, г/л	Выход Т, % (мол.)	Выход дТ, % (мол.)	Суммарный выход С-17 гидроксистероидов, % (мол.)	Титр Т, г/л
1	Ac-1816D	5	31.9	7.2	39.1	1.1
2	1816 N25		34.8	33.1	67.9	1.2
3	Ac-1816D	20	10.9	3.7	14.6	1.5
4	1816 N25		26.8	9.2	36.0	3.7
5	Ac-1815D	5	22.8	н/о	н/п	0.8
6	1815 N25		47.4	н/о	н/п	1.6
7	Ac-1815D	20	13.8	н/о	н/п	0.5
8	1815 N25		32.2	н/о	н/п	4.4
9	B-3805D	5	20.7	н/о	н/п	0.7
10	B-3805D N25		49.5	н/о	н/п	1.7
11	B-3805D	20	9.5	н/о	н/п	1.4
12	B-3805D N25		27.1	н/о	н/п	4.1

синтеза Т, чем одиночное восстановление 17-оксогруппы АД (АД → Т) (Hung et al., 1994; Egorova et al., 2009).

Для штаммов *M. neoaurum* ВКМ Ac-1815D и NRRL B-3805  $\Delta kstD$  основным промежуточным продуктом окисления фитостерина являлся АД (рис. 16, 26). Как и для штамма Ac-1816D, у родительских штаммов Ac-1815D и B-3805  $\Delta kstD$  выход основного интермедиата в конце окислительного этапа оказался повышенным по сравнению с рекомбинантами. Также в окислительной фазе наблюдали существенное накопление Т — продукта восстановления АД, что свидетельствует о повышенной 17-оксостероид-редуктазной активности у рекомбинантных штаммов (рис. 2а, 3а). Достигнутый с помощью рекомбинантных штаммов 1815 N25 и B-3805D N25 выход и титр Т составил 47.7 и 49.5% (мол.) и 1.6–1.7 г/л, соответственно, (табл. 1).

Фитостерин (5 г/л) утилизировался практически полностью (94.5–99.3%) к началу восстановительной стадии биоконверсии. При увеличении начальной концентрации фитостерина до 20 г/л эффективность его трансформации в Т понизилась у всех изучаемых штаммов. Это связано со снижением эффективности утилизации до 75–82%, и, как следствие, с меньшим накоплением АД/АДД на конец окислительного этапа. Полученные при биоконверсии 20 г/л фитостерина титры Т, составившие 3.7, 4.1 и 4.4 г/л (табл. 1, пп. 4, 8, 12), тем не менее значительно превышают значения, полученные при биоконверсии 5 г/л фитостерина.

Выбор в качестве организма-хозяина штаммов вида *M. neoaurum* обусловлен, с одной стороны, изученностью их путей и ферментов стероидного катаболизма (Donova, 2023), с другой стороны,

показанной ранее возможностью одностадийного получения Т из фитостерина (Tekucheva et al., 2022).

Для смещения реакции в сторону 17-оксостероид-редуктазной активности, осуществляемой эукариотической НАД(Ф)Н-зависимой 17 $\beta$ -ГСД, с образованием дТ и Т из АДД и АД, соответственно, необходимо достаточное количество восстановленных коферментов НАД(Ф)Н (Tekucheva et al., 2022). Поэтому целевыми генами бицистронной конструкции были: ген грибной 17 $\beta$ -ГСД из *C. lunatus* и ген бактериальной глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФД) из *M. tuberculosis* H37Rv (Karpov et al., 2019).

Самый высокий выход С-17 гидроксистероидов: Т и дТ был показан для всех полученных рекомбинантных штаммов по сравнению с родительскими. Судя по выходу Т, у рекомбинантов 17-оксостероид-редуктазная активность увеличилась в 2–3 раза по сравнению с родительскими штаммами. Для штамма 1816 N25 был получен практически равный выход Т и дТ при биоконверсии 5 г/л фитостерина; однако при учете суммарной 17-оксостероид-редуктазной активности в отношении АД и АДД преимущество рекомбинанта над родительским штаммом становится очевидным (табл. 1, пп. 1, 2).

К настоящему времени молярный выход получаемого биотехнологическими способами Т не превышает 52% даже при низких нагрузках фитостерина – до 5 г/л (Vorrego et al. 2000; Kumar et al. 2001; Lo et al., 2002; Egorova et al. 2009; Fernandez-Cabezón et al. 2017). Таким образом, полученные результаты значительно превосходят известные данные и свидетельствуют о перспективности выбранного подхода.



## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено по гос. заданию Министерства науки и высшего образования РФ (тема № 122040500054-3).

## 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

- Карпов М.В., Николаева В.М., Фокина В.В., Шутов А.А., Казанцев А.В., Стрижов Н.И., Донова М.В. Конструирование и функциональный катализ рекомбинантных штаммов *Mycolicibacterium smegmatis*, несущих гена бациллярных цитохромов CYP106A1 и CYP106A2 // Биотехнология. 2021. Т. 37. № 6. С. 34–37.
- Karpov M.V., Nikolaeva V.M., Fokina V.V., Shutov A.A., Kazantsev A.V., Strizhov N.I., Donova M.V. Creation and functional analysis of *Mycolicibacterium smegmatis* recombinant strains carrying the bacillary cytochromes CYP106A1 and CYP106A2 genes // Appl. Biochem. Microbiol. 2022. V. 58. P. 947–957.
- Пошехонцева В.Ю., Стрижов Н.И., Карпов М.В., Николаева В.М., Казанцев А.В., Сазонова О.И., Шутов А.А., Донова М.В. Экспрессия синтетического гена CYP102A1-LG23 и функциональный анализ рекомбинантного цитохрома P450 BM3-LG23 в актинобактериях *Mycolicibacterium smegmatis* // Биохимия. 2023. Т. 88. С. 1631–1641.
- Poshekhontseva V.Y., Strizhov N.I., Karpov M.V., Nikolaeva V.M., Kazantsev A.V., Sazonova O.I., Shutov A.A., Donova M.V. Expression of synthetic cyp102A1-LG23 gene and functional analysis of recombinant cytochrome P450 BM3-LG23 in the actinobacterium *Mycolicibacterium smegmatis* // Biochemistry (Moscow). 2023. V. 88. P. 1347–1355.
- Borrego S., Niubó E., Ancheta O., Espinosa M.E. Study of the microbial aggregation in *Mycobacterium* using image analysis and electron microscopy // Tissue Cell. 2000. V. 32. P. 494–590.
- Bragin E., Shtratnikova V., Dovbnaya D., Schelkunov M., Pekov Y., Malakho S., Egorova O., Ivashina T., Sokolov S., Ashapkin V., Donova M. Comparative analysis of genes encoding key steroid core oxidation enzymes in fast-growing *Mycobacterium* spp. Strains // J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 2013. V. 138. P. 41–53.
- Daffe M., McNeil M., Brennan P.J. Major structural features of the cell wall arabinogalactans of *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, and *Nocardia* spp. // Carbohydr. Res. 1993. V. 249. P. 383–398.
- Donova M.V. Current trends and perspectives in microbial bioconversions of steroids // Microbial Steroids. Methods in Molecular Biology / Eds. Barreiro C., Barredo J.L.: New York: Humana Press., 2023. V. 2704. P. 3–21.
- Egorova O., Nikolayeva V., Sukhodolskaya G., Donova M. Transformation of C19-steroids and testosterone production by sterol-transforming strains of *Mycobacterium* sp. // J. Mol. Catal. B. Enzym. 2009. V. 57. P. 198–203.
- Fernandez-Cabezón L., Galan B., García J.L. Engineering *Mycobacterium smegmatis* for testosterone production // Microb. Biotechnol. 2017. V. 10. P. 151–161.
- Fufaeva S., Dovbnaya D., Ivashina T., Shutov A., Donova M. Reconstruction of steroid 1(2)-dehydrogenation system from *Nocardioides simplex* VKM Ac-2033D in *Mycolicibacterium* hosts // Microorganisms. 2023. V. 11. Art. 2720.
- García J.L., Uña I., Galan B. Catabolism and biotechnological applications of cholesterol degrading bacteria // Microb. Biotechnol. 2012. V. 5. P. 679–699.
- He K., Sun H., Song H. Engineering phytosterol transport system in *Mycobacterium* sp. strain MS136 enhances production of 9-hydroxy-4-androstene-3,17-dione // Biotechnol. Lett. 2018. V. 40. P. 673–678.
- Hung B., Falero A., Llanes N., Pérez C., Ramirez M.A. Testosterone as biotransformation product in steroid conversion by *Mycobacterium* sp. // Biotechnol. Lett. 1994. V. 16. P. 497–500.
- Kumar R., Dahiya J.S., Singh D., Nigam P. Biotransformation of cholesterol using *Lactobacillus bulgaricus* in a glucose-controlled bioreactor // Bioresour. Technol. 2001. V. 78. P. 209–211.
- Lo C.K., Pan C.P., Liu W.H. Production of testosterone from phytosterol using a single-step microbial transformation by a mutant of *Mycobacterium* sp. // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2002. V. 28. P. 280–283.
- Loraine J.K., Smith M.C.M. Genetic techniques for manipulation of the phytosterol biotransformation strain *Mycobacterium neoaurum* NRRL B-3805 // Microbial Steroids. Methods in Molecular Biology / Eds. Barredo J.L., Heráiz I. New York, NY: Springer New York, 2017. V. 1645. P. 93–108.
- Shao M., Zhao Y., Liu Y., Yang T., Xu M., Zhang X., Rao Z. Intracellular environment improvement of *Mycobacterium neoaurum* for enhancing androst-1,4-diene-3,17-dione production by manipulating NADH and reactive oxygen species levels // Molecules. 2019. V. 24. P. 3841.
- Strizhov N., Karpov M., Sukhodolskaya G., Nikolayeva V., Fokina V., Shutov A., Donova M. Development of mycobacterial strains producing testosterone // Proc. Natl. Acad. Sci. Belarus. Chemical Series. 2016. № 3. P. 57–58.
- Su L., Shen Y., Gao T., Cui L., Luo J., Wang M. Regulation of NAD (H) pool by overexpression of nicotinic acid phosphoribosyltransferase for AD (D) production in *Mycobacterium neoaurum* // Lect. Notes Electr. Eng. 2018. V. 444. P. 357–364.

- Szentirmai A. Microbial physiology of sidechain degradation of sterols // J. Ind. Microbiol. 1990. V. 6. P. 101–116.
- Tekucheva D.N., Nikolayeva V.M., Karpov M.V., Timakova T.A., Shutov A.V., Donova M.V. Bioproduction of testosterone from phytosterol by *Mycolicibacterium neoaurum* strains: “one-pot”, two modes // Bioresour. Bioprocess. 2022. V. 9. P. 116.
- Xiong L.B., Liu H.H., Zhao M., Liu Y.J., Song L., Xu Y.X., Wang F.Q., Wei D.Z. Enhancing the bioconversion of phytosterols to steroidal intermediates by the deficiency of *kasB* in the cell wall synthesis of *Mycobacterium neoaurum* // Microb. Cell Factories. 2020. V. 19. P. 1–11.
- Zhou X., Zhang Y., Shen Y., Zhang X., Zan Z., Xia M., Luo J., Wang M. Efficient repeated batch production of androstenedione using untreated cane molasses by *Mycobacterium neoaurum* driven by ATP futile cycle // Bioresour. Technol. 2020. V. 309. P. 123307.

---

---

**SHORT COMMUNICATIONS**

---

---

## Single-Stage Bioconversion of Phytosterol into Testosterone by Recombinant Strains of *Mycolicibacterium neoaurum*

D. N. Tekucheva<sup>1</sup>, \*, M. V. Karpov<sup>1</sup>, V. V. Fokina<sup>1</sup>, T. I. Timakova<sup>1</sup>, A. A. Shutov<sup>1</sup>,  
and M. V. Donova<sup>1</sup>

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

\*e-mail: tekuchevadn@gmail.com

Received October 13, 2023; revised October 26, 2023; accepted October 28, 2023

**Abstract**—A plasmid containing the genes of a fungal 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase, which catalyzes the reduction of the steroid core at the C17 position, and mycobacterial glucose-6-phosphate dehydrogenase, which promotes the recycling of the essential coenzyme NAD(P)H, was constructed. Its constitutive expression in well-studied *Mycolicibacterium neoaurum* strains made it possible to increase significantly the yield of C-17 hydroxysteroids. In particular, recombinant strains created on the basis of *M. neoaurum* VKM Ac-1815D and *M. neoaurum* NRRL B-3805  $\Delta$ *kstD* exhibited predominant accumulation of testosterone, while the strain based on *M. neoaurum* VKM Ac-1816D accumulated dehydrotestosterone and testosterone simultaneously.

**Keywords:** transformation of steroids, testosterone, phytosterol, *Mycolicibacterium*, heterologous expression, whole-cell catalysis

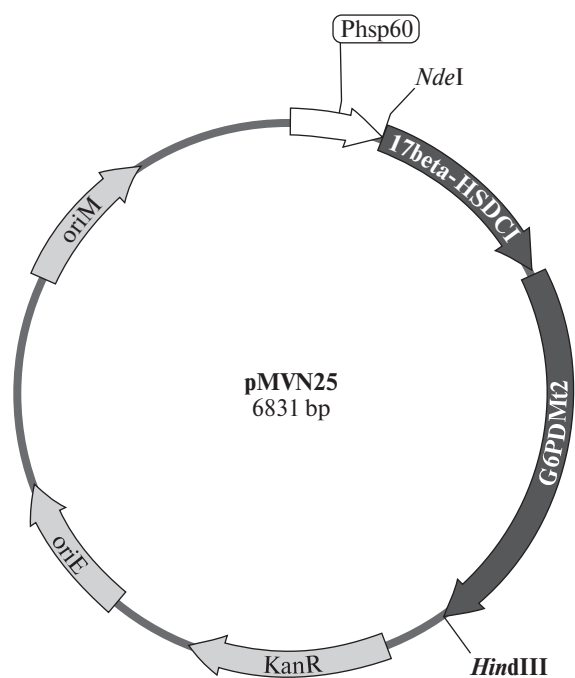


## ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

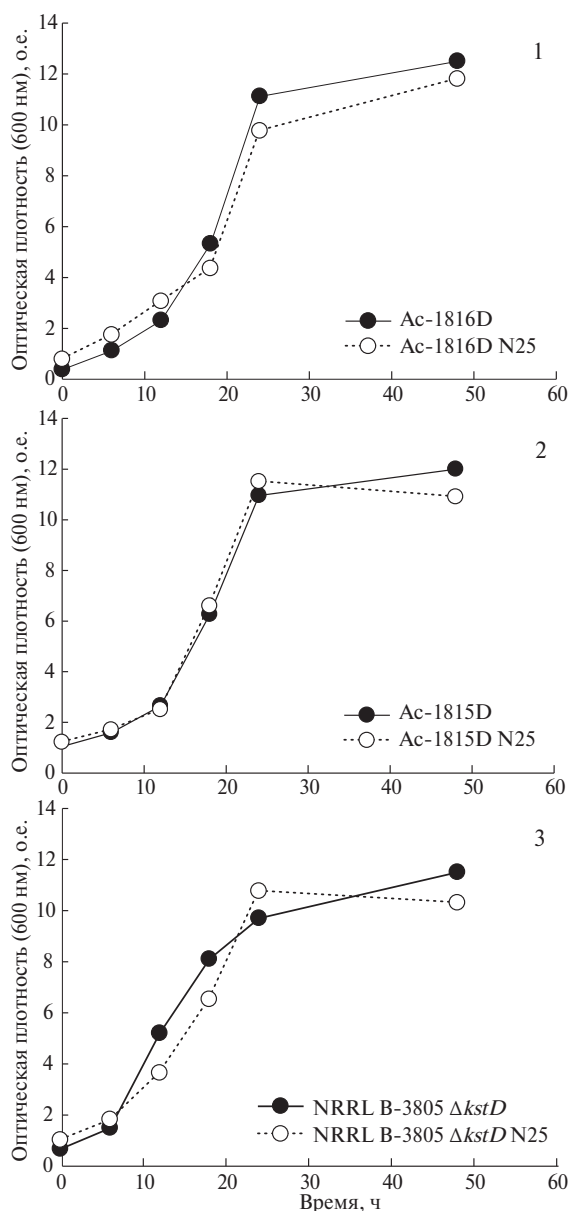
ОДНОСТАДИЙНАЯ БИОТРАНСФОРМАЦИЯ ФИТОСТЕРИНА  
В ТЕСТОСТРОН РЕКОМБИНАНТНЫМИ ШТАММАМИ  
*MYCOLICIBACTERIUM NEOAURUM*

© 2024 Д. Н. Текучева<sup>а, \*</sup>, М. В. Карпов<sup>а</sup>, В. В. Фокина<sup>а</sup>, Т. И. Тимакова<sup>а</sup>,  
А. А. Шутов<sup>а</sup>, М. В. Донова<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН,  
ФИЦ “Пушинский научный центр биологических исследований РАН”, Пушкино, 142290 Россия  
\*e-mail: tekuchevadn@gmail.com



**Рис. S1.** Структура рекомбинантной плазмиды pMVN25. Синтетические гены, кодирующие 17 $\beta$ -ГСД из *Cochliobolus lunatus* (17 $\beta$ -HSDC1) и бактериальную Г6ФДГ 2 типа из *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (G6PDMt2), были клонированы в векторе pMV261N под контролем конститутивного промотора Phsp60. Плазмида содержит каскету устойчивости к канамицину (KanR) и точки начала репликации в клетках *E. coli* (oriE) и микобактериях (oriM).



**Рис. S2.** Динамика роста родительских штаммов *M. neoaurum* ВКМ Ac-1815D (1), Ac-1816D (2), NRRL B-3805  $\Delta kstD$  (3) и рекомбинантных штаммов, созданных на их основе путем трансформации плазмидой pMVN25 (N25)

## ПРОДУКЦИОННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ СОЛЕНОЙ РЕКИ ЧЕРНАВКА (ПРИЭЛЬТОНЬЕ)

© 2024 г. Т. А. Канапацкий<sup>а, \*</sup>, О. С. Самылина<sup>а</sup>, Л. В. Головатюк<sup>б, с</sup>,  
И. И. Русанов<sup>а</sup>, Е. Е. Захарова<sup>а</sup>, В. В. Кевбрин<sup>а</sup>, Т. Д. Зинченко<sup>б</sup>, Н. В. Пименов<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, 119071, Россия

<sup>б</sup>Институт экологии Волжского бассейна РАН, Тольятти, 445003, Россия

<sup>с</sup>Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН,

пос. Борок, Некоузский р-н, Ярославская обл., 152742 Россия

\*e-mail: timkanap@yandex.ru

Поступила в редакцию 16.10.2023 г.

После доработки 13.11.2023 г.

Принята к публикации 16.11.2023 г.

Радиоизотопным методом определена интенсивность первичной продукции планктонных сообществ, которая в разные сезоны изменялась в широком диапазоне от 6 до 314 мкг С/л/ч. В цианобактериальных матах интенсивность первичной продукции составляла  $4.2\text{--}10.9 \times 10^3$  мкг С/дм<sup>3</sup>/ч, а содержание Chl *a* варьировало от 6–13 мг Chl *a*/м<sup>2</sup> до 132–140 мг Chl *a*/м<sup>2</sup>. В планктоне наибольшие показатели выявлены летом ( $25\text{--}46$  мг Chl *a*/м<sup>3</sup>) с наибольшим значением в августе – 223 мг Chl *a*/м<sup>3</sup>. Обнаружены высокие значения численности бактериопланктона ( $0.3\text{--}7.4 \times 10^6$  кл/мл) и массовое развитие диатомовых водорослей ( $0.15 \times 10^6$  кл/мл) с доминированием представителей рода *Chaetoceros*. Интенсивность сульфатредукции варьировала от 0.037 мкмоль S/дм<sup>3</sup>/ч в верхнем течении до 61.87 мкмоль S/дм<sup>3</sup>/ч в устьевом участке.

**Ключевые слова:** первичная продукция, сульфатредукция, планктон, цианобактериальные сообщества, соленые реки, соленое озеро

DOI: 10.31857/S0026365624020046

На севере прикаспийской низменности располагается самое крупное в Европе соленое самосадочное озеро Эльтон. Экосистема озера с большим градиентом солёности представляет собой высокопродуктивный оазис жизни в суровых условиях резко континентального климата опустыненных степей (Golovatyuk et al., 2020).

Питание озера происходит за счет впадения 7 рек с разной солёностью (9.8–335‰). В устьевых мелководных (2–5 см) участках при смешении с рапой (300–540‰) озера формируются условия для массового развития бентосных цианобактериальных сообществ (30–45‰) (ЦБС) и альгобактериальных сообществ с диатомовыми водорослями (30–80‰). ЦБС представляют собой цианобактериальные пленки и однолетние маты, развивающиеся на дне или всплывающие. Площадь покрытия осадков ЦБС при благоприятных условиях может достигать 100%. Верховья и рукава рек в дельтах могут пересыхать в засушливые сезоны, а скорость течения воды зависит от воздействия ветра (в устьевом участке часто обратное нагонное течение) и обводненности. Такой режим оказывает заметное влияние на гидрохимические

параметры водной толщи и поверхностных осадочных отложений.

Важной характеристикой поверхностных горизонтов донных осадков рек Приэльтонья являются высокие показатели плотности зообентоса. Рекордные численности малощетинковых червей *Potamothrix caspicus*, ракушковых рачков *Cyprideis torosa* в отсутствии ихтиофауны становятся конечным трофическим звеном и источником питания аборигенных и перелетных водоплавающих птиц (Zinchenko et al., 2017; Gusakov et al., 2021).

В проводимых ранее исследованиях в мае и августе в приустьевом районе р. Чернавка радиоизотопным методом были измерены скорости первичной продукции, сульфатредукции, образования и окисления метана, а также методом высокопроизводительного секвенирования гена 16S рРНК выявлены основные группы прокариотных микроорганизмов. (Канапацкий, 2018). При этом скорости первичной продукции в планктонном сообществе не были изучены. Поэтому целью данного исследования стало выявление естественного потенциала продуктивности микробных сообществ

(планктонных и бентосных), являющихся пищевым ресурсом зообентоса.

Биогеохимические и микробиологические исследования проводили в мае, июне, августе, октябре 2017 г. на 4-х станциях (ст.) реки Чернавка: ст. 1 в среднем течении; ст. 2 в устьевом участке, подверженном контакту с озерными водами; ст. 3 в устьевой зоне в одном из рукавов русла, пересохшем в августе; ст. 4 — самая “озерная” станция, в месте развития цианобактериальных сообществ.

Соленость определяли портативным рефрактометром ATAGOATC-S/Mill-E (Япония). Щелочность воды (Alk) в мг-экв/л измеряли титриметрическим методом с помощью стандартного набора реактивов (“Merck”, Германия). Иловые воды получали центрифугированием осадков. Содержание сульфатов определяли на ионном хроматографе Стайер (Россия). Окислительно-восстановительный потенциал (*Eh*, мВ) измеряли при помощи полевого потенциометра рН 320/Set-1 (“WTW”, Германия).

Биомассу фототрофных сообществ оценивали по содержанию хлорофилла *a*. Для этого отбирали образцы матов площадью 4 см<sup>2</sup> в трех повторностях. Пигменты экстрагировали из биомассы 80%-ым

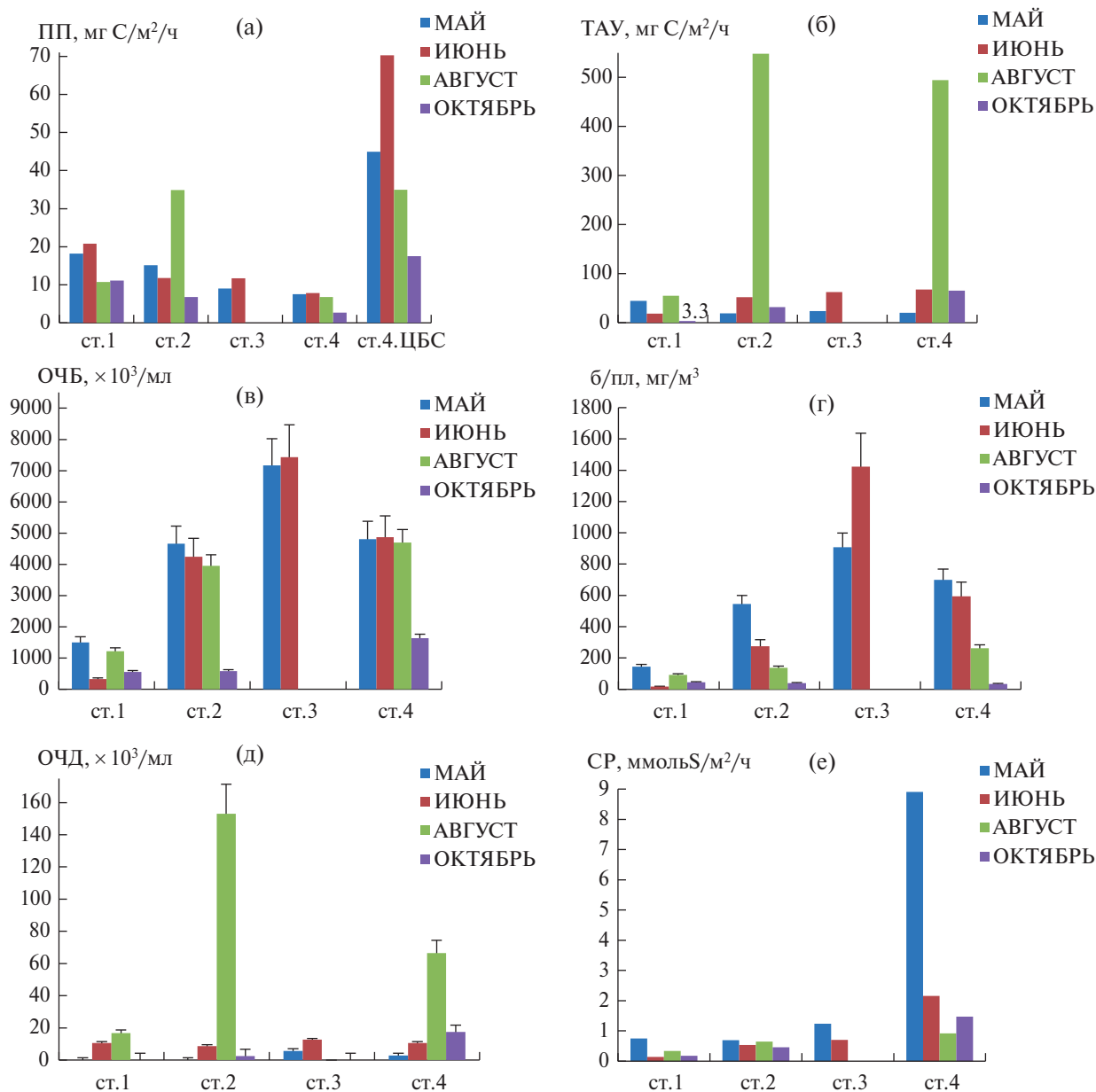
ацетоном. Суммарные спектры поглощения пигментов снимали на спектрофотометре Cary 100Bio (“Varian”, США). Расчеты проводили, используя стандартные формулы (Намсараев, 2009).

Первичную продукцию планктонных и фототрофных сообществ, скорости сульфатредукции и темновой ассимиляции углекислоты (ТАУ) определяли радиоизотопным методом непосредственно в полевых условиях. Обработку образцов проводили по методике, описанной ранее (Pimenov, Bonch-Osmolovskaya, 2006; Канапацкий, 2018). Продуктивность сообществ рассчитывали с учетом глубины воды на станции и толщины фототрофной части мата (0.5 см) в мг С/(м<sup>2</sup>/ч). Общую численность бактерий и диатомовых водорослей определяли прямыми микроскопическими методами на основании подсчета общей численности и измерения среднего объема клеток (Cooper et al., 2015).

Установлено, что содержание Chl *a* в бентосных цианобактериальных сообществах варьировало от 6 до 13 мг Chl *a*/м<sup>2</sup> в мае/июне и от 132 до 140 мг Chl *a*/м<sup>2</sup> в октябре/августе. В планктоне наименьшие показатели выявлены в мае и октябре (от 6 до 12 мг Chl *a*/м<sup>3</sup>), самая мелководная и “озерная” станция характеризовалась повышенным содержанием Chl *a* — 50 мг Chl *a*/м<sup>3</sup>. Летом

**Таблица 1.** Значения первичной продукции (ПП, мкг С/л/ч (мкг С/дм<sup>3</sup>/ч)) и содержание Chl *a* в планктонных (П, мг Chl *a*/м<sup>3</sup>) и бентосных (Б, мг Chl *a*/м<sup>2</sup>) микробных сообществах, общая численность диатомовых (ОЧД, ×10<sup>3</sup> кл/мл), н.д. — не детектировались

Станция	Тип сообщества	Alk, мг-экв/л /S, ‰	ПП	Chl <i>a</i>	ОЧД
Май					
Ст. 1	П	7.5/29	260	10	Н.д.
Ст. 2	П	5/29	170	9	Н.д.
Ст. 3	П	5.5/29	72	12	5.7
Ст. 4	П	5/30	160	6	2.8
Ст. 4	Б	5/30	10.9 × 10 <sup>3</sup>	6	
Июнь					
Ст. 1	П	6/27	20	25	10.6
Ст. 2	П	7/28	110	39	8.6
Ст. 3	П	4.25/29	280	39	12.7
Ст. 4	П	7/32	15	36	10.6
Ст. 4	Б	7/32	4.2 × 10 <sup>3</sup>	13	
Август					
Ст. 1	П	7.5/29	30	26	16.7
Ст. 2	П	6.5/31	315	223	153
Ст. 4	П	3.25/40	180	46	66.5
Ст. 4	Б	3.25/40	10.8 × 10 <sup>3</sup>	140	
Октябрь					
Ст. 1	П	7/27	130	7	Н.д.
Ст. 2	П	8/27	60	9	2.4
Ст. 4	П	2.5/29	10	50	17.4
Ст. 4	Б	2.5/29	6.6 × 10 <sup>3</sup>	132	



**Рис. 1.** Характеристики микробных сообществ: а — интегральная первичная продукция (ПП) в планктоне (ст. 1–4) и цианобактериальных сообществах (ЦБС) для ст. 4; б — интегральные значения темновой ассимиляции углекислоты (ТАУ) в горизонте 0–20 см; в — общая численность бактериопланктона (ОЧБ); г — биомасса бактериопланктона (б/пл); д — общая численность диатомовых водорослей (ОЧД); е — интегральные значения сульфатредукции (СР) в горизонте 0–20 см.

величины варьировали от 25 до 46 мг Chl *a*/м<sup>3</sup> с наибольшим значением в августе на ст. 2 — 223 мг Chl *a*/м<sup>3</sup> (табл. 1).

В сравнении с литературными данными полученные величины в ЦБС характеризовались низкими значениями, по-видимому, в связи с неблагоприятным режимом развития в сгонно-нагонных условиях (Канапацкий, 2018), тогда как содержание Chl *a* в планктоне соответствовало соленым озерам в разных географических зонах (Номоконова, 2013).

Интенсивность первичной продукции (ПП), измеренная в разные сезоны, изменялась в широком

диапазоне: в водной толще от 6 до 315 мг С/л/ч, в бентосных сообществах — от  $4.2 \times 10^3$  до  $10.9 \times 10^3$  мг С/дм<sup>3</sup>/ч. Полученные величины первичной продукции уступали значениям в крымских соленых озерах и соответствовали морским заливам и лагунам (Aleksandrov, 2010; Singh et al., 2023).

Расчеты показали, что суммарная продукция планктонным сообществом ОВ под 1 м<sup>2</sup> варьировала в широком диапазоне от 0.66 до 31.4 мг С/м<sup>2</sup>/ч. Можно отметить, что в каждом месяце максимальные величины проявлялись на разных станциях: в мае на ст. 1 — 25.7 мг С/м<sup>2</sup>/ч, в июне на ст. 2 — 31.4 мг С/м<sup>2</sup>/ч, в августе на ст. 3 — 28.1 мг С/м<sup>2</sup>/ч. В бентосном сообществе

величины варьировали от 21.2–33 мг С/м<sup>2</sup>/ч в июне/октябре до 54.2–54.5 мг С/м<sup>2</sup>/ч в мае/августе (рис. 1а; табл. 2).

В донных осадках в качестве индикатора активности микробного гетеротрофного сообщества была измерена скорость темновой ассимиляции углекислоты в биомассу и РОВ. Величины варьировали в значительном диапазоне, уменьшаясь с углублением в осадочную толщу от  $1.1 \times 10^3$  мкг С/дм<sup>3</sup>/ч в поверхностном слое осадка до 6 мкг С/дм<sup>3</sup>/ч на глубине 44 см. При этом было выявлено два пиковых значения в августе на ст. 2 и ст. 4— $7.7 \times 10^3$  и  $8 \times 10^3$  мкг С/дм<sup>3</sup>/ч, соответственно. Можно констатировать высокую гетеротрофную активность осадков р. Чернавка, поскольку, например, в эвтрофном мелководном и закрытом Куршском заливе Балтийского моря максимальная величина ТАУ в осадках достигала только 232 мкг С/дм<sup>3</sup>/ч (Pimenov, 2013). Интегральные значения, рассчитанные для горизонта 0–20 см на разных станциях варьировали от 3.3 мг С/м<sup>2</sup>/ч в октябре на ст. 1 до 67.8 мг С/м<sup>2</sup>/ч на ст. 4 в июне. Максимальные значения отмечались в августе на ст. 2 и 4 (494–547 мг С/м<sup>2</sup>/ч) (рис. 1б).

Величины общей численности бактериопланктона (ОЧБ) варьировали в широком диапазоне от  $0.3\text{--}7.4 \times 10^6$  кл/мл, значительно превышая показатели в эстуариях р. Оби, Енисея (Romanova, 2020; 2022) и соответствовали значениям эвтрофных районов Балтийского моря (Кудрявцева, 2012; Мошаров, 2022). Величины биомассы бактериопланктона в большинстве случаев коррелировали с ОЧБ, изменяясь от 17 до 1423.5 мг С/м<sup>3</sup>. Такие большие значения ОЧБ объясняются мелководностью реки, вследствие чего водная масса фактически является наддонным слоем, активно взаимодействующим с донными осадками (Romanova, 2020; 2022). Значения ОЧБ устьевого участка на ст. 2 и 4 значительно превышали таковые на ст. 1 в верхнем течении. Высокие значения ОЧБ на ст. 3 объясняются очень слабой скоростью течения воды на данной станции. К августу этот участок пересох. Значения измеренных показателей не отражали динамику изменений суммарной продукции ОВ (рис. 1в, 1г). Важно отметить, что было зафиксировано значительное возрастание численности диатомовых водорослей

в августе на ст. 2 и 4, что хорошо коррелировало с возрастанием ассимиляции углекислоты на ст. 2, пиковыми интенсивностями ТАУ в осадках ст. 2 и ст. 4 того же месяца. В планктоне фиксировались навикулоидные и нитциноидные диатомеи со значительным доминированием представителей рода *Chaetoceros* (рис. 1д).

Известно, что терминальным процессом микробного разложения органического вещества в морских и континентальных водоемах с высоким содержанием сульфатов является сульфатредукция (Carone, Kiene, 1988). В воде р. Чернавка содержание сульфатов изменялось от 5.37 до 7.16 ммоль/л, в иловых водах поверхностных (0–8 см) донных осадков в течение года содержание сульфат-иона изменялось от 0.009 до 1.61 ммоль/л, достигая 2.77 ммоль/л на 20 см. В осадках дельты (0–25 см) содержание сульфат-иона изменялось от 0.75 до 3.67 ммоль/л, а на самой “озерной” станции 4 достигало значений 19.76–85.53 ммоль/л.

Наибольшие средние значения скорости СР на всех станциях отмечены в мае (3.3 мкмоль S/дм<sup>3</sup>/ч), что, по-видимому, связано с активной деструкцией прошлогоднего ОВ. В осадках ст. 1 с июня по октябрь выявляются невысокие значения (0.037–2.78 мкмоль S/дм<sup>3</sup>/ч), за исключением глубоких (21–29 см) горизонтов в августе (5.87–16.03 мкмоль S/дм<sup>3</sup>/ч), что может быть связано с неоднородностью илов речного русла. Однако на ст. 2 выявлен подповерхностный горизонт 3–12 см, в котором постоянно сохранялась повышенная интенсивность СР (4.78–6.12 мкмоль S/дм<sup>3</sup>/ч), на что может влиять особенность режима осадения ОВ. Эта станция располагалась в зоне активного контакта речных и озерных водных масс, здесь происходит постоянное поступление неразложившегося ОВ и активное его осадение из-за изменения глубины, скорости течения и ветрового воздействия. Максимальные интенсивности СР выявлены на ст. 4 (61.96 мкмоль S/дм<sup>3</sup>/ч). Однако с августа интенсивность СР падает до значений 0.93–10.06 мкмоль S/дм<sup>3</sup>/ч.

Интегральные значения скорости СР, рассчитанные для верхних 20 см осадочной толщи, указывали на повышение интенсивности этого процесса в направлении к устью реки. Независимо от сезона

**Таблица 2.** Образование ОВ в процессе первичной продукции и расход ОВ при восстановлении сульфата, ммоль С/м<sup>2</sup>/ч; н.д. — нет данных

Станция	Май		Июнь		Август		Октябрь	
	ПП	Расход С <sub>орг</sub>	ПП	Расход С <sub>орг</sub>	ПП	Расход С <sub>орг</sub>	ПП	Расход С <sub>орг</sub>
Ст. 1	2.14	1.50	0.17	0.28	0.24	0.66	1.11	0.36
Ст. 2	1.42	1.38	0.9	1.06	2.62	1.3	0.49	0.92
Ст. 3	0.6	2.47	2.34	1.41	Н.д.	Н.д.	Н.д.	Н.д.
Ст. 4	5.87	17.81	1.87	4.31	5.98	1.84	2.81	2.94



года наименьшие значения скорости СР (0.13 до 0.74 ммоль S/m<sup>2</sup>/ч) обнаружены на ст. 1, а наибольшие — на ст. 4 (1.46 до 8.87 ммоль S/m<sup>2</sup>/ч).

Расход органического углерода на процессы СР в исследованных осадках можно оценить исходя из обобщенного уравнения этого процесса (Леин, 1983). Учитывая стехиометрию образования из С<sub>орг</sub> восстановленной серы в процессе СР (2 : 1), с использованием полученных нами данных по скоростям СР был рассчитан расход органического углерода на восстановление сульфатов в осадках р. Чернавка и сопоставлен с интенсивностью первичной продукции (табл. 2).

При сравнении величины ОВ, образующегося в ходе ПП и израсходованного в ходе СР (0–20 см) наиболее активные процессы образования ОВ были зафиксированы в августе. На фоне общей высокой активности ПП было выявлено массовое развитие планктонных диатомовых водорослей в дельте реки, определившее возрастание ассимиляции углекислоты в планктоне, высокие интенсивности ТАУ в осадках ст. 2 и 4 и накопление ОВ. Несмотря на то что в мае и августе на ст. 4 интенсивность ПП как в планктонном, так и бентосном сообществе была практически равная и высокая, количество ОВ, израсходованного в процессе СР, в мае было почти в 10 раз больше, чем в августе. Голубковым М. С. было показано, что в соленых озерах Крыма значительное накопление ОВ в планктоне происходит в осенне-зимний период. Например, в оз. Киркояшское (24–37.5‰) величины накопления ОВ составляют 55–65% годовой ПП планктона. Вероятно, для “озерной” ст. 4 характерно аналогичное замедление деструкционных процессов и продолжение фототрофной активности фитопланктона при низких температурах (Голубков, 2010), как и для р. Чернавка, которая может круглогодично поступать в озеро. В июне и октябре зафиксировано превышение расхода ОВ над продукцией, которое может быть связано с образованием С<sub>орг</sub> хемоавтотрофными микроорганизмами, поскольку в поверхностных илах возникают благоприятные для них условия при постоянном присутствии продукта сульфатредукции – H<sub>2</sub>S и кислорода из воды.

Выявленное соотношение продукционных и деструкционных процессов свидетельствует об их значительной динамике, роли осенне-зимнего периода в накоплении ОВ, а также существовании неучтенных продуцентов ОВ в июне и октябре. Также показана определяющая роль диатомовых водорослей в накоплении ОВ.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда: проект № 23-27-00262

#### 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

- Голубков М.С. Первичная продукция планктона вдоль градиента солености. Автореферат дис. ... канд. биол. наук, 03.02.2010. СПб: Зоологический институт РАН, 2010. 25 с.
- Канапацкий Т.А., Самылина О.С., Плотников А.О., Селиванова Е.А., Хлопко Ю.А., Кузнецова А.И., Русанов И.И., Захарова Е.Е., Пименов Н.В. Микробные процессы продукции и деструкции органического вещества в солоноводных реках Приэльтона (Волгоградская область) // Микробиология. 2018. Т. 87. С. 56–69.
- Kanapatskiy T.A., Samylina O.S., Plotnikov A.O., Selivanova E.A., Khlopko Yu.A., Kuznetsova A.I., Rusanov I.I., Zakharova E.E., Pimenov N.V. Microbial processes of organic matter production and decomposition in saline rivers of the Lake Elton area (Volgograd oblast, Russia) // Microbiology (Moscow). 2018. V. 87. P. 66–78.
- Кудрявцева Е.А., Саввичев А.С., Александров С.В., Канапацкий Т.А., Пименов Н.В. Бактериопланктон гданьского бассейна Балтийского моря // Микробиология. 2012. Т. 81. С. 377–388.
- Kudryavtseva E.A., Savvichev A.S., Kanapatskii T.A., Pimenov N.V., Aleksandrov S.V. Bacterioplankton of the Gdansk basin, Baltic sea // Microbiology (Moscow). 2012. V. 81. P. 348–359.
- Леин А.Ю. Потребление С<sub>орг</sub> в процессах анаэробной минерализации органического вещества в современных океанических осадках // Геохимия. 1983. Т. 11. С. 1634–1639.
- 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. 797–797.
- Номоконова В.И., Зинченко Т.Д., Попченко Т.В. Трофическое состояние соленых рек озера Эльтон // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2013. Т. 15. № 3 (1). С. 476–483.
- Пименов Н.В., Ульянова М.О., Канапацкий Т.А., Мицкевич И.Н., Русанов И.И., Сигалевич П.А., Немировская И.А., Сивков В.В. Сульфатредукция, образование и окисление метана в поверхностных осадках Вислинского и Куршского заливов Балтийского моря // Микробиология. 2013. Т. 82. С. 228–238.
- Pimenov N.V., Ul'yanova M.O., Kanapatskii T.A., Mitskevich I.N., Rusanov I.I., Sigalevich P.A., Nemirovskaya I.A., Sivkov V.V. Sulfate reduction, methanogenesis, and methane oxidation in the upper sediments of the Vistula and Curonian

- lagoons, Baltic sea // Microbiology (Moscow). 2013. V. 82. P. 224–233.
- Романова Н.Д., Болтенкова М.А., Полухин А.А., Беззубова Е.М., Шука С.А. Гетеротрофный бактериопланктон эстуария Оби в вегетационный сезон: пространственная и временная изменчивость // Океанология. 2022. Т. 62. С. 428–438.
- Romanova N.D., Boltenkova M.A., Polukhin A.A., Bez Zubova E.M., Shchuka S.A. Heterotrophic bacteria of the Ob River estuary during growing season: spatial and temporal variability // Oceanology. 2022. V. 62. P. 369–378.
- Романова Н.Д., Болтенкова М.А. Сезонная изменчивость бактериопланктона эстуария р. Енисей // Океанология. 2020. Т. 60. С. 87–96.
- Romanova N.D., Boltenkova M.A. Seasonal variability of bacterioplankton of the Yenisei estuary // Oceanology. 2020. V. 60. P. 74–82.
- Aleksandrov S.V. Biological production and eutrophication of Baltic Sea estuarine ecosystems: the Curonian and Vistula Lagoons // Marine Pollut. Bull. 2010. V. 61. P. 205–210.
- Capone D.G., Kiene R.P. Comparison of microbial dynamics in marine and fresh-water sediments — contrasts in anaerobic carbon catabolism // Limnol. Oceanogr. 1988. V. 33. P. 725–749.
- Cooper L.W., Savvichev A.S., Grebmeier J.M. Abundance and production rates of heterotrophic bacterioplankton in the context of sediment and water column processes in the Chukchi Sea // Oceanography. 2015. V. 28. P. 84–99.
- Golovatyuk L.V., Zinchenko T.D., Nazarova L.B. Macrozoobenthic communities of the saline Bolshaya Samoroda River (Lower Volga region, Russia): species composition, density, biomass and production // Aquat. Ecol. 2020. V. 54. P. 57–74.
- Gusakov V.A., Makhutova O.N., Gladyshev M.I., Golovatyuk L.V., Zinchenko T.D. Ecological role of *Cyprideis torosa* and *Heterocypris salina* (Crustacea, Ostracoda) in saline rivers of the lake Elton basin: abundance, biomass, production, fatty Acids // Zool. Stud. 2021. V. 60. № 53. P. 5–16.
- Mosharov S.A., Mosharova I.V., Dmitrieva O.A., Semenova A.S., Ulyanova M.O. Seasonal variability of plankton production parameters as the basis for the formation of organic matter flow in the southeastern part of the Baltic Sea // Water. 2022. V. 14. Art. 4099.
- Pimenov N.V., Bonch-Osmolovskaya E.A. In situ activity studies in thermal environments // Methods in Microbiology / Eds. Rainey F. and Oren A. London, United Kingdom: Elsevier, 2006. V. 35. P. 29–53.
- Singh S., Acharyya T., Raulo S., Sudatta B.P., Sahoo C., Srichandan S., Baliarsingh S.K., Lotliker A.A. A Review of phytoplankton primary production in relation to environmental forcing in Indian estuaries // Dynamics of planktonic primary productivity in the Indian Ocean / Eds. Tripathy S.C., Singh A. Switzerland: Springer, 2023. P. 1–29.
- Zinchenko T.D., Golovatyuk L.V., Abrosimova E.V., Popchenko T.V. Macrozoobenthos in saline rivers in the Lake Elton basin: spatial and temporal dynamics // Inland Water Biol. 2017. V. 10. P. 384–398.

---



---

 SHORT COMMUNICATIONS
 

---



---

## Production Potential of the Chernavka Salt River (Elton Region)

T. A. Kanapatskiy<sup>1, \*</sup>, O. S. Samylina<sup>1</sup>, L. V. Golovatyuk<sup>2, 3</sup>, I. I. Rusanov<sup>1</sup>,  
E. E. Zakharova<sup>1</sup>, V. V. Kevbrin<sup>1</sup>, T. D. Zinchenko<sup>2</sup>, and N. V. Pimenov<sup>1</sup>

<sup>a</sup>Winogradsky Institute of Microbiology, Research Center of Biotechnology,  
Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

<sup>b</sup>Institute of Ecology of Volga Basin, Russian Academy of Sciences, Tolyatti, 445003 Russia

<sup>c</sup>Papanin Institute for Biology of Inland Waters, Russian Academy of Sciences, Borok, 152742 Russia

\*e-mail: timkanap@yandex.ru

Received October 16, 2023; revised November 13, 2023; accepted November 16, 2023

**Abstract**—Depending on the season, the primary production of planktonic communities determined by radiotracer analysis varied within a broad range, from 6 to 314  $\mu\text{g C}/(\text{L h})$ . Primary production in cyanobacterial mats was  $4.2\text{--}10.9 \times 10^3 \mu\text{g C}/(\text{dm}^3 \text{ h})$ , and Chl *a* content varied from 6–13 to 132–140  $\text{mg Chl } a/\text{m}^2$ . For the plankton, the highest values were revealed in summer (25–46  $\text{mg Chl } a/\text{m}^3$ ), with the maximum in August (223  $\text{mg Chl } a/\text{m}^3$ ). High abundance of bacterioplankton ( $0.3\text{--}7.4 \times 10^6 \text{ cells}/\text{mL}$ ) and massive growth of diatoms ( $0.15 \times 10^6 \text{ cells}/\text{mL}$ ) with predominance of the genus *Chaetoceros* were found. Sulfate reduction rates varied from 0.037  $\mu\text{mol S}/(\text{dm}^3 \text{ h})$  in the upper reach to 61.87  $\mu\text{mol S}/(\text{dm}^3 \text{ h})$  in the river mouth.

**Keywords:** primary production, sulfate reduction, plankton, cyano-bacterial communities, salt rivers, salt lake

## БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ МИКРОБИОМА ПОЧВ

© 2024 г. Н. А. Манучарова<sup>а, \*</sup>, А. П. Власова<sup>а</sup>, М. А. Коваленко<sup>а</sup>, Е. А. Овчинникова<sup>а</sup>,  
А. Д. Бабенко<sup>а</sup>, Г. А. Терегулова<sup>а</sup>, Г. В. Уваров<sup>а</sup>, А. Л. Степанов<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, 119991, Россия

\*e-mail: manucharova@mail.ru

Поступила в редакцию 15.10.2023 г.

После доработки 02.11.2023 г.

Принята к публикации 03.11.2023 г.

С применением молекулярно-биологических методов и биоинформационного анализа исследовано филогенетическое и функциональное разнообразие прокариотного комплекса почвенных микроросов. Доминанты гидролитического сообщества различались между образцами разных климатических зон. Наряду с сокращением разнообразия и численности прокариот в почвах, подверженных антропогенным или абиогенным нагрузкам, установлено возрастание количества генов, маркирующих способность сообщества к биодеградации ксенобиотиков, генов, кодирующих превращения азота и уровень метаболизма кофакторов и витаминов. Бактериальный комплекс способен к нитрификации при высоком загрязнении почвы нефтью, а также его роль возрастает в нижних слоях почвенного профиля. Выявленные закономерности указывают на высокий метаболический потенциал прокариотной компоненты рассматриваемых почв.

**Ключевые слова:** функциональные гены, деструкция углеводов, синтез антибиотиков, нитратредуктазная, нитрогеназная, монооксигеназная активности

DOI: 10.31857/S0026365624020056

Почва представляет собой главный природный банк культур микроорганизмов с полезными для человека свойствами. Выяснение свойств почв, способствующих формированию и сохранению биоразнообразия, получение консорциумов микроорганизмов, обладающих биотехнологическим потенциалом (способность к азотфиксации, гидролизу природных полимеров и ксенобиотиков, синтезу вторичных метаболитов) — важная научная задача современной микробиологии. На основании анализа литературных данных и результатов собственных исследований (Sutton et al., 2013; Samarghandi et al., 2018; Manucharova et al., 2021) нами была высказана гипотеза, что в почвах, подверженных антропогенным или абиогенным нагрузкам, происходит увеличение количества генов, маркирующих устойчивость сообщества к стрессам, например, способность к биодеградации ксенобиотиков, а также ключевых генов метаболизма, например, превращения азота.

Целью исследований являлось выявление специфики устойчивости и развития гидролитических (хитинолитических, углеводородокисляющих) микробных комплексов, обладающих биотехнологическим потенциалом (гидролиз природных полимеров и ксенобиотиков, способность к азотфиксации, синтез вторичных метаболитов) в почвенных

экосистемах, установление закономерностей их распространения и зависимости функциональной активности от основных экологических факторов.

Для проверки гипотезы нами были проведены исследования филогенетического и функционального разнообразия микробных сообществ широкого набора почвенных объектов с различной степенью нарушенности. В качестве основного стрессового фактора было выбрано воздействие углеводов нефти, полиароматических углеводов (ПАУ) и биополимера хитина в условиях *in situ* и лабораторных экспериментов. Для наиболее полной оценки функций почвенного микробиома в работе использовали комплекс методов анализа генетической информации микробиома, ПЦР-определения генов-биомаркеров, оценки физиологически активной части микробиома и измерения функциональной активности.

Объектами исследования являлись прокариотные сообщества современных почв: дерново-подзолистой (Московская область, почва на территории завода, загрязненная ПАУ, 55.728016° с.ш., 38.217825° в.д.), торфяной олиготрофной (Сибирь, Ханты-Мансийский район (почва под нефтяной скважиной) 61.31°24'71" с.ш., 70.26°76'10" в.д.), чернозема (Волгоградская область (модельный эксперимент, загрязнение нефтью в течение 7 лет) 51°1'41"



с.ш., 40°43'31" в.д.), серой лесной (Тульская область, модельный эксперимент, 53°58'23" с.ш., 37°10'34" в.д.), каштановой (Волгоградская область 49.39936° с.ш., 46.81083° в.д.), бурой пустынно-степной (пустыня Гоби 43°45'00" с.ш., 111°50'00" в.д.) и реликтовых местообитаний: подкурганые каштановые почвы (Волгоградская область, юг Приволжской возвышенности Камышинского района), погребенные вулканические слоисто-пепловые почвы Камчатки (Северная часть Центральной Камчатки, почвенно-пирокластический чехол северо-западного подножия вулкана Шивелуч 56°49'42" с.ш., 161°19'28" в.д.), многолетнемерзлых грунтов Антарктиды (о. Кинг-Джордж, станция Беллинсгаузен 62°10'04" с.ш., 59°12'11" в.д.).

Исследовали воздействие антропогенного фактора на прокариотные сообщества почв как в природных экосистемах (например, на месте разлива нефти (чернозем, торфяная олиготрофная, дерново-подзолистая) или поступления и накопления ПАУ (дерново-подзолистая), так и в модельных опытах с искусственным добавлением углеводов или биополимеров (чернозем, серая лесная, дерново-подзолистая, каштановая, бурая пустынно-степная, подкурганые каштановые почвы, погребенные вулканические слоисто-пепловые почвы Камчатки, грунты Антарктиды). При проведении модельных экспериментов применяли метод инициации микробной сукцессии увлажнением почвенных образцов водой (до 60% от массы почвы) и добавлением в опытные образцы ресурсов: биополимеров (хитина или пектина) в количестве 0.6% от массы почвы или углеводов в количестве, превышающем показатели сильнозагрязненных почв (20% от массы почвы). Методика была описана нами ранее (Манучарова и соавт., 2021).

Выделение ДНК проводили с помощью PowerSoil DNA Isolation Kit компании "MOBio" (Германия) в соответствии с рекомендациями производителя в трехкратной повторности.

Оценивали количество копий генов, кодирующих синтез ферментов, направленных на деструкцию углеводов: алкан-монооксигеназы (*alkB* и *alkM*)(субстрат: n-алканы) (Wang et al., 2007), катехол-2,3-диоксигеназа (*xylE*) (субстрат: катехолы и протокатехоевые кислоты), 1,2-гидроксинафталиндиоксигеназа (*nahC*) (субстрат: нафталин) (Hendrickx et al., 2006). Параллельно проводили оценку функциональной деятельности прокариотного сообщества посредством выявления наличия в системе генов, участвующих в процессах азотного цикла: *nifH* — нитрогеназная активность (Burgmann et al., 2003), *amoA* (АОВ) — монооксигеназная активность аммоний окисляющих бактерий (Hallin et al., 2009; Gogmachadze et al., 2023), *amoA* (АОА) — монооксигеназная активность аммоний окисляющих архей, *nirK* — нитратредуктазная активность (Henry et al., 2004), а также *chitA* — хитиноподобная

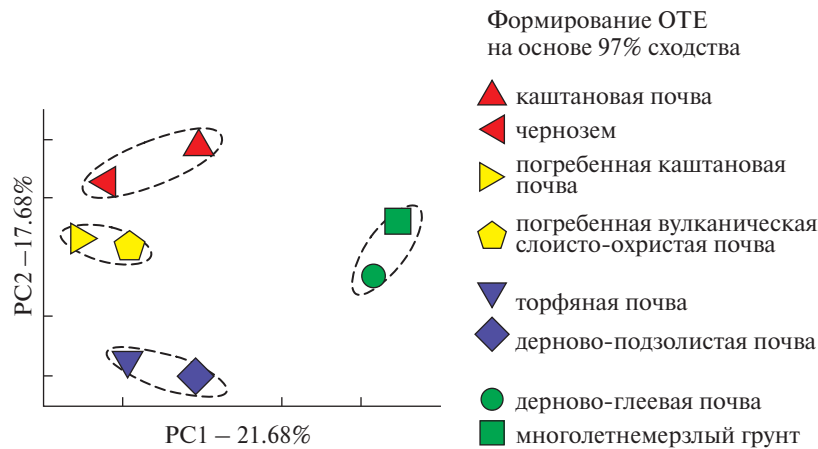
активность (Wang et al., 2017). Определения проводили на детектирующем амплификаторе DTLite4 ("ДНК-Технология", Россия) с измерением интенсивности флуоресценции реакционной смеси на каждом цикле в соответствии с рекомендациями производителя. Общую численность прокариот в почвах определяли с помощью красителя акридила оранжевого; численность метаболически активных клеток прокариот и клеток, содержащих функциональный ген алкан-монооксигеназы, оценивали методом *in situ*-гибридизации с рРНК-специфичными флуоресцентно-мечеными олигонуклеотидными зондами (метод FISH). Подсчет проводили с использованием люминесцентного микроскопа ZEISS Microscope Axioskop 2 plus (Германия) со светофильтром Filterset 09 ( $\lambda$  450–490 нм) и Filter set 15 ( $\lambda$  546 нм) для Су3-меченых зондов (Манучарова и соавт., 2021). Очищенный препарат ДНК использовали в качестве матрицы для реакции ПЦР с использованием пары универсальных праймеров к вариабельному участку V4 гена 16S рРНК. Подготовку проб и секвенирование выполняли на секвенаторе Illumina Miseq ("Евроген"). Полученные данные обрабатывались в программе SYLVA и ezbiocloud. Функциональное разнообразие генов в микробных сообществах было предсказано при помощи программы PICRUSt (Langille et al., 2013). Для сопоставления 16srРНК с уже секвенированными полными геномами была использована база бактериальных и архейных геномов IMG database (Markowitz et al., 2012).

Авторами было установлено снижение биомассы и альфа-разнообразия, а так же смена метаболически активных доминантов — представителей доменов *Bacteria* и *Archaea* за счет выхода в доминанты определенных родов — автохтонной микрофлоры, специфичной для определенных условий в микросомах, загрязненных нефтью по сравнению с контрольными образцами в процессе микробной сукцессии (Manucharova et al., 2021). Для образцов нефтезагрязненных почв южных широт доминирующая роль принадлежала представителям актинобактерий, для почв центральной и северной широт — протеобактериям. Для образцов чернозема падение разнообразия бактерий в результате загрязнения углеводородами составляет 44% (индекс Шеннона снижается с 7.09 до 4.84).

Анализ бета-разнообразия методом главных компонент с применением метрики Брея-Кертиса на уровне сходства 97% достоверно разделил доминанты гидролитического сообщества между исследуемыми образцами на четыре кластера: современные почвы южных широт (каштановая, чернозем), современные почвы северной и центральной части России (дерново-подзолистая, торфяная), погребенные почвы и многолетнемерзлые грунты (рис. 1).

Такое разделение указывало на то, что при внесении ресурса доминанты гидролитического сообщества различались между образцами разных





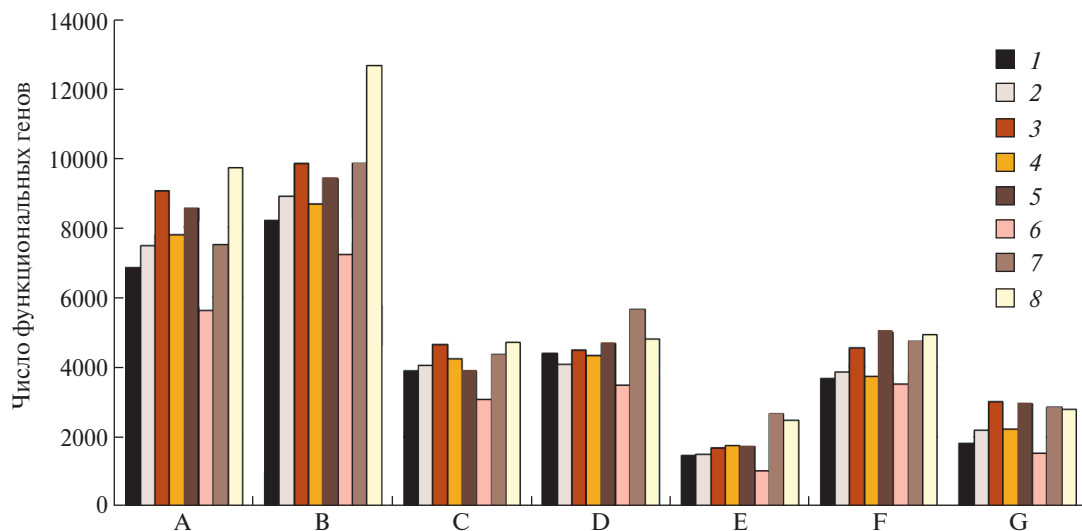
**Рис. 1.** Анализ методом главных компонент с применением метрики Брея–Кертиса структуры прокариотных сообществ исследуемых образцов с добавлением субстратов (биополимера хитина или углеводов).

климатических зон. На фоне сокращения биоразнообразия в загрязненных образцах по сравнению с контролем определено увеличение содержания функциональных генов (в 2–4 раза), отвечающих за синтез катехол-диоксигеназы (*xylE*), алкан-монооксигеназы (*alkB*) и 1,2-гидроксинафталиндиоксигеназы (*nahC*), маркирующих начальный этап деградации углеводов. При анализе функционального генетического разнообразия сообщества методом восстановления полного метагенома по данным высокопроизводительного секвенирования гена 16S рРНК было выявлено, что количество генов, маркирующих способность сообщества к биодegradации ксенобиотиков, выше в многолетнемерзлых грунтах по сравнению с современными почвами. Внесение

субстрата увеличивает долю генов, ответственных за деградацию ксенобиотиков (рис. 2).

На длительных сроках загрязнения наблюдается последствие поллютанта и дальнейшее увеличение численности функциональных генов в сравнении со свежим разливом. По прошествии 7 лет после нефтеразлива бактериальное разнообразие продолжает сокращаться. Выявлены устойчивые и чувствительные к нефтезагрязнению представители. К устойчивым среди представителей филлума *Actinomycetota* относятся рода *Gaiella* и *Streptomyces*.

Показано наличие ряда ключевых генов цикла азота (*nifH*, *amoA*, *nirK*, *chitA*) как в современных, так и погребенных горизонтах исследуемых почв. Наличие копий гена *nifH* бактерий азотфиксаторов, способных обеспечить систему азотом, можно



**Рис. 2.** Биодegradация ксенобиотиков: А — аминобензоат; В — бензоат; С — капролактамы; D — хлороалканы/хлороалкены; E — хлороциклогексан/хлоробензен; F — нафталин; G — ПАУ. Исследуемые образцы: 1 — чернозем; 2 — чернозем, инкубируемый с ресурсом; 3 — каштановая почва с ресурсом; 4 — каштановая почва; 5 — дерново-подзолистая почва, инкубируемая с ресурсом; 6 — дерново-подзолистая почва; 7 — многолетнемерзлый грунт; 8 — многолетнемерзлый грунт, инкубированный с ресурсом.

рассматривать как один из этапов самовосстановления почв. В современных почвах наличие генов, отвечающих за возможность фиксации молекулярного азота из воздуха, было выше по сравнению с погребенными и достигало  $4.54 \times 10^6$  копий гена/г.п., для погребенного горизонта  $2.5 \times 10^4$  копий гена/г.п. Важно отметить присутствие, хотя и незначительное, гена *nifH* в более глубоких слоях почвы, что указывает на возможный потенциал обитающих там микробных сообществ. Для вулканических почв (как современных, так и погребенных) удалось выявить наличие генов аммоний окисляющих бактерий и архей. Динамика присутствия гена *amoA* в современном горизонте вулканической перегнойно-охристой почвы демонстрирует увеличение его концентрации в бактериальном комплексе в вариантах с нефтью ( $2.3 \times 10^7$  копий ДНК/г.п.) к 10 сут сукцессии. Бактериальный комплекс способен к нитрификации при высоком загрязнении почвы нефтью, а также его роль возрастает в нижних слоях почвенного профиля.

Таким образом, влияние антропогенной нагрузки изменяет “метаболический профиль” почвенных сообществ, что выражается как в увеличении количества микроорганизмов, обладающих биотехнологически ценными свойствами (количество функциональных генов), так и в изменении состава этих микроорганизмов, что и открывает возможность для поиска новых биотехнологически ценных штаммов.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Состав микробного сообщества почв был определен при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 24-14-00108).

#### 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

Bürgmann H., Widmer F., Sigler W.V., Zeyer J. mRNA extraction and reverse transcription-PCR protocol for detection of *nifH* gene expression by *Azotobacter vinelandii* in soil // Appl. Environ. Microbiol. 2003. V. 69. P. 1928–1935. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.4.1928-1935.2003>

Hallin S., Jones C.M., Schloter M., Philippot L. Relationship between n-cycling communities and ecosystem functioning in a 50-year-old fertilization experiment // ISME J. 2009. V. 53. P. 597–605. <https://doi.org/10.1038/ismej.2008.128>

Hendrickx B., Junca H., Vosahlova J., Lindner A., Ruegg I., Bucheli-Witschel M., Faber F., Egli T., Mau M., Pieper, D.H., Top E.M., Dejonghe W., Bastiaens L., Springael D. Alternative primer sets for PCR detection of genotypes involved in bacterial aerobic BTEX degradation: distribution of the genes in BTEX degrading isolates and in subsurface soils of a BTEX contaminated industrial site // J. Microbiol. Meth. 2006. V. 64. P. 250–265. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.04.018>

Henry S., Baudouin E., López-Gutiérrez J.C., Martin-Laurent F., Brauman A., Philippot L. Quantification of denitrifying bacteria in soils by *nirK* gene targeted real-time PCR // J. Microbiol. Meth. 2004. V. 59. P. 327–335. <https://doi.org/10.1016/J.MIMET.2004.07.002>

Gogmachadze L.G., Khusnetdinova K.A., Stepanov A.L., Kravchenko I.K. Microcosm study of ammonium and drying impact on methane oxidation in agricultural soil // J. Agric. Environ. 2023. V. 36. P. 10–22. <https://doi.org/10.23649/JAE.2023.36.7>

Langille M., Zaneveld J., Caporaso J.G., McDonald D., Knights D., Reyes J., Clemente J., Burkpile D., Vega Thurber R., Knight R., Beiko R., Huttenhower C. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences // Nat. Biotechnol. 2013. V. 31. P. 814–821. <https://doi.org/10.1038/nbt.2676>

Manucharova N.A., Pozdnyakov L.A., Vlasova A.P., Yanovich A.S., Ksenofontova N.A., Kovalenko M.A., Stepanov P.Y., Gennadiev A.N., Golovchenko A.V., Stepanov A.L. Metabolically active prokaryotic complex in grassland and forests' sod-podzol under polycyclic aromatic hydrocarbon influence // Forests. 2021. V. 12. P. C. 1103–1117. <https://doi.org/10.3390/f12081103>

Manucharova N.A., Ksenofontova N.A., Belov A.A., Kamenskiy N.N., Arzamazova A.V., Zenova G.M., Kinzhaev R.R., Trofimov S.Y., Stepanov A.L. Prokaryotic component of oil-contaminated oligotrophic peat soil under different levels of mineral nutrition: biomass, diversity, and activity // Euras. Soil Sci. 2021. V. 54. P. 89–97. <https://doi.org/10.31857/s0032180x2101010x>

Markowitz V.M., Chen I.-M.A., Palaniappan K., Chu K., Szeto E., Grechkin Y., Ratner A., Jacob B., Huang J., Williams P., Huntemann M., Anderson I., Mavromatis K., Ivanova N.N., Kyrpides N.C. IMG: the Integrated Microbial Genomes database and comparative analysis system // Nucl. Acids Res. 2012. V. 40. Database iss. P. D115–D122. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr1044>

Samarghandi M.R., Arabestani M.R., Zafari D., Rahmani A.R., Afkhami A., Godini K. Bioremediation of actual soil samples with high levels of crude oil using a bacterial consortium isolated from two polluted sites: investigation of the survival of the bacteria // Global NEST J. 2018. V. 20. P. 432–438.

Sutton N.B., Maphosa F., Morillo J.A., Al-Soud W.A., Langenhoff A.A.M., Grotenhuis T., Rijnaarts H.H.M., Smidt H. Impact of long-term diesel contamination on soil microbial community structure // Appl. Environ. Microbiol. 2013. V. 79. P. 619–630.

Wang Q., Garrity G.M., Tiedje J.M., Cole J.R. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy // *Appl. Environ. Microbiol.* 2007. V. 73. P. 5261–5267.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.00062-07>

Wang Q., Duan B., Yang R., Zhao Y., Zhang L. Screening and identification of chitinolytic actinomycetes and study on the inhibitory activity against turfgrass root rot disease fungi // *J. Biosci. Medic.* 2015 V. 3. P. 56065.  
<https://doi.org/10.4236/jbm.2015.33009>

---

---

## SHORT COMMUNICATIONS

---

---

### Biotechnological Potential of the Soil Microbiome

N. A. Manucharova<sup>1,\*</sup>, A. P. Vlasova<sup>1</sup>, M. A. Kovalenko<sup>1</sup>, E. A. Ovchinnikova<sup>1</sup>,  
A. D. Babenko<sup>1</sup>, G. A. Teregulova<sup>1</sup>, G. V. Uvarov<sup>1</sup>, and A. L. Stepanov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

\*e-mail: [manucharova@mail.ru](mailto:manucharova@mail.ru)

Received October 15, 2023; revised November 2, 2023; accepted November 3, 2023

**Abstract**—Molecular biological techniques and bioinformatic analysis were used to investigate the phylogenetic and functional diversity of the prokaryotic complex of soil microcosms. The dominant organisms of the hydrolytic community were different in the samples from different climatic zones. In the soils subject to anthropogenic or abiogenic load, apart from decreased diversity and abundance of prokaryotes, the number of the genes marking the ability to degrade xenobiotics, as well as those encoding nitrogen conversion and metabolism of vitamins and cofactors, was found to increase. Under heavy oil contamination, the bacterial community was capable of nitrification; its role increased in the lower horizons of the soil profile. The patterns revealed in the work indicate high metabolic potential of the prokaryotic component of the studied soils.

**Keywords:** functional genes, hydrocarbon degradation, antibiotic synthesis, nitrate reductase, nitrogenase, and monooxygenase activities

УДК 579.222

## ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПЕРЕНОСА ЭЛЕКТРОНОВ В СИСТЕМЕ ФЕРРЕДОКСИНОВ И ФЕРРЕДОКСИНРЕДУКТАЗ *MYCOLICIBACTERIUM SMEGMATIS*

© 2024 г. Д. О. Эпиктетов<sup>а</sup>, \*, М. В. Карпов<sup>а</sup>, М. В. Донова<sup>а</sup><sup>а</sup>Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, ФИЦ Пушинский научный центр биологических исследований РАН, Пушкино, 142290, Россия

\*e-mail: epiktetoff@gmail.com

Поступила в редакцию 13.10.2023 г.

После доработки 26.10.2023 г.

Принята к публикации 26.10.2023 г.

Стероид-26-монооксигеназы принадлежат суперсемейству цитохромов P450 и функционируют в составе трехкомпонентных систем совместно с ферредоксинами и ферредоксинредуктазами, обеспечивающими электронный транспорт. Работа посвящена изучению P450-зависимых редокс-партнеров актинобактериального штамма *Mycolicibacterium smegmatis* mc<sup>2</sup>155. В клетках *E. coli* осуществлена сверхэкспрессия генов, кодирующих миколицибактериальные ферредоксины (FdxD и FdxE) и ферредоксинредуктазы (FdrA и FprA). Разработана схема выделения и очистки синтезируемых рекомбинантных белков методом аффинной хроматографии с получением электрофоретически гомогенных препаратов. Спектральный анализ ферредоксинредуктаз показал характерные для ФАД-содержащих белков пики поглощения. Осуществлена реакция восстановления цитохрома с с использованием рекомбинантных белков, показавшая, что FdxD, FdxE, FdrA и FprA могут выступать компонентами транспорта электронов от восстановительных эквивалентов НАД(Ф)Н.

**Ключевые слова:** Ферредоксин, ферредоксинредуктаза, редокс-партнеры, стероиды, транспорт электронов, *Mycobacterium smegmatis* mc<sup>2</sup>155

DOI: 10.31857/S0026365624020062

Бактериальное окисление стероидных соединений имеет фундаментальный интерес и несет практическую значимость. С одной стороны, способность к поглощению холестерина патогенными микобактериями определяет их вирулентные свойства (Wilburn et al., 2018). С другой стороны, сапротрофные актинобактерии могут быть использованы в качестве биокатализаторов для получения фармацевтически важных стероидных субстанций и их интермедиатов (Fernandez-Cabezón et al., 2016; Tekucheva et al., 2022; Donova, 2023).

Ключевыми ферментами стероидного катаболизма являются стероид-26-монооксигеназы CYP125 и CYP142, принадлежащие к суперсемейству цитохромов P450. Они катализируют гидроксирование терминального атома углерода (C26 или C27) боковой цепи стерина, инициируя его дальнейшую деструкцию (García-Fernández et al., 2013; Ortega Ugalde et al., 2018). Цитохромы P450 бактериального типа функционируют в составе трехкомпонентных ферментных систем совместно с окислительно-восстановительными партнерами: железо-серным белком ферредоксином и ФАД-содержащей ферредоксинредуктазой,

которые осуществляют перенос необходимых для реакции гидроксирования электронов от соответствующих восстановительных эквивалентов НАД(Ф)Н (Hannemann et al., 2007; Ortega Ugalde et al., 2018). Данные об активности актинобактериальных P450-зависимых стероид-С26-монооксигеназ показывают, что при организации электронного транспорта с помощью “суррогатных” редокс-партнеров в реакциях *in vitro* наряду с гидроксированием холестерина наблюдается дальнейшее окисление спиртовой группы с образованием С26-карбоновой кислоты (García-Fernández et al., 2013). Напротив, в случае цитохромов P450 *M. tuberculosis* H37Rv использование нативных ферредоксинов (FdxD, FdxE) и ферредоксинредуктаз (FdrA, FprA) позволило оценить специфику оксифункционализации боковой цепи стерина и определить оптимальный для осуществления реакции набор компонентов ферментной системы (Ortega Ugalde et al., 2018).

Благодаря данным о геномике и протеомике, штамм *Mycolicibacterium smegmatis* mc<sup>2</sup>155 (syn. *Mycobacterium smegmatis* mc<sup>2</sup>155) (Snapper et al., 1990; Gupta et al., 2018) представляется удобным



объектом при изучении стероидного катаболизма (Garcia et al., 2012) и имеет биотехнологический потенциал в качестве платформы при биоинженерии продуцентов гидроксистероидов (Fernandez-Cabezón et al., 2016; Karpov et al., 2022). *M. smegmatis* характеризуются наличием как минимум трех стероид-26-гидроксилаз: CYP142A2, CYP125A3 и CYP125A4 (Garcia-Fernandez et al., 2013). В аннотированных геномах *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 (GenBank: CP000480.1; CP001663.1) предсказано наличие ряда генов, кодирующих как ферредоксинредуктазы, так и P450-зависимые ферредоксины, один из которых (*fdxD*, MSMEG\_5904, MSMEI\_5744) расположен в генном кластере, ответственном за метаболизм боковой цепи стероидов. Показано, что электрон-транспортные системы *M. smegmatis* способны поддерживать не только собственные, но и гетерологичные бациллярные цитохромы P450 CYP106A1 и CYP106A2 для реализации их гидроксигирующей активности (Karpov et al., 2022). Актуальными задачами остаются поиск и изучение подобных систем.

Целью настоящей работы явилось выявление потенциальных редокс-партнеров цитохромов P450 и верификация электронного транспорта, организованного с использованием ферредоксин- и ферредоксинредуктаз актинобактериального штамма *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155.

В работе использовали следующие материалы и реактивы: канамицин, изопропил-β-D-тио-галактопиранозид (ИПТГ) и имидазол (“Thermo Fisher Scientific”, США); цитохром *c* и дитиотреитол (ДТТ) (“Sigma-Aldrich”, США); Трис(гидроксиметил)аминометан (Трис), глицин, бактоагар, триптон и дрожжевой экстракт (“Panreac”, Испания). Остальные использованные в работе реактивы были отечественного производства (Россия), квалификации х.ч. или ч.д.а.

Штамм *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 был любезно предоставлен доктором Elke Noens (EMBL, Hamburg Outstation, Hamburg, Германия) и поддерживался на среде M3 (Karpov et al., 2022). Бактерии *E. coli* DH5α и *E. coli* BL21 Star (DE3) (“Thermo Fisher Scientific”, США) выращивали на среде LB (Bertani, 1951). Для селекции трансформантов *E. coli* использовали канамицин (50 мкг/мл).

ДНК-последовательности генов *fdxD* (MSMEI\_5744), *fdxE* (MSMEI\_2499), *fdrA* (MSMEI\_1381) и *fprA* (MSMEI\_2039) были амплифицированы с хромосомной матрицы *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 с помощью ДНК-полимеразы Q5-HF (“NEB”, Великобритания) и соответствующих пар фланкирующих олигонуклеотидных праймеров, кодирующих рестрикционные сайты *NdeI* и *HindIII*. Каждый ген был клонирован с использованием *E. coli* DH5α в векторе pET28a по сайтам рестрикции *NdeI* и *HindIII* (“Thermo Fisher Scientific”, США) под контролем промотора фага T7. Наличие вставки

контролировали рестрикционным анализом, последовательности валидировали секвенированием. Плазмидные конструкции были использованы для трансформации клеток *E. coli* BL21 Star (DE3) методом теплового шока.

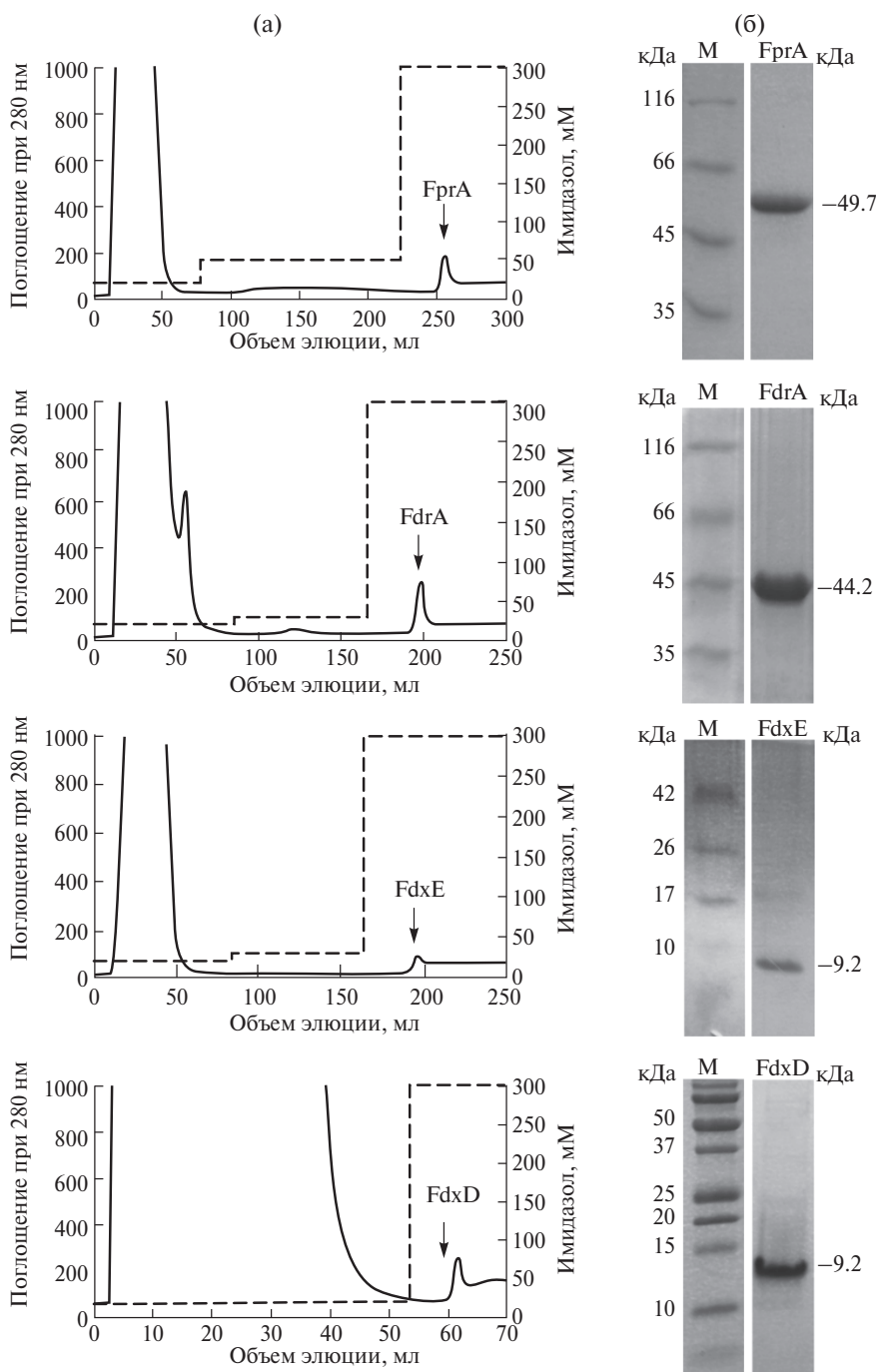
Трансформированные *E. coli* BL21 Star (DE3) культивировали в колбах Эрленмейера в 100 мл богатой питательной среды ТВ (Tartoff, Hobbs, 1987) (37°C, 200 об./мин) до достижения оптической плотности OD<sub>600</sub> 0.6–0.8. Индукцию экспрессии осуществляли внесением ИПТГ (0.5 ммоль/л), после чего продолжали культивировать при 22°C в течение 20 ч. Для корректного фолдинга и формирования железо-серных центров синтезируемых ферредоксинов FdxD и FdxE в соответствующие культуры дополнительно вносили FeCl<sub>3</sub> (50 мкмоль/л) и FeSO<sub>4</sub> (50 мкмоль/л).

Биомассу индуцированных ИПТГ рекомбинантных *E. coli* осаждали центрифугированием (3000 g, 4°C, 30 мин) и на ультразвуковом дезинтеграторе Q500 (“Qsonica”, США). В полученный гомогенат вносили 100 Ед. ДНКазы I (“Sigma-Aldrich”, США), клеточные остатки отделяли центрифугированием (25000 g, 4°C, 75 мин), надосадочную жидкость фильтровали (диаметр пор 0.2 мкм). Очистку рекомбинантных белков проводили методом металл-хелатной жидкостной колоночной хроматографии на Ni-NTA агарозе с использованием колонки BioScale Mini Nuvia IMAC (“BioRad”, США). Бесклеточный экстракт вносили в буферном растворе А: калий-фосфатный буфер (50 ммоль/л), pH 7.4; ДТТ (0.25 ммоль/л); имидазол (20 ммоль/л); глицерин (10%, об.). Ступенчатый градиент проводили с использованием буферного раствора Б: калий-фосфатный буфер (50 ммоль/л), pH 7.4; ДТТ (0.25 ммоль/л), имидазол (300 ммоль/л); глицерин (10%, об.).

Белки детектировали электрофоретически в 16- и 12% полиакриламидном геле в денатурирующих условиях с использованием Трис-Трицинового (в случае ферредоксинов) и Трис-Глицинового (в случае ферредоксинредуктаз) разделяющих буферных растворов, соответственно.

Детекцию простетической группы в составе препаратов очищенных ферредоксинредуктаз осуществляли спектрофотометрически по данным спектров оптического поглощения. Трехмерное моделирование *in silico* осуществляли с использованием сервисов IntFold 7, 3D-Mol Viewer 10.3.0 и Geneious 4.8.5.

Функциональную активность рекомбинантных белков определяли *in vitro* по их способности осуществлять восстановление цитохрома *c* в четырех системах транспорта электронов: FdrA-FdxE, FdrA-FdxD, FprA-FdxE и FprA-FdxD. В качестве источников электронов использовали соответствующие кофакторы: НАДН для FdrA и НАД(Ф)Н для FprA. Состав реакционной смеси (1 мл): цитохром *c* (20 мкмоль/л), FdrA или FprA (5 мкмоль/л), FdxE или FdxD (2.5 мкмоль/л),

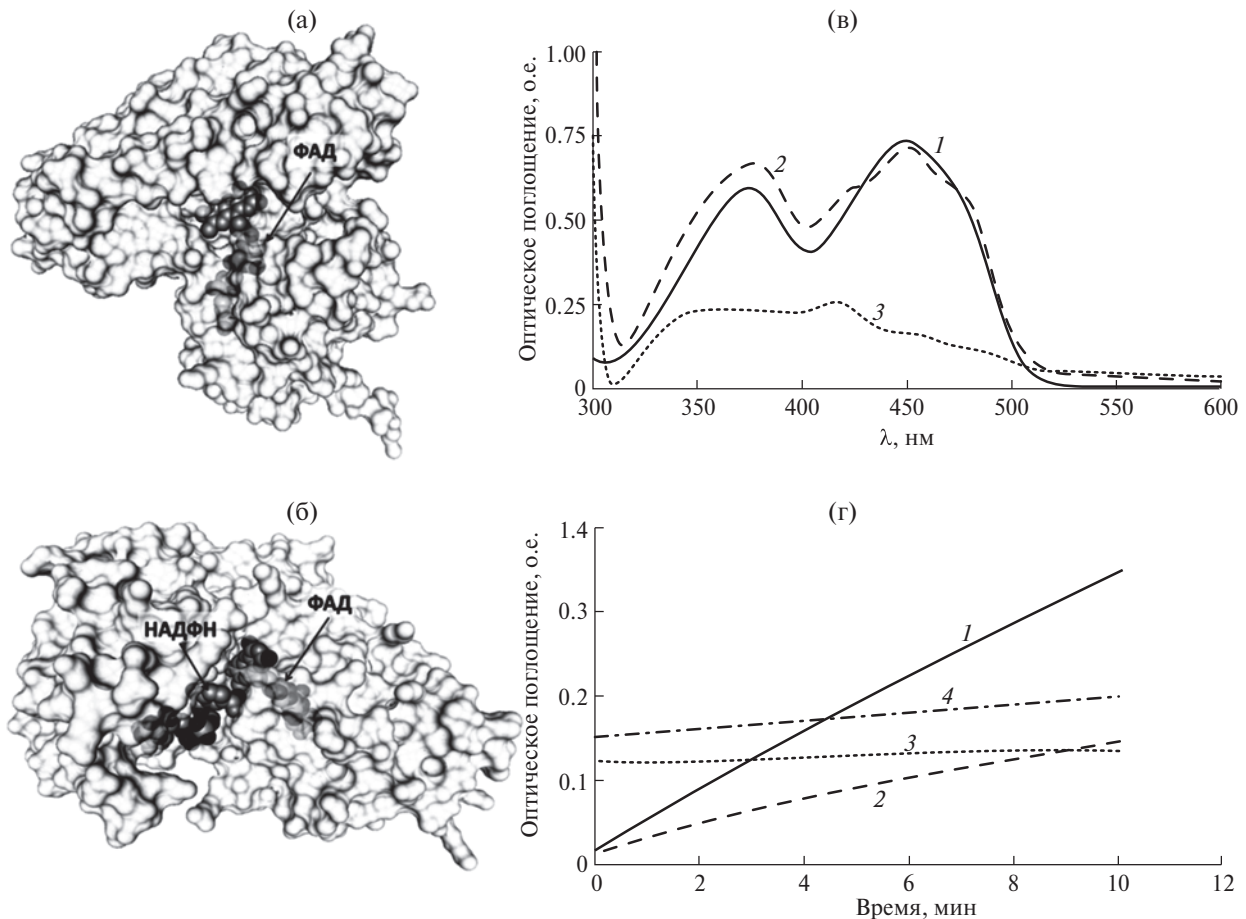


**Рис. 1.** Очистка белков с использованием Ni-NTA агарозы: (а) – хроматограммы очистки FdxE, FdxD, FprA и FdrA. Стрелками обозначены пики элюции. Сплошная линия — поглощение при 280 нм, пунктирная линия — концентрация имидазола. (б) – Электрофореграммы белковых препаратов FprA, FdrA, FdxE и FdxD. М — маркер молекулярных масс.

калий-фосфатный буфер (50 ммоль/л), pH 7.4. Реакцию инициировали добавлением соответствующего кофактора НАД(Ф)Н (1 ммоль/л) и инкубировали при температуре 30°C в течение 10 мин. Восстановление цитохрома *c* детектировали по изменению оптического поглощения при длине волны 550 нм.

Согласно приведенным данным (Ortega Ugalde et al., 2018) в клетках *M. tuberculosis* H37Rv функцию

передачи электронов от восстановительных эквивалентов к микобактериальным стероидным Р450-монооксигеназам выполняют ферредоксины FdxD (ген *Rv3503c*) и FdxE (ген *Rv1786*). Они же, в свою очередь, в равной степени принимают электроны от ФАД-содержащих ферредоксинредуктаз: НАДН-зависимой FdrA (ген *Rv0688*) и НАД(Ф)Н-зависимой FprA (ген *Rv3106*). Основываясь на биоинформатическом анализе,



**Рис. 2.** Анализ структуры и активности рекомбинантных белков: 3D-модели белков FdrA (а) и FprA (б). Спектры поглощения FdrA и FprA (в): 1 — ФАД, 2 — FprA, 3 — FdrA. Скорость восстановления цитохрома с редокс-парами при 550 нм (г): 1 — FdrA-FdxD, 2 — FprA-FdxD, 3 — FprA-FdxE, 4 — FdrA-FdxE.

у бактерий *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 были выявлены ортологичные ферредоксины и ферредоксинредуктазы, имеющие высокую степень гомологии с белками *M. tuberculosis*:

- FdxD (ген MSMEI\_5744, 192 пар нуклеотидов (п.н.) — 63 аминокислотных остатка (а.о.), 6.976 кДа, ~81% идентичности последовательности аминокислот (ИПА) с FdxD *M. tuberculosis* H37Rv;

- FdxE (ген MSMEI\_2499, 192 п.н.) — 63 а.о., 7.087 кДа, ~30% ИПА с FdxE *M. tuberculosis* H37Rv, ~41% ИПА с FdxD *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155;

- НАДН-зависимая FdrA (ген MSMEI\_1381, 1188 п.н.) — 395 а.о., 41.922 кДа, ~74% ИПА с FdrA *M. tuberculosis* H37Rv;

- НАД(Ф)Н-зависимая FprA (ген MSMEI\_2039, 1368 п.н.) — 455 а.о., 49.471 кДа, ~74% ИПА с FprA *M. tuberculosis* H37Rv.

Гены были клонированы в векторе pET28a для последующей экспрессии в клетках *E. coli*. Анализ показал высокий уровень синтеза рекомбинантных белков. Выход чистых препаратов рекомбинантных белков на 1 л культуральной среды составил 6.6 и 15.5 мг/л для ферредоксинов (FdxE и FdxD), 16

и 26 мг/л для НАД(Ф)Н-зависимых ферредоксинредуктаз (FprA и FdrA), соответственно. Наличие полигистидиновой метки (6xHis) позволило осуществить очистку синтезируемых ферредоксинов и ферредоксинредуктаз методом аффинной хроматографии с использованием Ni-NTA агарозы. Была разработана общая схема очистки, предполагающая одноступенчатую элюцию белков (рис. 1а).

При концентрации имидазола 30–50 ммоль/л удалось избавиться от балластных и не связавшихся с носителем белков. Пики поглощения элюируемых белков наблюдались при увеличении концентрации имидазола до 300 ммоль/л. Данный подход позволил получить электрофоретически гомогенные препараты FdxE, FdxD, FprA и FdrA (рис 1б). Маркированные полигистидиновой меткой ферредоксины детектируются на электрофореграмме в области чуть более крупных белков (более 10 кДа), тогда как расчетная масса составляла порядка 9.2 кДа (рис. 1б). Это явление согласуется с литературными данными о том, что низкомолекулярные ферредоксины актинобактерий могут проявлять подобные свойства (Ortega Ugalde et al., 2018; Lu et al., 2017). Белковые продукты, обнаруженные на



электрофореграмме, соответствовали рассчитанным молекулярным массам 6xHis-FdrA (44.2 кДа) и 6xHis-FprA (51.6 кДа).

Микобактериальные ферредоксинредуктазы являются ФАД-содержащими белками (Fischer et al., 2002). Присутствие данной простетической группы было предсказано ранее в рамках автоматической аннотации используемых белковых последовательностей FdrA и FprA и наглядно демонстрируется с использованием 3D-моделирования (рис. 2а, 2б).

Спектральный анализ показал наличие пика оптического поглощения в области излучения при 450 нм, характерного для нековалентно связанного ФАД, для каждого из препаратов FdrA и FprA (рис. 2в). Этот факт свидетельствует о сохранении структурной целостности получаемых ферредоксинредуктаз.

В реакции *in vitro* выявлено стабильное изменение окраски цитохрома *c* при тестировании всех используемых пар FdrA-FdxE, FprA-FdxE, FdrA-FdxD и FprA-FdxD, позволяющее утверждать, что рекомбинантные белки сохраняют свою активность и могут выступать в качестве редокс-партнеров при восстановлении цитохромов (рис. 2г). При этом организация электронного транспорта посредством совместного использования FdrA и FdxD представляется наиболее предпочтительной.

Таким образом, в данной работе получены суперпродукты микобактериальных редокс-партнеров: НАД(Ф)Н-зависимых ферредоксинредуктаз (FdrA и FprA) и железосодержащих ферредоксинов (FdxD и FdxE). Все исследуемые белки были получены в растворимой форме в виде электрофоретически гомогенных препаратов путем их очистки из бесклеточных экстрактов методом аффинной хроматографии с использованием Ni-NTA агарозы. Для ферредоксинредуктаз были определены спектры поглощения, соответствующие ФАД-содержащим белкам. Расположение простетических групп наглядно продемонстрировано с использованием 3D-моделирования белковых структур. В реакции *in vitro* восстановления цитохрома *c* с использованием рекомбинантных препаратов показан транспорт электронов от восстановительных эквивалентов НАД(Ф)Н. Результаты позволяют предположить участие миколицибактериальных FdxD, FdxE, FdrA и FprA в качестве редокс-партнеров цитохромов P450.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 21-64-00024).

#### 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

- Bertani G. Studies on Lysogenesis I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli* // J. Bacteriol. 1951. V. 62. P. 293–300.
- Donova M.V. Current Trends and Perspectives in Microbial Bioconversions of Steroids // Microbial Steroids. Methods in Molecular Biology / Eds. Barreiro C., Barredo J.L. N.Y.: Humana, 2023. V. 2704. P. 3–21.
- Fernandez-Cabezón L., Galan B., Garcia J.L. Engineering *Mycobacterium smegmatis* for testosterone production // Microb. Biotechnol. 2017. V. 10. P. 151–161.
- Fischer F., Raimondi D., Aliverti A., Zanetti G. *Mycobacterium tuberculosis* FprA, a novel bacterial NADPH-ferredoxin reductase // Eur. J. Biochem. 2002. V. 269. P. 3005–3013.
- Garcia J.L., Uhia I., Galan B. Catabolism and biotechnological applications of cholesterol degrading bacteria // Microb. Biotechnol. 2012. V. 5. P. 679–699.
- Garcia-Fernandez E., Frank D.J., Galan B., Kells P.M., Podust L.M., Garcia J.L., Ortiz de Montellano P.R. A highly conserved mycobacterial cholesterol catabolic pathway // Environ. Microbiol. 2013. V. 15. P. 2342–2359.
- Hannemann F., Bichet A., Ewen K.M., Bernhardt R. Cytochrome P450 systems – biological variations of electron transport chains // Biochim. Biophys. Acta. 2007. V. 1770. P. 330–344.
- Lu Y., Qiao F., Li Y., Sang X.-H., Li C.-R., Jiang J.-D., Yang X.-Y., You X.-F. Recombinant expression and biochemical characterization of *Mycobacterium tuberculosis* 3Fe-4S ferredoxin Rv1786 // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2017. V. 101. P. 7201–7212.
- Ortega Ugalde S., de Koning C.P., Wallraven K., Bruyneel B., Vermeulen N.P., Grossmann T.N., Bitter W., Commandeur J.-N.M., Vos J.C. Linking cytochrome P450 enzymes from *Mycobacterium tuberculosis* to their cognate ferredoxin partners // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2018. V. 102. P. 9231–9242.
- Snapper S.B., Melton R.E., Mustafa S., Kieser T., Jacobs W.R., Jr. Isolation and characterization of efficient plasmid transformation mutants of *Mycobacterium smegmatis* // Mol. Microbiol. 1990. V. 11. P. 1911–1919.
- Tartoff K.D., Hobbs C.A. Improved media for growing plasmid and cosmid clones // Bethesda Res. Lab. Focus. 1987. V. 9. P. 12.
- Tekucheva D.N., Nikolayeva V.M., Karpov M.V., Timakova T.A., Shutov A.A., Donova M.V. Bioproduction of testosterone from phytosterol by *Mycobacterium neoaurum* strains: “one-pot”, two modes // Bioresour. Bioprocess. 2022. V. 9. P. 116.
- Wilburn K.M., Fieweger R.A., VanderVen B.C. Cholesterol and fatty acids grease the wheels of *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis // Pathog. Dis. 2018. V. 76. Art. fty021. P. 21.



## Identification of Electron Transfer in the System of Ferredoxins and Ferredoxin Reductases from *Mycobacterium smegmatis*

D. O. Epiktetov<sup>1, \*</sup>, M. V. Karpov<sup>1</sup>, and M. V. Donova<sup>1</sup>

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

\*e-mail: epiktetoff@gmail.com

Received October 13, 2023; revised October 26, 2023; accepted October 26, 2023

**Abstract**—Steroid-26-monoxygenases belong to the cytochrome P450 superfamily and function as part of three-component systems together with ferredoxins and ferredoxin reductases providing electron transport. The P450-dependent redox partners of the actinobacterial strain *Mycobacterium smegmatis* mc<sup>2</sup>155 were investigated. The genes encoding mycolibacterial ferredoxins (FdxD and FdxE) and ferredoxin reductases (FdrA and FprA) were overexpressed in *E. coli* cells. A scheme for isolation and purification of synthesized recombinant proteins using affinity chromatography was developed, resulting in electrophoretically homogeneous preparations. Spectral analysis of ferredoxin reductase showed absorption peaks characteristic of FAD-containing proteins. The reaction of cytochrome *c* reduction using recombinant proteins was carried out, demonstrating that FdxD, FdxE, FdrA, and FprA can act as components of electron transport from the reducing equivalents of NAD(P)H.

**Keywords:** ferredoxin, ferredoxin reductase, redox partners, steroids, electron transport, *Mycobacterium smegmatis* mc<sup>2</sup>155

УДК 579.255+575.2.084

## СОЗДАНИЕ ВЕКТОРОВ ДЛЯ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМА ДРОЖЖЕЙ-САХАРОМИЦЕТОВ НА ОСНОВЕ СИСТЕМЫ CRISPR-CAS9

© 2024 г. А. Г. Матвеевко<sup>а</sup>, А. С. Михайличенко<sup>а</sup>, Г. А. Журавлева<sup>а, б, \*</sup><sup>а</sup>Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, 199034 Россия<sup>б</sup>Лаборатория биологии амилоидов СПбГУ, Санкт-Петербург, 199034 Россия

\*e-mail: g.zhuravleva@spbu.ru

Поступила в редакцию 13.10.2023 г.

После доработки 10.11.2023 г.

Принята к публикации 11.11.2023 г.

Проведено конструирование новых векторов для редактирования генома дрожжей с помощью CRISPR/Cas9. Разработана и успешно применена система, позволяющая осуществлять клонирование новых мишеней с помощью стандартных методов: ПЦР – рестрикция – лигирование. Благодаря сконструированным векторам получены мутанты *sup35-25*, делеция гена *PSH1* и дизрупция гена *NAM7* (*UPF1*). Протестирован удобный способ идентификации плазмид с новой мишенью и приведено подробное описание использованной методики клонирования и отбора плазмид с новыми мишенями.

**Ключевые слова:** геномное редактирование, CRISPR/Cas9, *SUP35*, *Saccharomyces cerevisiae*

DOI: 10.31857/S0026365624020073

Технологии редактирования генома в настоящее время активно развиваются. Благодаря высокой эффективности гомологичной рекомбинации у дрожжей *S. cerevisiae*, с помощью системы CRISPR/Cas9 можно осуществлять множество манипуляций с геномом дрожжей (Giersch, Finnigan, 2017).

Для применения CRISPR/Cas9 для редактирования генома необходимо экспрессировать нуклеазу Cas9 и единую гидовую или направляющую РНК (sgRNA), состоящую из последовательности мишени, слитой со скэффолдом sgRNA. В свою очередь, скэффолд состоит из объединенных частей crRNA и tracrRNA, достаточных для функционирования комплекса Cas9-sgRNA (Jinek et al., 2012). Для экспрессии этих компонентов в клетках дрожжей, как правило, используется плаزمид, в которой ген Cas9 находится под контролем сильного промотора (например, *TEF1* или *GPD*), а sgRNA контролируется промоторами малых РНК (например, *SNR52*), транскрипция с которых осуществляется с помощью РНК-полимеразы III. При этом для нацеливания системы CRISPR/Cas9 на определенную мишень необходимо клонировать последовательность этой мишени в вектор, содержащий все перечисленные компоненты. Сложность этого клонирования заключается в том, что оно должно быть “бесшовным”, то есть последовательности промотора, мишени и скэффолда sgRNA должны переходить одна в другую без каких-либо последовательностей в местах соединения, таких как рестрикционные сайты.

Существующие системы, позволяющие осуществлять “бесшовное” клонирование новых мишеней в векторы, основаны на методиках Gibson assembly, рекомбинации *in vivo* и GoldenGate (DiCarlo et al., 2013; Mans et al., 2015; Horwitz et al., 2015). Однако мы задались целью разработать способ осуществлять такое клонирование, используя только классические методы: ПЦР, рестрикцию и лигирование. Подобная система ранее уже была описана (Laughery et al., 2015). Созданный авторами вектор pML107 (Addgene #67639) содержит промотор *SNR52*, на 3'-конце которого находится сайт *BclI*, и неполный скэффолд sgRNA, фланкированный сайтом *SwaI* на 5'-конце. Согласно предлагаемой схеме клонирования, необходимо синтезировать два комплементарных олигонуклеотида, которые после гибридизации должны образовать фрагмент, содержащий совместимый с *BclI* липкий 5'-конец, последовательность мишени, а затем недостающий фрагмент скэффолда sgRNA. Для получения целевой плазмиды этот фрагмент нужно клонировать по одному липкому и одному тупому концу в вектор, обработанный рестриктазами *BclI* и *SwaI*. При работе с данной системой мы столкнулись с некоторыми неудобствами. Во-первых, клонирование по тупому концу происходит неэффективно. Во-вторых, сама плаزمида pML107 обладает большими размерами (12366 п.н.), что снижает эффективность дрожжевой трансформации. При этом плазмиду можно было бы оптимизировать, убрав из ее состава необязательные элементы,

такие как ориджин репликации фага f1 и фланги фрагмента, содержащего селективный маркер *LEU2*.

Мы также наблюдали нестабильность при подержании плазмиды pML107 в клетках *E. coli* штамма DH5 $\alpha$ . В частности, мы наблюдали появление укороченных вариантов плазмид. Один из таких вариантов был обозначен как pML107-3. Его удалось изолировать, благодаря чему было установлено, что данный вариант вектора содержит делецию фрагмента с 8670 по 3199 п.н. (координаты на карте плазмиды, депонированной в Addgene #67639). Соответственно, в данной плазмиде отсутствует маркер *LEU2*, часть ориджина 2 $\mu$ -ДНК и часть *Cas9*, однако не затронут модуль для клонирования и экспрессии sgRNA.

В качестве целевого гена дрожжей для использования системы CRISPR/Cas9 мы выбрали ген *SUP35*, кодирующий один из факторов терминации трансляции, eRF3. Комплекс eRF3 с другим фактором терминации трансляции, eRF1, обеспечивает терминацию синтеза полипептидной цепи при появлении стоп-кодона в А-сайте рибосомы. Полная инактивация гена *SUP35* летальна, однако описаны некоторые мутации *sup35*, нарушающие работу факторов терминации трансляции. При этом повышается вероятность того, что рибосома будет проскальзывать стоп-кодон, в результате чего часть стоп-кодонов в транскриптах будет прочитана, как значащие кодоны. Для исследования терминации трансляции часто используются штаммы, несущие нонсенс-мутации в маркерных генах. При нарушениях в работе факторов терминации трансляции, такие нонсенс-мутации могут полностью или частично не проявляться из-за прочтения стоп-кодонов – это явление называется нонсенс-супрессией, а штаммы, в которых это наблюдается, обладают нонсенс-супрессорным фенотипом (Inge-Vechtomov et al., 2003). Одной из мутаций с нонсенс-супрессорным фенотипом является *sup35-25*, которая приводит к замене треонина на изолейцин в 378-м положении белка Sup35 (Volkov et al., 2002). Данная мутация также удобна для детекции, так как она нарушает рестрикционный сайт BshTI (AgeI). Для получения данной мутации с помощью CRISPR/Cas9 можно использовать две мишени: в случае первой мишени (S35(-25) А) мутация нарушает соответствующий PAM, а во второй (S35(-25) В) приходится на нуклеотид, непосредственно предшествующий PAM (рис. 1а).

Для того чтобы получить конструкции для экспрессии sgRNA с мишенями в гене *SUP35* и полными последовательностями скэффолдов sgRNA, мы провели сайт-направленный мутагенез плазмиды pML107-3 с использованием высокопроцессивной полимеразы Pfx (Invitrogen #12344-024). Для получения sgRNA с мишенью S35(-25) А использовали праймеры S35(-25) А-sgR-F и S35(-25)

А-pSNR52-R, а для S35(-25) В – праймерами S35(-25) В-sgR-F и S35(-25) В-pSNR52-R (табл. 1).

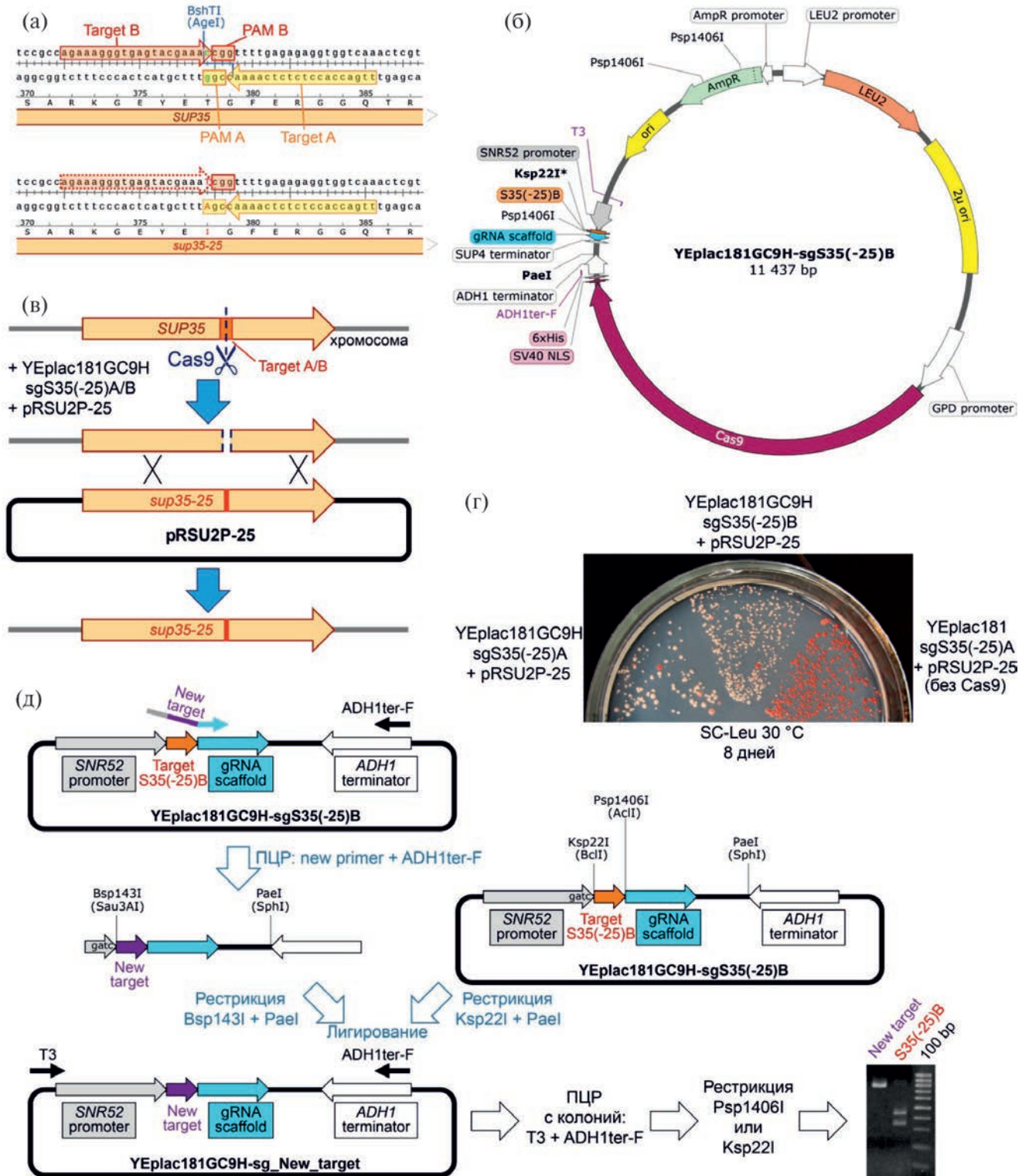
В результате были получены векторы pML107-3-sgS35(-25) А и pML107-3-sgS35(-25) В. Подтвердив корректность последовательностей, мы переклонировали фрагменты XapI-Eco31I из этих плазмид в вектор YEplac181 (Gietz, Sugino, 1988) по сайтам EcoRI-Eco31I, получив таким образом мульткопийные плазмиды для экспрессии sgRNA в клетках дрожжей: YEplac181-sgS35(-25) А и YEplac181-sgS35(-25) В. Здесь и далее для клонирования нами были использованы эндонуклеазы рестрикции (кроме Ksp22I), лигаза фага T4 и наборы реактивов для очистки ДНК производства “Thermo Scientific”. В отличие от остова pML107, YEplac181 более компактна, так как не содержит ориджина репликации фага f1 и несет меньший фрагмент с маркером *LEU2*.

Для сверхэкспрессии Cas9 мы сконструировали плазмиду YCplac22GPD-Cas9, переклонировав фрагмент PvuI-XbaI, длиной 5318 п.н., из pML107 в YCplac22 (Gietz, Sugino, 1988) вместо фрагмента PvuI-XbaI, длиной 151 п.н. Мы модифицировали Cas9, добавив на 3'-конец последовательность, кодирующую 6 гистидиновых остатков. Для этого в плазмиду YCplac22GPD-Cas9 по сайту BamHI был вставлен фрагмент BglII-BglII (31 п.н.) из pDEST-527 (Addgene #11518). Полученная плаزمид была названа YCplac22GPD-Cas9-His6. Последующие эксперименты показали, что наличие гистидинов на С-конце Cas9 не влияло на эффективность ее работы.

Векторы для одновременной экспрессии Cas9 и sgRNA в дрожжах были сконструированы следующим образом: большой фрагмент PvuI-PaeI из YCplac22GPD-Cas9-His6 был переклонирован по тем же сайтам на место малых фрагментов (211 п.н.) плазмид YEplac181-sgS35(-25) А и YEplac181-sgS35(-25) В. Таким образом, были получены векторы YEplac181GC9H-sgS35(-25) А и YEplac181GC9H-sgS35(-25) В (рис. 1б), которые оказались меньше pML107 почти на 1 kb (11437 п.н.).

Мы использовали сконструированные плазмиды для получения мутантов *sup35-25* в штамме 74-D694 (Chernoff et al., 1995). Данный штамм содержит нонсенс-мутацию *ade1-14*, благодаря которой клетки не способны синтезировать аденин и, как следствие, накапливают красный пигмент, формирующийся из неметаболизированного предшественника аденина. При наличии нонсенс-супрессорной мутации *sup35-25* штамм становится протрофным по аденину и приобретает характерный для дрожжей белый цвет колоний. Таким образом, по соотношению красных и белых колоний можно судить о том, какая доля колоний несет мутацию *sup35-25*. Помимо компонентов системы CRISPR/Cas9, необходим также фрагмент мутантной аллели *sup35-25*, который системы репарации смогли





**Рис. 1.** Создание удобной системы клонирования мишеней в вектор для редактирования генома *Saccharomyces cerevisiae* с помощью CRISPR-Cas9. (а) — Схема расположения мутации *sup35-25* и мишеней S35(-25) А и S35(-25) В в гене *SUP35*. (б) — Карта плазмиды YEplac181GC9H-sgS35(-25) В; создана с помощью программы SnapGene Viewer. (в) — Схема получения мутантов *sup35-25*. (г) — Рост колоний штамма 74-D694, трансформированного плазмидами в указанных комбинациях. (д) — Схема клонирования новых мишеней в вектор YEplac181GC9H-sgS35(-25) В и отбора колоний *E. coli*, несущих корректно сконструированный новый вектор.



бы использовать как матрицу для гомологичной рекомбинации после того, как Cas9 внесет двуцепочечный разрыв в гене *SUP35*. В качестве источника такого фрагмента для репарации мы использовали плазмиду pRSU2P-25 (Volkov et al., 2002) (рис. 1в). Мы трансформировали штамм 74-D694 (табл. 1) плазмидами YEplac181GC9H-sgS35(-25) А и YEplac181GC9H-sgS35(-25) В совместно с pRSU2P-25, используя стандартную методику (Gietz et al., 1995). В результате подавляющее большинство колоний приобрело белый цвет при использовании обеих мишеней (рис. 1г). Восемь случайно выбранных белых колоний (четыре, полученных с помощью sgRNA S35(-25) А, и четыре — с S35(-25) В) были проверены с помощью ПЦР и секвенирования фрагмента гена *SUP35*. Во всех случаях была обнаружена мутация *sup35-25*. Таким

образом, полученные нами плазмиды позволяют эффективно редактировать геном *S. cerevisiae*.

Мы также разработали методику “бесшовного” клонирования новых мишеней с использованием ПЦР, рестрикции и лигирования, а также способ селекции корректно сконструированных новых векторов (рис. 1д). Полученные нами плазмиды, несущие sgRNA S35(-25) В, удобно использовать для получения конструкций, несущих другие мишени, так как наличие данной мишени приводит к появлению сайтов рестрикции Ksp221I и Psp1406I (AclI), которые позволяют осуществлять клонирование и отбор векторов. Предлагаемая схема позволяет создать как вектор на основе YEplac181-sgS35(-25) В, экспрессирующий только направляющую РНК, так и вектор, несущий также *Cas9-His<sub>6</sub>*, на основе YEplac181GC9H-sgS35(-25) В. На первом этапе необходимо поработать одну из этих плазмид

**Таблица 1.** Используемые в работе штаммы, плазмиды и олигонуклеотиды

Название, ссылка	Тип	Описание (генотип или последовательность)
DH5α	Штамм <i>E. coli</i>	F <sup>-</sup> φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(r <sub>K</sub> <sup>-</sup> , m <sub>K</sub> <sup>+</sup> ) phoA supE44 λ <sup>-</sup> thi-1 gyrA96 relA1
ER2925	Штамм <i>E. coli</i>	ara-14 leuB6 fhuA31 lacY1 tsx78 glnV44 galK2 galT22 mcrA dcm-6 hisG4 rfbD1 R(zgb210::Tn10) Tet <sup>S</sup> endA1 rspL136 (Str <sup>R</sup> ) dam13::Tn9 (Cam <sup>R</sup> ) xylA-5 mtl-1 thi-1 mcrB1 hsdR2
74-D694 (Chernoff et al., 1995)	Штамм <i>S. cerevisiae</i>	MATα ade1-14 trp1-289 ura3-52 his3-Δ200 leu2-3,112 flo8-1 [psi <sup>-</sup> ] [PIN <sup>+</sup> ]
U-1A-D1628 (Moskalenko et al., 2003)	Штамм <i>S. cerevisiae</i>	MATα ade1-14 trp1-289 his3-Δ200 lys2 ura3-52 leu2-3,112 sup45::HIS3MX [pRS316-SUP45] [psi <sup>-</sup> ] [PIN <sup>+</sup> ]
U-14-D1690 (Maksiutenko et al., 2021)	Штамм <i>S. cerevisiae</i>	MATα ade1-14 trp1-289 his3-Δ200 lys2 ura3-52 leu2-3,112 sup35::HIS3MX [pRSU2] [psi <sup>-</sup> ] [PIN <sup>+</sup> ]
pRSU2P-25 (Volkov et al., 2002)	Плаزمид	CEN URA3 P <sub>SUP35</sub> -sup35-25 amp <sup>R</sup>
pML107 (Laughery et al., 2015)	Плаزمид	2μ LEU2 P <sub>GPD</sub> -SpCas9 P <sub>SNR52</sub> -sgRNA-scaffold(part) amp <sup>R</sup>
pML107-3	Плаزمид	P <sub>GPD</sub> -SpCas9(part) P <sub>SNR52</sub> -sgRNA-scaffold(part) amp <sup>R</sup>
pML107-3-sgS35(-25) А	Плаزمид	P <sub>GPD</sub> -SpCas9(part) P <sub>SNR52</sub> -S35(-25) А-sgRNA amp <sup>R</sup>
pML107-3-sgS35(-25) В	Плаزمид	P <sub>GPD</sub> -SpCas9(part) P <sub>SNR52</sub> -S35(-25) В-sgRNA amp <sup>R</sup>
YCplac22GPD-Cas9	Плаزمид	CEN TRP1 P <sub>GPD</sub> -SpCas9 amp <sup>R</sup>
YCplac22GPD-Cas9-His6	Плаزمид	CEN TRP1 P <sub>GPD</sub> -SpCas9-His <sub>6</sub> amp <sup>R</sup>
YEplac181-sgS35(-25) А	Плаزمид	2μ LEU2 P <sub>SNR52</sub> -S35(-25) А-sgRNA amp <sup>R</sup>
YEplac181-sgS35(-25) В	Плаزمид	2μ LEU2 P <sub>SNR52</sub> -S35(-25) В-sgRNA amp <sup>R</sup>
YEplac181GC9H-sgS35(-25) А	Плаزمид	2μ LEU2 P <sub>GPD</sub> -SpCas9-His <sub>6</sub> P <sub>SNR52</sub> -S35(-25) А-sgRNA amp <sup>R</sup>
YEplac181GC9H-sgS35(-25) В	Плаزمид	2μ LEU2 P <sub>GPD</sub> -SpCas9-His <sub>6</sub> P <sub>SNR52</sub> -S35(-25) В-sgRNA amp <sup>R</sup>
YEplac181GC9H-sgP1(6)	Плаزمид	2μ LEU2 P <sub>GPD</sub> -SpCas9-His <sub>6</sub> P <sub>SNR52</sub> -P1(6)-sgRNA amp <sup>R</sup>
YEplac181GC9H-sgU1(7)	Плаزمид	2μ LEU2 P <sub>GPD</sub> -SpCas9-His <sub>6</sub> P <sub>SNR52</sub> -U1(7)-sgRNA amp <sup>R</sup>
S35(-25) А-sgR-F	Олигонуклеотид	accacctctctcaaacggttttagagctagaatagcaagttaaaataaggc
S35(-25) В-sgR-F	Олигонуклеотид	aagggtgagtacgaaacggttttagagctagaatagcaagttaaaataaggc
S35(-25) А-pSNR52-R	Олигонуклеотид	gttttagagagaggtggtcaagatcatttatcttctactg
S35(-25) В-pSNR52-R	Олигонуклеотид	gtttctactaccctttctgatcatttatcttctactg
ADH1ter-F	Олигонуклеотид	ttccggatcctagactctcgaggcgaatttcttatga
T3	Олигонуклеотид	Attaacacctactaaag
P1(6)-sgR-F	Олигонуклеотид	aatgatcgacctggcccaacggcctaggttttagagctagaatagc
U1(7)-sgR-F	Олигонуклеотид	taaggatcctccaacgaatcggtacggttttagagctagaatagc

в штамме *E. coli*, в котором неактивна Dam-метиلاза, так как в дальнейшем необходимо будет использовать рестриктазу Ksp22I, чувствительную к Dam-метилованию. Мы использовали штамм ER2925 (“New England Biolabs”), однако должен подойти любой штамм *Dam*<sup>-</sup>. Необходимо также подобрать праймер, содержащий с 5'-конца сайт рестриктазы Bsp143I (Sau3AI), затем последовательность новой мишени и участок, отжигающийся на скэффолд sgRNA. В общем виде праймеры, которые мы использовали, имели следующую последовательность: 5'-XXXXgacNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNggttttagagctagaatagc-3', где XXX – произвольные нуклеотиды, а NNN... – последовательность мишени (без PAM). С полученным праймером в паре с праймером ADH1ter-F необходимо далее провести ПЦР на матрице YEplac181-sgS35(-25) В или YEplac181GC9H-sgS35(-25) В. На этом этапе можно использовать плазмиды, выделенные из *Dam*<sup>+</sup> штаммов, но в таком случае лучше избавиться от матрицы, либо выделив продукт из агарозного геля, либо обработав ПЦР-смесь рестриктазой DpnI, однако быстрее использовать неметилованные плазмиды и проводить очистку ПЦР-продукта из раствора. На следующем этапе необходимо рестрицировать ПЦР-продукт с помощью Bsp143I (Sau3AI) и PaeI (SphI), а плазмиду — с помощью Ksp22I (или BclI) и PaeI (SphI). Ksp22I (SibEnzyme) — изоизомер BclI, но, в отличие от BclI, температурный оптимум ее работы составляет 37°C, поэтому ее удобнее использовать для двойной рестрикции. Затем необходимо инактивировать рестриктазы (инкубированием при 65°C в течение 20 мин), после чего смешать растворы плазмиды и ПЦР-продукта, добавить АТФ и лигазу фага T4. Фрагмент способен лигироваться в плазмиду, так как рестрикция Ksp22I и Bsp143I приводит к появлению совместимых липких концов. Полученную лигазную смесь можно использовать для трансформации компетентных клеток *E. coli*. Корректно сконструированная плаزمида должна отличаться от исходной всего на 20 нуклеотидов, так как происходит замена только последовательности мишени. Чтобы отличить бактерии, несущие исходную плазмиду, от бактерий с новой, мы сначала ставили ПЦР с колоний с праймерами T3 и ADH1ter-F, а затем полученный ПЦР-продукт рестрицировали либо эндонуклеазой Psp1406I (AclI), либо Ksp22I. Так как при замене мишени S35(-25) В на любую другую мишень хотя бы один из сайтов Psp1406I (AclI) или Ksp22I с большой вероятностью не сохранится, то мы увидим единственный фрагмент в том случае, если бактериальный клон содержал новую плазмиду, и два фрагмента, если исходную. Для рестрикции мы использовали до 2.5 мкл неоцищенной ПЦР-смеси при объеме реакции 10 мкл: это позволяет ускорить отбор плазмид и проверить одновременно множество колоний, так как нет необходимости проводить очистку ПЦР-продуктов.

С использованием описанной выше методики мы получили плазмиды с мишенями в генах *PSH1* и *NAM7 (UPF1)*. Для этого были использованы праймеры P1(6)-sgR-F и U1(7)-sgR-F (табл. 1), и были получены плазмиды YEplac181GC9H-sgP1(6) и YEplac181GC9H-sgU1(7), соответственно. С помощью этих плазмид нам удалось получить штаммы на основе U-1A-D1628 и U-14-D1690 (табл. 1), нокаутные по генам *PSH1* и *NAM7*.

Таким образом, мы разработали новую систему векторов и успешно ее применили для редактирования генома *S. cerevisiae*. Все плазмиды и другие материалы статьи доступны по запросу.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Данное исследование было выполнено на базе Ресурсного центра “Развитие молекулярных и клеточных технологий” научного парка СПбГУ. Статья посвящается 300-летию СПбГУ.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Проект выполнен при финансовой поддержке гранта РФФ № 23-14-00063.

## 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

- Chernoff Y.O., Lindquist S.L., Ono B., Inge-Vechtomov S.G., Liebman S.W. Role of the chaperone protein Hsp104 in propagation of the yeast prion-like factor [psi+] // *Science*. 1995. V. 268. P. 880-884. <https://doi.org/10.1126/science.7754373>
- DiCarlo J.E., Norville J.E., Mali P., Rios X., Aach J., Church G.M. Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems // *Nucl. Acids Res.* 2013. V. 41. P. 4336-4343. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt135>
- Giersch R.M., Finnigan G.C. Yeast still a beast: diverse applications of CRISPR/Cas editing technology in *S. cerevisiae* // *Yale J. Biol. Med.* 2017. V. 90. P. 643-651.
- Gietz R.D., Sugino A. New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with *in vitro* mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites // *Gene*. 1988. V. 74. P. 527-534. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(88\)90185-0](https://doi.org/10.1016/0378-1119(88)90185-0)
- Gietz R., Schiestl R., Willems A., Woods R. Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/

- SS-DNA/PEG procedure // *Yeast*. 1995. V. 11. P. 355–360. <https://doi.org/10.1002/yea.320110408>
- Horwitz A.A., Walter J.M., Schubert M.G., Kung S.H., Hawkins K., Platt D.M., Hernday A.D., Mahadejukul-Meadows T., Szeto W., Chandran S.S., Newman J.D. Efficient multiplexed integration of synergistic alleles and metabolic pathways in yeasts via CRISPR-Cas // *Cell Syst*. 2015. V. 1. P. 88–96. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2015.02.001>
- Inge-Vechtomov S., Zhouravleva G., Philippe M. Eukaryotic release factors (eRFs) history // *Biol. Cell*. 2003. V. 95. P. 195–209. [https://doi.org/10.1016/s0248-4900\(03\)00035-2](https://doi.org/10.1016/s0248-4900(03)00035-2)
- Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity // *Science*. 2012. V. 337. P. 816–821. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>
- Laughery M.F., Hunter T., Brown A., Hoopes J., Ostbye T., Shumaker T., Wyrick J.J. New vectors for simple and streamlined CRISPR-Cas9 genome editing in *Saccharomyces cerevisiae* // *Yeast*. 2015. V. 32. P. 711–720. <https://doi.org/10.1002/yea.3098>
- Maksiutenko E.M., Barbitoff Y.A., Matveenko A.G., Moskalenko S.E., Zhouravleva G.A. Gene amplification as a mechanism of yeast adaptation to nonsense mutations in release factor genes // *Genes (Basel)*. 2021. V. 12. Art. 2019. <https://doi.org/10.3390/genes12122019>
- Mans R., van Rossum H.M., Wijsman M., Backx A., Kuijpers N.G., van den Broek M., Daran-Lapujade P., Pronk J.T., van Maris A.J., Daran J.M. CRISPR/Cas9: a molecular Swiss army knife for simultaneous introduction of multiple genetic modifications in *Saccharomyces cerevisiae* // *FEMS Yeast Res*. 2015. V. 15. Art. fov004. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fov004>
- Moskalenko S.E., Chabelskaya S.V., Inge-Vechtomov S.G., Philippe M., Zhouravleva G.A. Viable nonsense mutants for the essential gene *SUP45* of *Saccharomyces cerevisiae* // *BMC Mol. Biol.* 2003. V. 10. Art. 2. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-4-2>
- Volkov K., Aksenova A., Soom M., Osipov K., Svitin A., Kurischko C., Shkundina I., Ter-Avanesyan M., Inge-Vechtomov S., Mironova L. Novel non-Mendelian determinant involved in the control of translation accuracy in *Saccharomyces cerevisiae* // *Genetics*. 2002. V. 160. P. 25–36. <https://doi.org/10.1093/genetics/160.1.25>

---



---

## SHORT COMMUNICATIONS

---



---

### Construction of Vectors for the Genome Editing of *Saccharomyces* Yeast Using CRISPR-Cas9 System

A. G. Matveenko<sup>1</sup>, A. S. Mikhailichenko<sup>1</sup>, and G. A. Zhouravleva<sup>1, 2, \*</sup>

<sup>1</sup>*St Petersburg State University, St Petersburg, 199034 Russia*

<sup>2</sup>*Laboratory of Amyloid Biology SPbU, St Petersburg, 199034 Russia*

\*e-mail: g.zhuravleva@spbu.ru

Received October 13, 2023; revised November 10, 2023; accepted November 11, 2023

**Abstract**—New vectors for the yeast genome editing using CRISPR/Cas9 were constructed. A system for cloning of new targets using the standard methods (PCR–restriction–ligation) was developed and successfully applied. The constructed vectors allowed us to obtain the *sup35-25* mutants, deletion of the *PSH1* gene and disruption of the *NAM7 (UPF1)*. A convenient method for identifying plasmids with a new target was tested. A detailed description of the cloning technique used and selection of plasmids with the new targets is provided.

**Keywords:** genome editing, CRISPR/Cas9, *SUP35*, *Saccharomyces cerevisiae*

УДК 57.083

## ***RHODOCOCCLUS QINGSHENGII* GIMm1 КАК ОСНОВА БИОСЕНСОРА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФУНГИЦИДА КАРБЕНДАЗИМА**

© 2024 г. Т. Н. Кувичкина<sup>а</sup>, Е. Н. Капаруллина<sup>а</sup>, \* Н. В. Доронина<sup>а</sup>, А. Н. Решетиллов<sup>а</sup>

<sup>а</sup>ФИЦ “Пушинский научный центр биологических исследований РАН”, Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Московская область, Пушкино, 142290 Россия

\*e-mail: lenokap80@gmail.com

Поступила в редакцию 13.10.2023 г.

После доработки 27.10.2023 г.

Принята к публикации 28.10.2023 г.

Исследована возможность использования штамма *Rhodococcus qingshengii* GIMm1, выделенного из образца глины Мертвого моря, как основы биосенсора для определения бензимидазольного фунгицида карбендазима. Наблюдали высокую чувствительность биосенсора от 2 до 160 мкМ карбендазима при нейтральных значениях pH и концентрациях NaCl до 500 мМ с долговременной стабильностью до 30 сут.

**Ключевые слова:** амперометрический микробный биосенсор, родококки, *Rhodococcus qingshengii*, кислородный электрод, фунгицид карбендазим

DOI: 10.31857/S0026365624020086

Низкомолекулярные органические соединения (2,4-динитрофенол, ортофталат натрия, карбендазим) характеризуются высокой степенью токсичности. Для определения этих соединений могут быть использованы амперометрические биосенсоры, в которых в качестве чувствительного элемента применяются микроорганизмы. Разработаны биосенсоры для определения 2,4-динитрофенола и ортофталата натрия с использованием штаммов *Rhodococcus erythropolis* HL PM-1 и *Rhodococcus wratislaviensis* ВКМ Ас-2782, соответственно (Китова и соавт., 2004, Кувичкина и соавт., 2015, Патент, 2015).

Известно, что бензимидазольный фунгицид карбендазим широко используется в сельском хозяйстве для борьбы с различными грибными заболеваниями. Карбендазим химически стабилен и может сохраняться в почве в течение года (Singh et al., 2016). Показано его негативное влияние на печень, эндокринную и репродуктивные системы человека. Дегградация этого соединения может происходить в окружающей среде под действием ряда микроорганизмов (Zhang et al., 2022). Известно ограниченное количество деструкторов карбендазима, среди которых преобладают грамположительные актинобактерии, принадлежащие к роду *Rhodococcus*. Несмотря на широкое использование этого фунгицида, пути его дегградации изучены недостаточно. Однако охарактеризованы первые ферменты разложения карбендазима (Pandey et al., 2010; Zhang et al., 2022).

Цель данной работы – исследование возможности использования иммобилизованных клеток (ИМК) *Rhodococcus qingshengii* GIMm1 как основы биосенсора для определения бензимидазольного фунгицида карбендазима.

Штамм GIMm1 изолирован из образца глины Мертвого моря в рамках этого исследования. Чистую культуру выделяли на агаризованной среде ГКА (глюкозо-картофельный агар), содержащей 10 г глюкозы, 18 г агара, 300 мл картофельного настоя, 700 мл дистиллированной воды. Культуру выращивали на среде ГКА в течение 2–3 сут при температуре 28°C. Чистоту выделенной культуры контролировали световой микроскопией и по однородности колоний на агаризованной среде.

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 (Belova et al., 2023). Поиск последовательности гена 16S рРНК проводили в базах данных NCBI GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) и JGI (<https://img.jgi.doe.gov/>), филогенетический анализ осуществляли с помощью пакетов программ BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). На основании секвенирования гена 16S рРНК штамм GIMm1 принадлежал к известному виду, поскольку имел



100% сходства с представителем рода *Rh. qingshengii* djl-6<sup>T</sup> (Xu et al., 2007).

Штамм *Rh. qingshengii* G1Mm1 поддерживали на скошенном ГКА при температуре 28°C. Для культивирования штамма G1Mm1 использовали минеральную среду “К” состава (г/л):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ —2.0;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ —2.0;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  — 0.125;  $\text{NaCl}$  — 0.5;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  — 0.002; pH — 7.5; доводили 5M NaOH. В качестве источника углерода использовали 0.04% карбендазима. В стерильную среду делали смыв клеток штамма с поверхности агаризованной среды ГКА (1 пробирка), а затем культивировали на качалке (200 об./мин) при температуре 28°C в течение 2 сут. Для приготовления носителя (биорецептора) биомассу клеток штамма G1Mm1, выращенную на жидкой минеральной среде с карбендазимом в качестве единственного источника углерода и энергии, отделяли центрифугированием при 10000 g в течение 3 мин, дважды отмывали 50 мМ калий-фосфатным буфером (pH 7.1) и ресуспендировали. Иммуобилизацию клеток (ИМК) проводили методом физической адсорбции на хроматографической бумаге Whatman GF/A (Великобритания). Клеточную суспензию наносили на бумагу, формируя пятно диаметром 3 мм, и подсушивали при комнатной температуре в течение 20 мин. Масса ИМК на биорецепторе составляла 2 мг сырого веса. Полученный биорецептор помещали на рабочую поверхность кислородного электрода типа Кларка и фиксировали его с помощью нейлоновой сетки. Измерения проводили с помощью гальваностата-потенциостата IPC—Micro (ООО “Кронас”, Россия), интегрированного с персональным компьютером. Регистрируемым параметром являлась максимальная скорость изменения выходного сигнала  $dI/dt$  в пикоамперах в секунду (пА/с) (ответ биосенсора), связанная пропорциональной зависимостью со скоростью изменения концентрации потребляемого кислорода.

В условиях эксперимента использовали нерастущую культуру, для которой следовало ожидать стабильные стехиометрические соотношения между количеством потребленного кислорода и концентрацией карбендазима. Кинетические константы скорости потребления кислорода и деградации карбендазима идентичны. Максимальные скорости обоих процессов взаимно пропорциональны. Сравнение значений скорости потребления кислорода является обоснованным для подобного параметра деградации карбендазима.

Для изучения влияния концентраций карбендазима на потребление кислорода ИМК концентрации субстрата варьировали в диапазоне от 2 до 160 мкМ. На рис. 1 представлена градуировочная кривая зависимости ответа биосенсора от концентрации карбендазима.

Показано, что скорость деградации карбендазима возрастала по мере повышения его

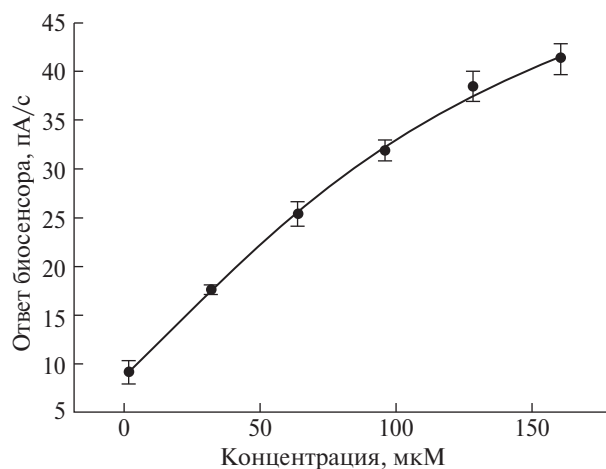


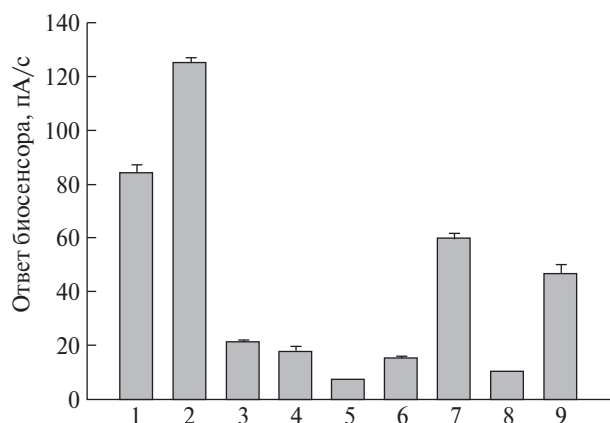
Рис. 1. Градуировочная зависимость биосенсора на основе ИМК *Rhodococcus qingshengii* G1Mm1 от концентрации карбендазима. Ответ биосенсора в пикоамперах в секунду (пА/с).

концентрации. Полученная зависимость величины ответа сенсора от концентрации карбендазима имеет классический сигмоидальный вид (рис. 1), ее аппроксимация проводилась с помощью уравнения Хилла с четырьмя параметрами, коэффициент смешанной корреляции  $R^2 = 0.99$  в программе Sigma Plot 12.5. Для биосенсора на основе ИМК *Rh. qingshengii* G1Mm1 были рассчитаны параметры уравнения Хилла: максимальная скорость потребления кислорода ( $V_{\text{макс}}$ ) 62.11 пА/с и константа сродства к субстрату 145.53 мкМ.

В ходе эксперимента определяли оптимальное значение pH буферного раствора в диапазоне значений pH 5–11. Наиболее эффективным оказался 50 мМ калий-фосфатный буфер со значениями pH, близкими к нейтральным.

Исследовали зависимость ответов биорецептора от ионной силы в диапазоне от 25 до 500 мМ NaCl. Биорецептор регистрировал значительные ответы даже при высоких концентрациях хлористого натрия (до 500 мМ), в отличие от других биосенсоров на низкомолекулярные органические соединения (Китова и соавт., 2002; Кувичкина и соавт., 2015a). Возможно, это связано с источником выделения (Мертвое море), в котором концентрация соли достигает 34%.

Для оценки субстратной специфичности биорецептора на основе ИМК штамма *Rh. qingshengii* G1Mm1 использовали ряд органических соединений в концентрации 0.1 мМ (рис. 2). Показано, что при введении раствора катехола в кювету биорецептор регистрировал ответ более 80 пА/с. Предположили, что одним из интермедиатов разложения карбендазима является катехол, также как у *Pseudomonas* sp. CBW (Fang et al., 2010).



**Рис. 2.** Субстратная специфичность ИмК штамма *Rh. qingshengii* G1M1. Обозначения: 1 — катехол; 2 — фруктоза; 3 — L(-) - арабит; 4 — D-глюкоза; 5 — D-сорбит; 6 — D(+)-целлобиоза; 7 — метиламин; 8 — диметиламин; 9 — карбендазим (концентрация субстратов 0.1 мМ). Ответ биосенсора в пикоамперах в секунду (пА/с).

Кроме того, типовой штамм *Rh. qingshengii* djl-6<sup>T</sup> способен расти на катехоле, глюкозе, фруктозе и карбендазине (Xu et al., 2007).

Операционная стабильность является одной из важнейших характеристик биосенсора. Величина ответа биосенсора на карбендазим остается стабильной в течение 6 измерений.

Время отклика — это время, требующееся для того, чтобы аналитическая система пришла в состояние равновесия с определяемым веществом. В данном случае при введении карбендазима в кювету время отклика составляло 1.5 мин, время восстановления составляло 23.5 мин. Таким образом, длительность одного измерения, включающая время отклика и время регенерации, составило 25 мин.

Долговременная стабильность, характеризующая устойчивость работы сенсора в течение длительного периода времени, показала, что ответ был стабильным в течение 30 сут.

Данное исследование позволило создать макет амперометрического биосенсора на основе ИмК штамма актинобактерий *Rhodococcus qingshengii* G1M1 для определения фунгицида карбендазима. Таким образом, *Rhodococcus qingshengii* G1M1 перспективен для деградации и биоконтроля остаточных концентраций этого фунгицида в экологически чистом земледелии.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

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

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них отсутствует конфликт интересов.

#### ВКЛАД АВТОРОВ

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

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Китова А.Е., Кувичкина Т.Н., Аринбасарова А.Ю., Решетиллов А.Н. Деградация 2,4-динитрофенола свободными и иммобилизованными клетками *Rhodococcus erythropolis* HL PM-1 // Прикл. биохим. микробиол. 2004. Т. 40. С. 307–311.
- Kitova A.E., Kuvichkina T.N., Arinbasarova A.Y., Reshetilov A.N. Degradation of 2,4-dinitrophenol by free and immobilized cells of *Rhodococcus erythropolis* HL PM-1 // Appl. Biochem. Microbiol. 2004. V. 40. P. 258–261.
- Кувичкина Т.Н., Будина Д.В., Олькова А.С., Решетиллов А.Н. Оценка присутствия ди-(2-этилгексил)фталата в поливинилхлоридных пластинках масс-спектрометрическим и биосенсорным методами // Теоретическая и прикладная экология. 2015. № 4. С. 11–15.
- Патент на полезную модель 2015. № 156546.
- Belova A.A., Kaparullina E.N., Agafonova N.V., Grouzdev D.S., Kopitsyn D.S., Machulin A.V., Doronina N.V. *Ancylobacter crimeensis* sp. nov., a new species of aerobic methylotrophic bacteria isolated from Oak phyllosphere // Microbiology (Moscow). 2023. V. 92. P. 598–608.
- Fang H., Wang Y., Gao C., Yan H., Dong B., Yu Y. Isolation and characterization of *Pseudomonas* sp. CBW capable of degrading carbendazim // Biodegradation. 2010. V. 21. P. 939–946.
- Pande G. Domian S.J., Russell R.J., Brearley C., Kotsonis S., Cakeshott J.G. Cloning and biochemical characterization of a novel carbendazim (methyl-1H-benzimidazol-2-ylcarbamate)-hydrolyzing esterase from newly isolated *Nocardiodes* sp. strain SG-4G and its potential for use in enzymatic bioremediation // Appl. Environ. Microbiol. 2010. V. 75. P. 2040–2945.
- Singh S., Singh N., Kumar V., Datta S., Wani B., Singh D., Singh K., Singh J. Toxicity, monitoring and biodegradation of the fungicide carbendazim // Environ. Chem. Lett. 2016. V. 14. P. 317–329.
- Xu J.L., He J., Wang Z.C., Wang K., Li W.J., Tang S.K., Li S.P. *Rhodococcus qingshengii* sp. nov., a carbendazim-degrading bacterium // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2007. V. 57. P. 2754–2757.
- Zhang M., Bai X., Li Q., Zhang L., Zhu Q., Gao S., Ke Zh., Jiang M., Hu J., Qiu J., Hong Q. Functional analysis, diversity and distribution of carbendazim hydrolases Mhel and CbMa, responsible for the initial step in carbendazim degradation // Environ. Microbiol. 2022. V. 24. P. 4803–4817.

## ***Rhodococcus qingshengii* GIMm1 as the Basis of a Biosensor for Determination of the Fungicide Carbendazim**

**T. N. Kuvichkina<sup>1</sup>, E. N. Kaparullina<sup>1, \*</sup>, N. V. Doronina<sup>1</sup>, and A. N. Reshetilov<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*G.K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Federal Research Center "Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences", Pushchino, 142290 Russia*  
*\*e-mail: lenokap80@gmail.com*

Received October 13, 2023; revised October 27, 2023; accepted October 28, 2023

**Abstract**—The possible application of *Rhodococcus qingshengii* strain GIMm1, isolated from a Dead Sea clay sample, as the basis of a biosensor for determining the benzimidazole fungicide carbendazim was investigated. High sensitivity of the biosensor under neutral pH and up to 500 mM NaCl at 2 to 160  $\mu$ M carbendazim was maintained for up to 30 days.

**Keywords:** amperometric microbial biosensor, rhodococci, *Rhodococcus qingshengii*, oxygen electrode, carbendazim

УДК 579.222.4

## НОВЫЙ ГАЛОАЛКАЛОФИЛЬНЫЙ ПРЕДСТАВИТЕЛЬ РОДА *SALISEDIMINIBACTERIUM*, СПОСОБНЫЙ ЭФФЕКТИВНО ВОССТАНАВЛИВАТЬ ХРОМАТ

© 2024 г. А. В. Игнатенко<sup>а</sup>, Т. В. Хижняк<sup>а, \*</sup><sup>а</sup>Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, 119071 Россия

\*e-mail: khijniaktv@yandex.ru

Поступила в редакцию 13.10.2023 г.

После исправления 24.10.2023 г.

Принята к опубликованию 26.10.2023 г.

Выделенный новый галоалкалофильный представитель рода *Salisediminibacterium* семейства *Bacillaceae* обладает высокой хромат-восстанавливающей активностью в широком диапазоне условий. Эффективность восстановления достигает более 99% при начальной концентрации 15 мг Cr(VI)/л на минеральных средах и в органических средах при начальной концентрации 100 мг Cr(VI)/л за 3 сут. Показано влияние органического вещества на скорость восстановления хромата. Выделенный штамм MB1000 отличается по физиологическим особенностям от описанных ранее представителей рода *Salisediminibacterium*.

**Ключевые слова:** биоредукция хроматов, *Salisediminibacterium*, щелочные, соленые среды

DOI: 10.31857/S0026365624020091

Хром — ценный поливалентный металл. Основным источником хрома в природе являются ультраосновные магматические породы. Известно порядка 40 хромосодержащих минералов (Николаев и соавт., 2021). В природе стабильными являются трех- и шестивалентная формы хрома (Cr(III) и Cr(VI), соответственно). Соединения Cr(III) малорастворимы и представлены в форме малоподвижного гидроксида (Liang et al., 2021), напротив, шестивалентный хром представлен преимущественно в форме подвижного аниона  $\text{CrO}_4^{2-}$  (Водяницкий, 2009, Bartlett, 1991). Канцерогенный и мутагенный эффект Cr(VI) объясняется его высокой подвижностью и реакционной способностью (Pushkar et al., 2021). По некоторым оценкам, токсичность Cr(VI) в 100–1000 раз выше, чем у Cr(III) (Dhal et al., 2013).

Основными производителями обогащенного феррохрома являются Южная Африка, Индия, Казахстан, Китай, Турция; на их долю приходится более 80% мировой добычи хромовой руды (Высоцкий, 2006). Широкое использование хрома в металлургической, кожевенной и химической промышленности сопряжено с образованием различных отходов. Годовой выброс хромосодержащих отходов достигает в Европе —  $420 \times 10^3$ , Азии —  $370 \times 10^3$  и в Северной Америке —  $290 \times 10^3$  т Cr/год (Водяницкий, 2009). Большинство методов очистки отходов основаны на реакции восстановления Cr(VI) до Cr(III) с последующим

осаждением с щелочами. Однако существующие химические и электрохимические методы очистки эффективны только в условиях высоких концентраций хрома, дорогостоящи и требуют повышенного внимания к образующимся продуктам очистки (Barrera-Diaz et al., 2012). Методы биоочистки являются перспективным направлением (Pradhan et al., 2017). Способность к восстановлению хроматов отмечается преимущественно у *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* (Huang et al., 2017). Большинство исследований охватывают условия pH, близкие к нейтральным, и с малой соленостью. Поиск организмов, способных проводить реакцию восстановления Cr(VI) в щелочных соленых условиях, характерных для гальванических и кожевенных производств, является актуальной задачей на сегодняшний день.

В настоящей работе представлены результаты исследования фенотипических свойств, таксономического положения и особенностей восстановления токсичного хромата штамма *Salisediminibacterium* MB1000.

Штамм MB1000 новой галоалкалофильной хроматредуцирующей бактерии был выделен из накопительной культуры нитратредуцирующих бактерий, инокулятом служили осадки содовых озер Кулундинской степи на минеральной среде с нитратом в аэробных условиях. Последующее разделение



культур проводили в анаэробных условиях методом предельных разведений на жидкой модифицированной среде ЛБ\* состава (г/л):  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  — 6.5;  $\text{NaHCO}_3$  — 2;  $\text{NaCl}$  — 25;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  — 0.5;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  — 0.1;  $\text{NH}_4\text{Cl}$  — 0.1; дрожжевой экстракт — 0.1; среда LB BD (USA) — 15;  $\text{K}_2\text{CrO}_4$  — 3.8; ацетат натрия — 1. Далее штамм MB1000 поддерживали на минеральной среде без нитрата в аэробных условиях в среде состава (г/л):  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  — 13;  $\text{NaHCO}_3$  — 4;  $\text{NaCl}$  — 50;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  — 0.5;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  — 0.1;  $\text{NH}_4\text{Cl}$  — 0.1; дрожжевой экстракт — 0.1; ацетат натрия — 1.

Для определения филогенетического положения штамма MB1000 было проведено частичное секвенирование гена 16S рРНК (ЦКП “Биоинженерия”, ФИЦ Биотехнологии РАН) с универсальными праймерами 11f и 357f. Анализ полученной последовательности (933 п.н.) проведен в базе данных NCBI. Последовательность выделенного штамма была выровнена с соответствующими последовательностями ближайших видов с помощью программы Mafft v.7 (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/index.html>). Построение филогенетического дерева реализовано в программе MegaB.

Световую микроскопию с фазовым контрастом проводили на микроскопе Olimpus BX41, оборудованном фотоаппаратурой. Электронную микроскопию проводили на просвечивающем электронном микроскопе JEM-1400 (“Jeol”, Япония) с приставкой для рентгеновского микроанализа.

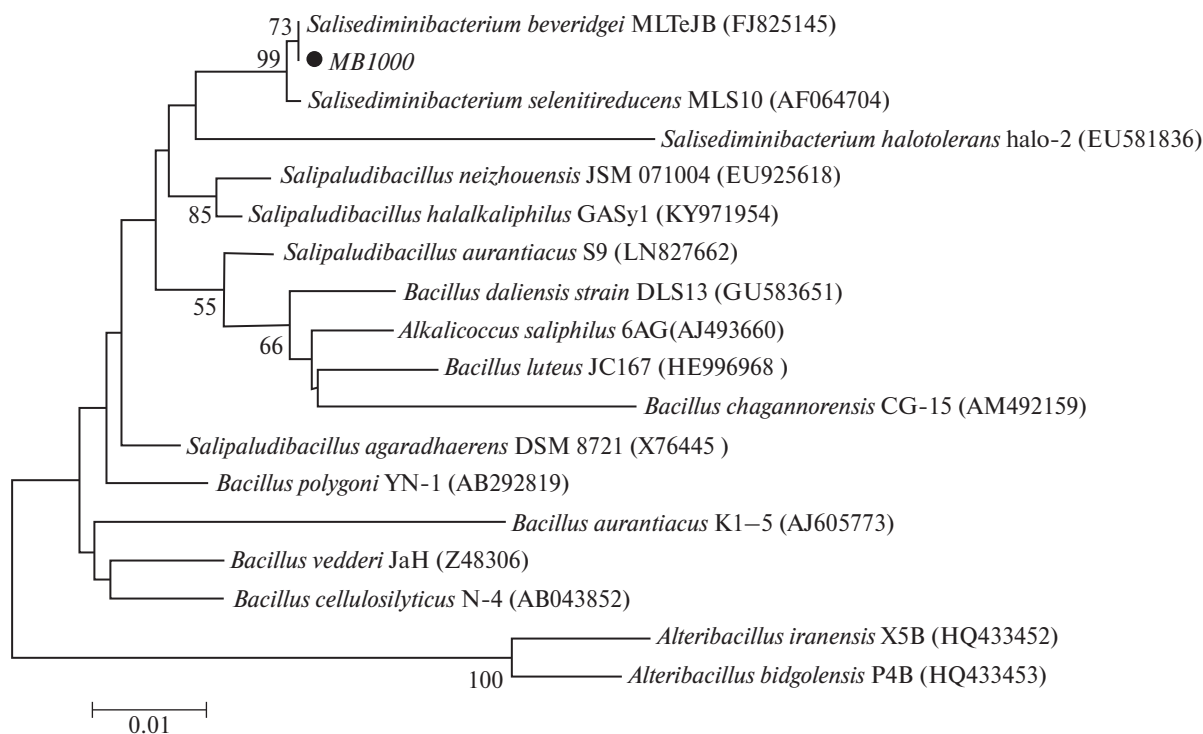
Количество биомассы определяли, измеряя оптическую плотность раствора при длине волны 600 нм на спектрофотометре Eppendorf BioSpectrometr basic.

Определение концентрации Cr(III) в формирующемся в процессе культивирования осадке определяли путем растворения осадка в 2н HCl с образованием окрашенных комплексов общей формулой  $[\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_6]\text{Cl}_3$ . Светопоглощение измеряли при длине волны 580 нм.

Определение концентрации Cr(VI) проводили дифенилкарбазидным методом (Лаврухина, Юкина, 1979) с изменениями (Шаповалова и соавт., 2009).

Эксперимент по установлению предельно допустимой концентрации хрома проводили на минеральных средах стандартного состава с разным количеством дрожжевого экстракта (50, 500 и 2500 мг/л) и концентрацией хрома — 15, 30, 70 и 120 мг Cr(VI)/л. На среде ЛБ\* проверена возможность восстановления Cr(VI) в аэробных и анаэробных условиях с добавлением 100, 500 и 2000 мг Cr(VI)/л. В аэробном эксперименте посев проводили в пенициллиновые флаконы на 20 мл под ватную пробку. Анаэробные условия создавали путем вакуумирования и продувки аргоном пенициллиновых флаконов на 20 мл, герметично закрытых резиновыми пробками.

Мультисубстратное тестирование с использованием различных органических доноров электронов проведено анаэробно для лактата, ацетата,



**Рис. 1.** Положение штамма MB1000 на филогенетическом древе представителей семейства *Bacillaceae*. Филогенетическое древо построено методом ближайших соседей (Neighbour-Joining) с использованием бутстреп-анализа на 100 альтернативных филогенетических деревьях. Значения бутстреп-анализа меньше 50% скрыты.

сахарозы и глицерина, в концентрации 1 г/л на минеральной среде. Исходная концентрация Cr(VI) — 50 мг/л. Также возможность восстановления была проверена для следующих анионов — нитрата, ванадата, селенита и хромата на минеральной среде в анаэробных условиях с ацетатом (1 г/л). Исходная концентрация нитрата — 1 г/л. Для остальных металлов концентрация — 50 мг Me/л. Объем среды во всех экспериментах составлял 10 мл. Объем посевного материала, предварительно культивированного 2–4 сут на минеральной среде — 0.1 мл. Культивирование проводили при 30°C в статичных условиях. Все эксперименты выполнены в 3-х кратной повторности. В качестве контроля использовали среды со всеми добавками без бактерий (химический контроль) или с бактериями, но без донора/акцептора электронов (биологический контроль).

Клетки выделенного штамма MB1000 подвижные, имеют палочковидную форму (0.5–0.6 × 2.3–2.7 мкм), в присутствии хромата в среде образуют биопленку. Проведенный филогенетический анализ показал, что штамм MB1000 относится к роду *Salisediminibacterium* семейства *Bacillaceae*. Согласно результатам сравнения нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК с базой данных NCBI Blast, наибольший уровень сходства на основании нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК установлен с *Salisediminibacterium beveridgei* (сходство нуклеотидной последовательности 99.46%) (Baesman et al., 2009) и *Salisediminibacterium selenitireducens* 98.71% (Blum et al., 1998) (рис. 1).

Культивирование на минеральных средах с различным содержанием дрожжевого экстракта и Cr(VI) в анаэробных условиях показало, что с увеличением концентрации органического вещества в среде увеличивается скорость и эффективность процесса восстановления хроматов. Также увеличивается значение максимальной концентрации Cr(VI) в среде, при которой идет активный рост штамма MB1000. Так, на минеральной среде, содержащей 100 мг дрожжевого экстракта, штамм

MB1000 восстанавливал до 99.9% от исходных 15 мг Cr(VI)/л и до 37.5, 30.4 и 7.9% от исходных 30, 70 и 120 мг Cr(VI)/л за 3 сут. В то же время, при концентрации дрожжевого экстракта 2500 мг/л выделенный штамм восстанавливает до 87.7, 99.9, 99.4 и 74.9% Cr(VI) от исходных 15, 30, 70 и 120 мг Cr(VI)/л за 3 сут, соответственно. На среде, содержащей 500 мг дрожжевого экстракта, полученные промежуточные значения восстановительной активности.

При сравнении роста и восстановительной активности штамма MB1000 на среде ЛБ\* в аэробных и в анаэробных условиях показано, что при начальной концентрации 100 и 500 мг Cr(VI)/л за 3 сут восстанавливается до 99.7 и 20.8% Cr(VI) в анаэробных условиях и до 98.4 и 47.7% в аэробных, соответственно. При начальной концентрации 2000 мг Cr(VI)/л за 2 месяца культивирования восстанавливается 14.9% Cr(VI) в анаэробных условиях и 79.5% в аэробных.

В результате мультисубстратного тестирования показана возможность роста штамма MB1000 на лактате, ацетате, сахарозе и глицерине в качестве единственного донора электрона и хромате в качестве акцептора. При этом восстанавливается до 50.3, 32.1, 99.8, 56.4% от исходных 50 мг Cr(VI)/л в минеральной среде в анаэробных условиях. В анаэробных условиях штамм MB1000 способен использовать в качестве акцептора электронов, помимо хромата, также ванадат, нитрат и селенит в присутствии ацетата.

В процессе культивирования штамма MB1000 на средах с хромом на дне пенициллиновых флаконов накапливается органоминеральный осадок серо-фиолетового цвета. Последовательное 4-х кратное низкоскоростное центрифугирование (200 g, 5–10 с) позволяет частично разделить осадок на компоненты: биомассу (остающуюся во взвешенном состоянии) и минеральный осадок. Результаты рентгеновского микроанализа показывают значительное содержание хрома в минеральной фракции осадка (рис 2.).

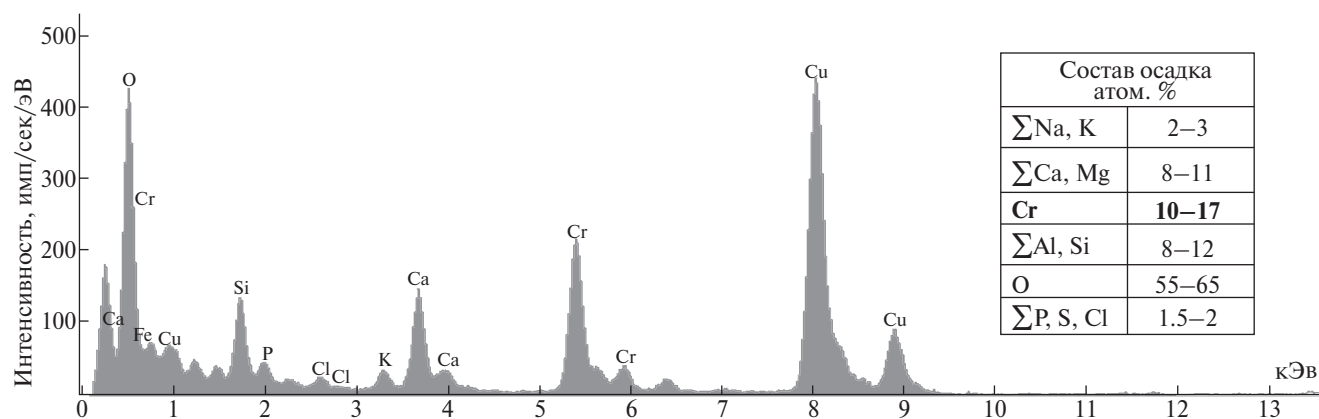


Рис. 2. Рентгеновский микроанализ минерального осадка.

При растворении этого осадка в 2н HCl образуется окрашенный голубовато-зеленый раствор. Спектрофотометрический анализ показывает, что полученный раствор имеет максимумы поглощения при длине волны 324, 418 и 528 нм. Пики при 418 и 528 нм соответствуют максимумам поглощения химически чистого раствора  $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , что подтверждает локализацию восстановленного Cr(III) в минеральной фракции образующегося осадка.

Таким образом, выделенный из щелочных осадков штамм MB1000 является факультативно анаэробным галоалкалофильным хемогетеротрофом. Ранее описанные представители рода *Salisediminibacterium* были выделены из осадков щелочных водоемов — *S. selenitireducens* MLS10 и *S. beveridgei* MLTejB из Mono Lake (США), *S. halotolerans* halo-2 из Xiarinaoer lake (Китай), *S. haloalkalitolerans* 10nlg Lonar lake (Индия) и 7 штаммов *S. locisalis* из содовых озер Chagannor (Китай), Natron (Танзания), Elmenteita (Кения) (Márquez et al., 2011; Gupta et al., 2020). Специфической особенностью штамма MB1000 является рост на хромате в анаэробных условиях на соленых щелочных минеральных и органических средах. Штамм *S. beveridgei* MLTejB на хромате не растет, а в случае остальных штаммов это свойство не проверялось. Таким образом, эта способность впервые выявлена у представителей рода *Salisediminibacterium*. Штамм MB1000 способен расти на нитрате (как и *S. selenitireducens*, *S. beveridgei*, *S. haloalkalitolerans*), селените (как и *S. selenitireducens*, *S. beveridgei*) и ванадате (для всех остальных не проверялось). Полученные результаты дают предпосылки к использованию выделенного организма для биоочистки сточных вод гальванических и некоторых химических производств в условиях высокой щелочности, солёности и сложного непостоянного состава среды.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Водяницкий Ю.Н.* Тяжелые и сверхтяжелые металлы и металлоиды в загрязненных почвах. М.: ГНУ Почвенный институт им. В.В. Докучаева Россельхозакадемии, 2009. 95 с.
- Высоцкий Э.А., Губин В.Н., Илькевич Г.И., Штефан Л.В.* Геология металлических полезных ископаемых: учебное пособие для студентов вузов. Минск: ТетраСистемс, 2006. 336 с.
- Лаврухина А.К., Юкина Л.В.* Аналитическая химия хрома. М.: Наука, 1979. 219 с.
- Николаев В.И., Казеннова А.Д., Никольская Н.Е., Сергеев Н.С., Самков В.С., Долгушин С.С., Сержантов Н.Ф.* Хромитоносные провинции и месторождения хромовых руд России // Минеральное сырье. 2021. № 43. М.: ВИМС, 2021. С. 185.
- Шановалова А.А., Хижняк Т.В., Турова Т.П., Сорокин Д.Ю.* Новая денитрифицирующая факультативно галоалкалофильная бактерия *Halomonas chromatireducens* sp. nov. из содовых солончаков, способная к аэробному восстановлению хромата // Микробиология. 2009. Т. 78. С. 117–127.
- Baerman S.M., Stolz J.F., Kulp T.R., Oremland R.S.* Enrichment and isolation of *Bacillus beveridgei* sp. nov., a facultative anaerobic haloalkaliphile from Mono Lake, California, that respire oxyanions of tellurium, selenium, and arsenic // Extremophiles. 2009. V. 13. P. 695–705.
- Barrera-Diaz C.E., Lugo-Lugo V., Bilyeu B.* A review of chemical, electrochemical and biological methods for aqueous Cr(VI) reduction // J. Hazard. Mater. 2012. V. 223–224. P. 1–12.
- Bartlett R.J.* Chromium cycling in soils and water: links, gaps, and methods // Environ. Health Perspect. 1991. V. 92. P. 17–24.
- Blum J.S., Bindi A.B., Buzzelli J., Stolz J.F., Oremland R.S.* *Bacillus arsenicoselenatis*, sp. nov., and *Bacillus selenitireducens*, sp. nov.: two haloalkaliphiles from Mono Lake, California that respire oxyanions of selenium and arsenic // Arch. Microbiol. 1998. V. 171. P. 19–30.
- Dhal B., Thatoi H.N., Das N.N., Pandey B.D.* Chemical and microbial remediation of hexavalent chromium from contaminated soil and mining/metallurgical solid waste: a review // J. Hazard. Mater. 2013. V. 250–251. P. 272–291.
- Gupta R.S., Patel S., Saini N., Chen S.* Robust demarcation of 17 distinct *Bacillus* species clades, proposed as novel *Bacillaceae* genera, by phylogenomics and comparative genomic analyses: description of *Robertmurraya kyonggiensis* sp. nov. and proposal for an emended genus *Bacillus* limiting it only to the members of the Subtilis and Cereus clades of species // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2020. V. 70. P. 5753–5798.
- Huang Y., Feng H., Lu H., Zeng Y.* A thorough survey for Cr-resistant and/or — reducing bacteria identified comprehensive and pivotal taxa // In. Biodeter. Biodegr. 2017. V. 117. P. 22–30.

- Liang J., Huang X., Yan J., Li Y., Zhao Z., Liu Y., Ye J., Wei Y. A review of the formation of Cr(VI) via Cr(III) oxidation in soils and groundwater // *Sci. Total Environ.* 2021. V. 774. Art. 145762.
- Márquez M.C., Carrasco I.J., de la Haba R.R., Jones B.E., Grant W.D., Ventosa A. *Bacillus locisalis* sp. nov., a new haloalkaliphilic species from hypersaline and alkaline lakes of China, Kenya and Tanzania // *Syst. Appl. Microbiol.* 2011. V. 34. P. 424–428.
- Pushkar B., Sevak P., Parab S., Nilkanth N. Chromium pollution and its bioremediation mechanisms in bacteria: a review // *J. Environ. Manage.* 2021. V. 287. Art. 112279.

---

---

**SHORT COMMUNICATIONS**

---

---

## A New Haloalkaliphilic Member of the Genus *Salisediminibacterium* Capable of Efficient Chromate Oxidation

A. V. Ignatenko<sup>1</sup>, and T. V. Khijniak<sup>1</sup>, \*

<sup>1</sup>*Winogradsky Institute of Microbiology, Research Center of Biotechnology,  
Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

\*e-mail: khijniaktv@yandex.ru

Received October 13, 2023; revised October 24, 2023; accepted October 26, 2023

**Abstract**—A new haloalkaliphilic member of the genus *Salisediminibacterium* (family *Bacillaceae*) with high chromate-reducing activity in a broad range of conditions was isolated. Reduction efficiency after 3 days was up to 99% at initial Cr(VI) concentrations 15 and 100 mg/L for mineral and organic media, respectively. Effect of organic matter on the rate of chromate reduction was shown. The isolate MB1000 differed from the presently described members of the genus *Salisediminibacterium* in its physiological characteristics.

**Keywords:** chromate bioreduction, *Salisediminibacterium*, alkaline and saline media



## БИОПЛЕНКИ СО СТЕН КАПОВОЙ ПЕЩЕРЫ КАК ИСТОЧНИК ПРОДУЦЕНТОВ ГИДРОЛАЗ

© 2024 г. У. Курди<sup>а</sup>, Г. Ю. Яковлева<sup>а, \*</sup>, О. Н. Ильинская<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, 420008 Россия

\*e-mail: yakovleva\_galina@mail.ru

Поступила в редакцию 13.10.2023 г.

После доработки 26.10.2023 г.

Принята к публикации 28.10.2023 г.

Современные исследования бактериальных сообществ экстремальных экосистем в основном направлены на анализ биоразнообразия микроорганизмов методами молекулярной биологии. Культивируемые бактерии карстовых пещер представляют собой уникальную группу микроорганизмов, биохимический потенциал которых мало изучен. В настоящей работе с биопленок на стенах Каповой пещеры (заповедник “Шульган-Таш”, Башкортостан) выделены и охарактеризованы бактерии с целью оценки способности идентифицированных изолятов к продукции внеклеточных гидролитических ферментов. Большинство выделенных бактерий (89%) являются представителями филума *Proteobacteria*, остальные относятся к филумам *Actinobacteria*, *Firmicutes* и *Bacteroidetes*, на которые приходится 5, 4 и 2% изолятов, соответственно. Штаммы с высоким уровнем активности секретируемых протеаз, РНКаз и амилаз, были идентифицированы как *Stenotrophomonas rhizophila*, *Lysinibacillus fusiformis* и *Pseudomonas stutzeri*, соответственно.

**Ключевые слова:** карстовая пещера, биоразнообразие, культивируемые бактерии, РНКазы, протеаза, амилаза

DOI: 10.31857/S0026365624020101

Пещера Шульган-Таш, или Капова, известна в мире благодаря наскальным рисункам, относящимся к Верхнему палеолиту (рис. 1).

Как молекулярные, так и традиционные методы культивирования, примененные к анализу структуры бактериального сообщества этой пещеры, позволили идентифицировать представителей фил *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Nitrospirae*, *Bacteroidetes*, *Verrucomicrobia* и *Acidobacteria*, а также выделить новые штаммы *Pseudomonas* (Galimzianova et al., 2020). Изучение биоразнообразия карстовых пещер служит отправной точкой для поиска полезных микробных метаболитов, имеющих перспективы практического использования. Секретируемые ферменты микроорганизмов широко используются в промышленности, сельском хозяйстве и медицине. Протеазы широко используются в пищевой, кожевенной и кормовой промышленности, а также в производстве моющих средств (Abdul Razzaq et al., 2019). Амилаза занимает примерно 25% мирового рынка ферментов (Reddy et al., 2007). Амилазы широко используются в хлебопекарной, пивоваренной, алкогольной промышленности и других пищевых технологиях (Gopinath et al., 2017). Внеклеточные бактериальные РНКазы, обладающие значительным потенциалом в качестве противовирусных

(Ilinskaya, Shah-Mahmud, 2014; Shah Mahmud et al., 2017, 2018) и противоопухолевых средств (Mitkevich et al., 2015; Ilinskaya et al., 2016; Surchenko et al., 2020), являются перспективными агентами для медицины.

Целью настоящей работы было охарактеризовать культивируемое бактериальное сообщество, собранное путем соскоба видимых колоний или биопленок со стен Каповой пещеры, и оценить способность изолятов синтезировать секретируемые гидролитические ферменты, а именно РНКазы, протеазы и амилазы.

Сообщества, отобранные с семи образцов видимых колоний или биопленок со стен разных участков пещеры, культивировали на жидких средах Лурия–Бертани (LB), Ризонера 2А (R2A) и Гаузе. Для выделения отдельных бактерий использовали как глубинные, так и поверхностные посева. Чистые культуры идентифицировали на основании секвенирования гена 16S рРНК (области V3–V4). Полученные последовательности сравнивали с геномной базой данных Национального центра биологической информации (NCBI) с использованием алгоритма BLAST для нуклеотидов (BLASTn) (Zhanget al., 2000).

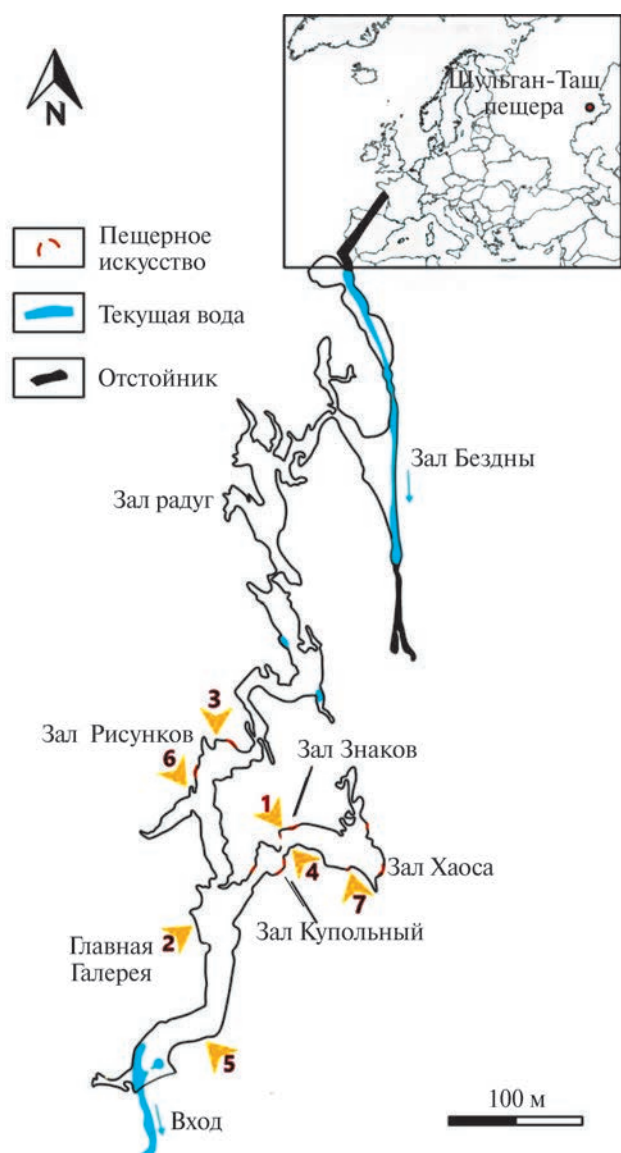


Рис. 1. Карта пещеры Шульган-Таш с обозначением мест отбора образцов для исследования.

Скрининг бактерий на способность синтезировать секретируемые рибонуклеолитические, протеолитические и амилолитические ферменты проводили на следующих синтетических средах, соответственно: (а) — бесфосфорная среда, рН 8.5, г/л: Трис — 6.05; КСl — 5.0; NaCl — 1.0; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> — 2.0; Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub> — 1.0; MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O — 2.0; агар — 20.0. Перед инокуляцией в среду добавляли 40% глюкозу (12.5 мл/л) и дрожжевую РНК (“Вектор”, Новосибирск, Россия) до конечной концентрации 5 мг/мл. (б) — среда, содержащая (г/л): дрожжевой экстракт — 5.0; казеин — 5.0; NaCl — 5.0; агар-агар — 20.0; (в) — мясопептонный агар с 0.8% крахмала.

Изоляты выращивали на чашках Петри с вариантами сред (а, б, в) в течение 18 ч при 30°C. Активность гидролаз оценивали путем измерения зон просветления вокруг колоний, выращенных

на соответствующем субстрате (РНК, казеин, крахмал) после заливки чашек 5% раствором 1н НСl (среда а), трихлоруксусной кислоты (среда б) и раствором Люголя (среда в) для визуализации зон гидролиза. Коэффициент гидролазной активности изолята рассчитывали как соотношение радиуса колонии, включая зону прозрачности вокруг нее, к радиусу самой колонии. Согласно методике определения уровня активности гидролаз, коэффициент ферментативной активности, равный единице, отражает отсутствие активности, поскольку в этом случае колония изолята не образует вокруг зоны лизиса субстрата. Коэффициент со значением больше единицы отражает активность секретируемого фермента. Изоляты с самой высокой метаболической активностью были отобраны для дальнейшего секвенирования полноразмерного гена 16S рРНК.

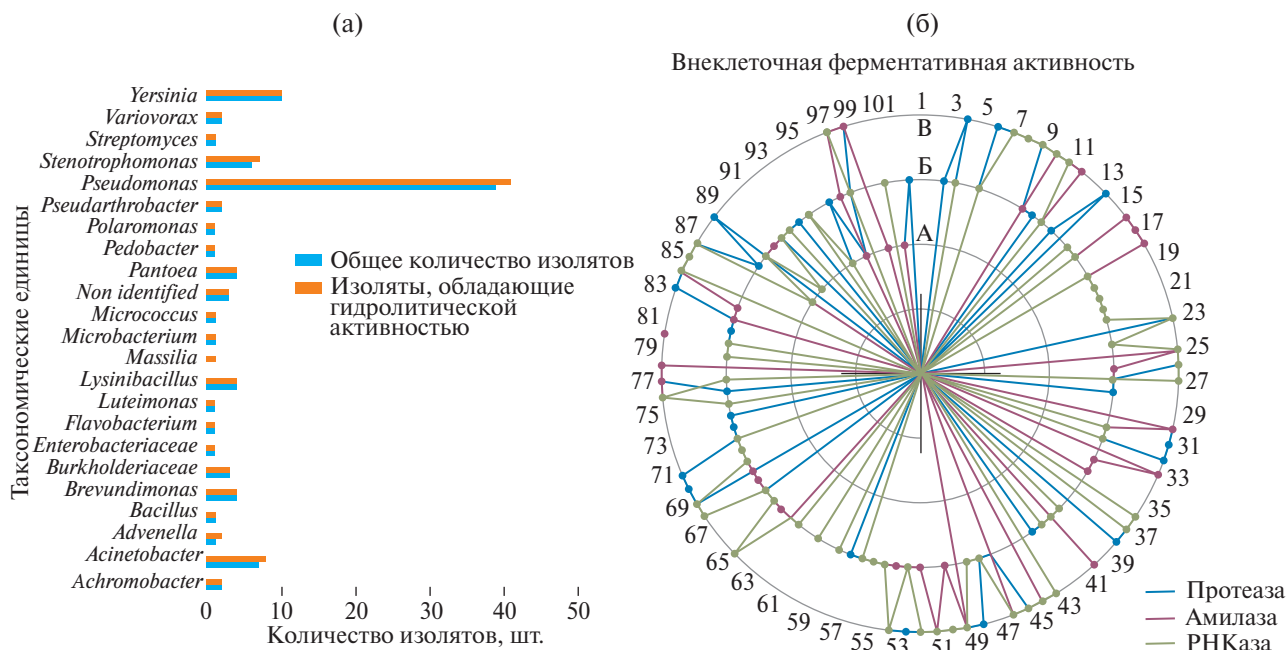
Анализ альфа-разнообразия культивируемых бактерий в биопленках показал, что образец 7 обладает наибольшим таксономическим разнообразием, а образцы 2 и 3 — наименьшим (табл. 1).

99 из 102 бактерий были идентифицированы до уровня рода или семейства. Большинство выделенных бактерий (89%) оказались представителями филума *Proteobacteria*, тогда как остальные изоляты разделились между тремя другими филумами, а именно *Actinobacteria*, *Firmicutes* и *Bacteroidetes*, на которые пришлось 5, 4 и 2% изолятов, соответственно. Два изолята были идентифицированы только на уровне семейства как *Burkholderiaceae* и *Enterobacteriaceae* (рис. 2а). Количественно (42 изолята) преобладали представители рода *Pseudomonas*.

Разнообразие бактериальных сообществ активно изучается в пещерах Австралии, Китая, Италии, Испании и Турции (Holmes et al., 2001; Schabereiter-Gurtner et al., 2004; Zhou et al., 2007; Ahamada Rachid, Doğruöz Güngör, 2023; Leuko et al., 2017). В большинстве этих пещер выявлено присутствие девяти групп доминантных бактерий: *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Planctomycetes*, *Chloroflexi*, *Bacteroidetes*, *Gemmatimonadetes*, *Firmicutes*, *Nitrospirae*, *Actinobacteria*, а также *Archaea*. Преобладание представителей филума *Proteobacteria* зафиксировано также и в Каповой пещере.

Установлено, что 6 изолятов вообще не секретировали гидролазы, тогда как 73 изолята проявили протеазную активность, 57 изолятов — амилазную активность и 71 изолят — внеклеточную РНКазную активность, а 39 изолятов обладали всеми тремя внеклеточными ферментативными активностями (рис. 2б).

Самой высокой протеазной активностью обладали представители родов *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Bacillus*, *Acinetobacter* и *Yersinia*. Изоляты родов *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Yersinia*, *Acinetobacter*, *Lysinibacillus*, *Polaromonas* и *Caulobacter* показали наибольший уровень активности



**Рис. 2.** Количество идентифицированных бактериальных изолятов (а) и их гидролитическая активность (б). На рисунке (а): \* — изолят определен только до уровня семейства; на рисунке (б) — номера изолятов указаны по окружности; А — значение коэффициента ферментативной активности равно 1.0, Б — равно 1.5, В — равно 2.0.

РНКаза, а родов *Pseudomonas*, *Serratia*, *Yersinia* и *Acinetobacter* — амилазы.

Изолят с самой высокой протеазной активностью (изолят 7) был идентифицирован как *Stenotrophomonas rhizophila*, изолят с самой высокой РНКазной активностью (номер 27) — как *Lysinibacillus fusiformis*, изолят с самой высокой амилазной активностью (номер 1) — как *Pseudomonas stutzeri*. Ранее сообщалось о способности

*Stenotrophomonas rhizophila* секретировать протеазы (Lich et al., 2022), *Pseudomonas stutzeri* — амилазу (Schmidt et al., 1979). Секретируемая РНКазы *Lysinibacillus fusiformis* обнаружена впервые.

Результаты проведенных исследований согласуются с данными литературы, подтверждающими доминирование представителей филума *Proteobacteria* в сообществах культивируемых бактерий, изолированных в карстовых пещерах, и открывают

**Таблица 1.** Таксономическое разнообразие культивируемых бактерий внутри сообществ со стен Каповой пещеры

№ образца	Число изолятов	R	Индекс Шеннона-Винера	Место отбора биопленок	Морфотип биопленок со стен Каповой пещеры
1	15	4	1.285	1 этаж, зал Знаков, северо-западная стена	Белые, шаровидные
2	9	2	0.678	1 этаж, низ колодца, западная стена	Белые, плоские с волнистым краем
3	11	2	0.678	2 этаж, арка зала Рисунков	Бежевые выпуклые
4	13	3	0.798	1 этаж, начало зала Знаков, южная стена	Беловато-желтые коралловидные
5	8	2	0.697	1 этаж, зал Сталагмитовый	Синие-оливковые крупнозернистые
6	26	6	1.36	2 этаж, начало Большого западного тупика	Оливковые крупнозернистые
7	17	6	1.61	1 этаж, зал Купольный, восточная стена	Коричневые с белой обводкой

Примечание. Индексы альфа-разнообразия: R – количество таксонов; индекс Шеннона-Винера – равномерность распределения таксономических единиц.



перспективы использования активных продуцентов гидролитических ферментов в практических целях.

### БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена с использованием оборудования Центров Программы стратегического академического лидерства КФУ (Приоритет-2030).

### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование поддержано грантом РФФ № 22-24-00036.

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований с использованием животных.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Галимзянова Н.Ф., Гильванова Е.А., Рябова А.С., Гуватова З.Г., Кудрявцева А.В., Мелентьев А.И. Филогенетическое разнообразие прокариотов в микробных сообществах скальных поверхностей пещеры Шульган-Таш (Капова), южный Урал // Экобиотех. 2020. Т. 3. № 3. С. 298–304.

Ahamada Rachid N., Doğruöz Güngör N. Major impacts of caving activities on cave microbial diversity: case study of Morca Cave, Turkey // Int. Microbiol. 2023. V. 26. P. 179–190.

Gopinath S.C., Anbu P., Arshad M.K., Lakshmi Priya T., Voon C.H., Hashim U., Chinni S.V. Biotechnological processes in microbial amylase production // Biomed. Res. Int. 2017. Art. 1272193. <https://doi.org/10.1155/2017/1272193>

Holmes A.J., Tujula N.A., Holley M., Contos A., James J.M., Rogers P., Gillings M.R. Phylogenetic structure of unusual aquatic microbial formations in Nullarbor caves, Australia // Environ. Microbiol. 2001. V. 3. P. 256–264.

Ilinskaya O.N., Shah-Mahmud R.S. Ribonucleases as antiviral agents // Mol. Biol. 2014. V. 48. P. 615–623.

Ilinskaya O.N., Singh I., Dudkina E., Ulyanova V., Kayumov A., Barreto G. Direct inhibition of oncogenic KRAS by *Bacillus*

*pumilus* ribonuclease (binase) // Biochim. Biophys. Acta. 2016. V. 1863 (7 Pt A). P. 1559–1567.

Leuko S., Koskinen K., Sanna L., D'Angeli I.M., De Waele J., Marcia P., Moissl-Eichinger C., Rettberg P. The influence of human exploration on the microbial community structure and ammonia oxidizing potential of the Su Bentu limestone cave in Sardinia, Italy // PLoS One. 2017. V. 12. Art. e0180700.

Lich N.Q., Thao T.T.P., Huy N.D. Characterization of extracellular protease from *Stenotrophomonas rhizophila* MT1 isolated from aquaculture sludge waste // Appl. Ecol. Environ. Res. 2022. V. 20. P. 2409–2423.

Mitkevich V.A., Pace C.N., Koschinski A., Makarov A.A., Ilinskaya O.N. Cytotoxicity mechanism of the RNase Sa cationic mutants involves inhibition of potassium current through Ca<sup>2+</sup>-activated channels // Mol. Biol. 2015. V.49. P. 933–938.

Reddy L., Wee Y.-J., Yun J.-S., Ryu H.-W. Optimization of alkaline protease production by batch culture of *Bacillus* sp. RKY3 through Plackett–Burman and response surface methodological approaches // Bioresour. Technol. 2008. V. 99. P. 2242–2249.

Schabereiter-Gurtner C., Saiz-Jimenez C., Piñar G., Lubitz W., Rölleke S. Phylogenetic diversity of bacteria associated with Paleolithic paintings and surrounding rock walls in two Spanish caves (Llonin and La Garma) // FEMS Microbiol. Ecol. 2004. V. 47. P. 235–247.

Schmidt J., John M. Starch metabolism in *Pseudomonas stutzeri*. I. Studies on maltotetraose-forming amylase // Biochim. Biophys. Acta. 1979. V. 566. P. 88–99.

Shah Mahmud R., Mostafa A., Müller C., Kanrai P., Ulyanova V., Sokurenko Y., Dzieciolowski J., Kuznetsova I., Ilinskaya O., Pleschka S. Bacterial ribonuclease binase exerts an intra-cellular anti-viral mode of action targeting viral RNAs in influenza a virus-infected MDCK-II cells // Virol. J. 2018. V. 15. Art. 5.

Shah Mahmud R., Müller C., Romanova Y., Mostafa A., Ulyanova V., Pleschka S., Ilinskaya O. Ribonuclease from *Bacillus* acts as an antiviral agent against negative- and positive-sense single stranded human respiratory RNA viruses // Biomed. Res. Int. 2017. Art. 5279065.

Surchenko Y.V., Dudkina E.V., Nadyrova A.I., Ulyanova V.V., Zelenikhin P.V., Ilinskaya O.N. Cytotoxic potential of novel bacillary ribonucleases balnase and balifase // BioNanoSci. 2020. V. 10. P. 409–415.

Zhang Z., Schwartz S., Wagner L., Miller W. A greedy algorithm for aligning DNA sequences // J. Comput. Biol. 2000. V. 7. P. 203–214.

Zhou J.P., Gu Y.Q., Zou C.S., Mo M.H. Phylogenetic diversity of bacteria in an earth-cave in Guizhou province, southwest of China // J. Microbiol. 2007. V. 45. P. 105–112.



## Biofilms from the Kapova Cave Walls as a Source of Hydrolase Producers

W. Kurdy<sup>1</sup>, G. Yu. Yakovleva<sup>1, \*</sup>, and O. N. Ilyinskaya<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, 420008 Russia

\*e-mail: yakovleva\_galina@mail.ru

Received October 13, 2023; revised October 26, 2023; accepted October 28, 2023

**Abstract**—The studies of bacterial communities from extreme niches are presently aimed mainly at analyzing the biodiversity of microorganisms using molecular biology methods. Cultivated bacteria from karst caves represent a unique group of microorganisms, the biochemical potential of which has been poorly studied. In the present work, bacteria from biofilms on the walls of the Kapova Cave (Shulgan-Tash Nature Reserve, Bashkortostan) were isolated and characterized in order to assess the ability of identified isolates to produce extracellular hydrolytic enzymes. Most of the isolates (89%) were members of the phylum *Proteobacteria*, with the remaining ones belonging to the phyla *Actinobacteria*, *Firmicutes*, and *Bacteroidetes*, which accounted for 5, 4, and 2% of the isolates, respectively. Strains with high levels of secreted protease, RNase, and amylase activity were identified as *Stenotrophomonas rhizophila*, *Lysinibacillus fusiformis*, and *Pseudomonas stutzeri*, respectively.

**Keywords:** karst cave, biodiversity, cultivated bacteria, RNase, protease, amylase

## БИОГЕОГРАФИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ СООБЩЕСТВ ПЛАНКТОНА И БЕНТОСА ОЗ. ХУБСУГУЛ (МОНГОЛИЯ)

© 2024 г. О. И. Белых<sup>a, \*</sup>, А. Ю. Краснопеев<sup>a</sup>, Е. Г. Сорокикова<sup>a</sup>, С. А. Потапов<sup>a</sup>, Н. Жадамба<sup>a, b</sup>, Т. И. Белых<sup>c</sup>, И. В. Тихонова<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Лимнологический институт СО РАН, Иркутск, 664033, Россия

<sup>b</sup>Институт Биологии Академии наук Монголии, Улан-Батор, 13330, Монголия

<sup>c</sup>Байкальский государственный университет, Иркутск, 664074, Россия

\*e-mail: belykh@lin.irk.ru

Поступила в редакцию 14.10.2023 г.

После доработки 27.10.2023 г.

Принята к публикации 01.11.2023 г.

Бактериопланктон оз. Хубсугул имеет существенные различия с таковым крупных древних и олиготрофных водоемов. При этом наибольшая близость отмечена между микробиомами Хубсугула и Байкала — озер, расположенных в одной рифтовой зоне и связанных общей речной системой, что подчеркивает сходство микробиомов на региональном уровне. В глобальном аспекте наибольшую достоверную значимость при биогеографическом распределении микробных сообществ имела географическая зональность, наименьшую — глубинная. Трофический статус водоемов, как и древность происхождения, не влияли на кластеризацию микробиомов, на локальном и региональном уровнях большую роль играет фактор сезонности.

**Ключевые слова:** озеро Хубсугул, Монголия, микробиомы, древние олиготрофные озера, биогеография, Байкал, Танганьика

DOI: 10.31857/S0026365624020117

Хубсугул — крупное олиготрофное озеро — расположено на севере Монголии на юго-западном фланге Байкальской рифтовой зоны. Хубсугул занимает 16 место по площади среди пресных озер Земли, являясь вторым по площади и самым глубоким озером в Монголии. Его площадь достигает 2760 км<sup>2</sup>, объем заключенной воды — 381 км<sup>3</sup>, средняя глубина — 138 м. Хубсугул принадлежит к наиболее древним озерам Земли, возраст осадочно-го чехла впадины озера оценивается в 5.5 млн лет. Климат региона резко континентальный, средняя годовая температура воздуха отрицательная –4°C (Атлас оз. Хубсугул, 1989; The geology, biodiversity..., 2006). Несмотря на удаленность и труднодоступность озера, первые данные о фитопланктоне Хубсугула появились еще в начале XX века (Атлас оз. Хубсугул, 1989; The geology, biodiversity..., 2006). Численность бактериопланктона была определена во время экспедиций Иркутского и Монгольского университетов (1959–1960, 1971–1986 гг.). Недавно с помощью микроскопии и высокопроизводительного секвенирования получены новые данные о составе микробных сообществ в озере, включая водоросли и цианобактерии (Belykh et al., 2023).

Крупные пресные озера занимают особое место среди материковых вод, в первую очередь в качестве резервуаров чистой воды, в некоторых из них природная пресная вода является эталоном высокого качества. Примером такого озера служит Хубсугул, в нем сосредоточено около 70% всех запасов пресной воды страны. С другой стороны, отличительная особенность оз. Хубсугул — его древность и происхождение. Древние рифтовые озера — это уникальные водоемы Земли с древней, богатой и разнообразной биотой на фоне невысокой продуктивности. Они служат центрами видообразования, представляют научный интерес в области систематики, эволюционной и природоохранной биологии, биогеографии и экологии. Помимо Хубсугула, крупными древними, олиготрофными озерами являются Байкал и Танганьика (Румянцев и соавт., 2012). Байкал и Хубсугул располагаются на расстоянии 230 км друг от друга, имеют прямую водную связь, сходный температурный режим, невысокую антропогенную нагрузку. Оз. Хубсугул практически не подвергается антропогенному воздействию, плотность населения в регионе составляет около 1 чел./км<sup>2</sup>, а преобладающее значение в экономике района имеет животноводство (Атлас

озера Хубсугул, 1989). В противоположность, тропическое озеро Танганьика, расположенное в Восточно-Африканском рифтовом разломе, находится на территории густонаселенных стран с развитой промышленностью и сельским хозяйством.

Цель работы — характеристика микробных сообществ оз. Хубсугул в сравнительно-биогеографическом аспекте с использованием данных о микробиомах почвенных, морских и пресноводных экосистем, включая крупные древние и олиготрофные озера Земли. Пробы воды и биопленок камней отобраны в северной части оз. Хубсугул в июле 2017 г. Отбор проб, методы генетического и биоинформатического анализа микробных сообществ описаны ранее в деталях (Belykh et al., 2023). Также в данной работе приведены гидрофизические, гидрохимические и санитарно-микробиологические показатели воды.

Для настоящего исследования использованы библиотеки ампликонов гена 16S рРНК микробных сообществ морских и пресноводных экосистем (бактериопланктон) разного трофического статуса, а также почвы, удовлетворяющие следующим параметрам: регион V3–V4 гена 16S рРНК, праймеры 343F и 806R. Номера проектов в Genbank: 1) собственные результаты: оз. Хубсугул (PRJNA820510), оз. Байкал (PRJNA637978), озера Севан и Байкал (PRJNA637453); 2) опубликованные данные: оз. Танганьика (PRJNA644886), почва арх. Шпицберген (PRJNA427760), оз. Балатон (PRJNA601652), озера Гарда и Комо (PRJEB33405), Море Уэдделла (PRJEB49387), Северный Ледовитый океан (PRJNA770954), водохранилище Биллингс (<https://zenodo.org/record/4751698>).

Оценку качества данных секвенирования, фильтрацию последовательностей по качеству и длине, кластеризацию в ОТЕ, таксономическую идентификацию ОТЕ проводили, как ранее описано (Belykh et al., 2023). Для оценки сходства таксономического состава образцов применяли неметрическое многомерное шкалирование (NMDS) на основе матрицы дистанций Брея–Кёртиса. Кластеризацию образцов проводили с помощью метода невзвешенной группировки с арифметическим средним (UPGMA). Статистический анализ и визуализацию рисунков выполняли с использованием языка программирования R v.4.2.2 (R Core Team, R, 2023).

В планктоне пелагиали оз. Хубсугул преобладали последовательности, принадлежащие филумам *Actinobacteriota* (60%), *Bacteroidota* (11%), *Proteobacteria* (14%), *Cyanobacteria* (7%), *Verrucomicrobiota* (8%), *Planctomycetota* (1%). Минорные филумы включали *Chloroflexi*, *Firmicutes*, *Dependentiae*, *Mycococcota*, *Acidobacteriota*, *Deinococcota*, *Gemmatimonadota*, *Patescibacteria*, *Nitrospirota*. В биопленках доминировали *Proteobacteria* (47%), субдоминантами являлись *Bacteroidota* (28%), *Actinobacteriota* (7%),

*Verrucomicrobia* (6%), *Cyanobacteria* (5%). Часто встречались *Chloroflexi* (2%), *Patescibacteria* (2%), *Acidobacteriota* (1%). Минорные филумы (менее 1% от общего количества последовательностей) были разнообразны: *Planctomycetota*, *Deinococcota*, *Gemmatimonadota*, *Armatimonadota*, *Bdellovibrionota*, *Desulfobacterota*, MBNT15, *Mycococcota*, *Nitrospirota*, NB1-j, RCP2-54, WPS-2.

Анализ бактериальных сообществ различных экосистем методом UPGMA показал, что образцы разделились на три основные группы, представляющие наземный, морской и пресноводный биомы (рис. 1).

Морские микробные сообщества обособились от других микробиомов на самом высоком уровне ветвления дендрограммы, в них в большом количестве присутствовали *Proteobacteria* (70%) (Piontek et al., 2022; Vipindas et al., 2023).

“Наземная” и “пресноводная” группы разделились на втором уровне ветвления дендрограммы. Образцы биопленок камней из оз. Хубсугул сформировали кластер и вошли в “наземную” кладу совместно с кластером микробиомов почвы арх. Шпицберген, полученными ранее (Wang et al., 2019). В этой кладе также преобладали *Proteobacteria* (36%).

“Пресноводная” клада содержала несколько кластеров, в том числе “европейско-сибирский”, включающий образцы из олиго-, олигомезо- и мезотрофных озер: Хубсугула, Байкала, Севана (Армения), Балатона (Венгрия), Гарда и Комо (Италия). Бактериопланктон из оз. Хубсугул образовал с бактериопланктоном из оз. Байкал “Байкальский кластер II” или “холодноводный олиготрофный кластер”. В него вошли образцы из трех котловин оз. Байкал, отобранные в марте, июне, июле, сентябре на глубинах от 0 до 100 м. В “Байкальском кластере II” доминировали *Actinobacteriota* (54%). Менее многочисленны были *Proteobacteria* (20%), *Cyanobacteria* (11%), *Bacteroidota* (9%), *Nitrospirota* (2%), *Verrucomicrobiota* (2%). В другом “Байкальском кластере I”, содержащем сентябрьские образцы из эуфотического слоя (0–50 м), преобладали пикоцианобактерии (59%), в меньшем количестве отмечены *Actinobacteriota* (28%), *Bacteroidota* (6%), *Proteobacteria* (5%), *Verrucomicrobiota* (2%).

Обособленная группа внутри “европейско-сибирского” кластера включала микробиомы из мезотрофного оз. Севан (Gevorgyan et al., 2020), для которых свойственна следующая структура сообщества на уровне мажорных филумов: *Proteobacteria* (45%), *Actinobacteriota* (32%) и *Bacteroidota* (15%), *Cyanobacteria* (5%). Микробиомы альпийских озер Гарда и Комо обособились по фактору глубинности (Salmaso, 2019). Наиболее сходны с ними бактериальные сообщества оз. Балатон, где почти в равных долях представлены три филума: *Actinobacteriota*



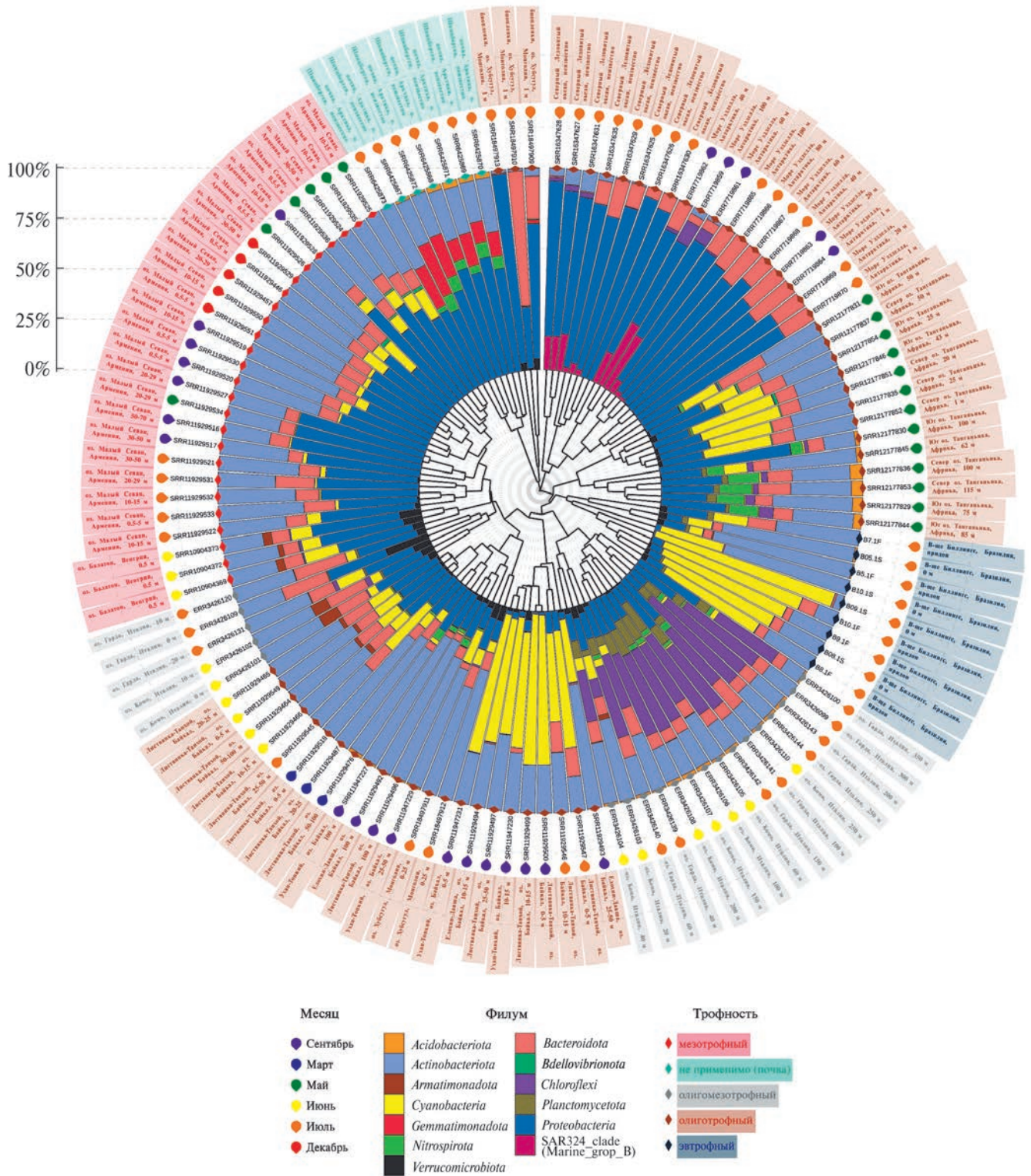


Рис. 1. Кластерный анализ микробиомов воды и почв. UPGMA-дендрограмма построена на основе матрицы дистанций Брея-Кёртиса. В гистограммах цветом указаны доминирующие филумы, представленные в данном сообществе. Названия водоемов выделены цветом в зависимости от трофического статуса водоема.



(24%), *Bacteroidota* (26%), *Proteobacteria* (27%) (Farkas et al., 2020).

Микробиомы эвтрофного водохранилища Биллингс в Бразилии (Южная Америка), где наблюдалось “цветение” воды цианобактериями, группировались в отдельный кластер, не входящий в “европейско-сибирский”. Вклад цианобактерий в общее количество последовательностей бактериопланктона достигал 38% (Marcondes et al., 2022).

Одно из наиболее уникальных бактериальных сообществ обнаружено в оз. Танганьика, микробиомы которого сформировали кластер, обособленный от всех других пресноводных экосистем. Для оз. Танганьика характерна устойчивая термическая стратификация вод и наличие застойного бескислородного слоя ниже 200 м (Callbeck et al., 2021). В нашей выборке присутствовали образцы с глубин от 1 до 115 м; они разделились, согласно стратификации вод, на две группы: из эпилимниона и термоклина. Доминирующие филумы *Proteobacteria* (29%) и *Actinobacteriota* (26%) обнаружены в сходных долях, *Cyanobacteria* (15%), *Bacteroidota* (14%), *Nitrospirota* (4%), *Acidobacteriota* (3%), *Verrucomicrobiota* и *Planctomycetota* (2%) встречались реже.

С помощью многомерного шкалирования образцов методом NMDS и тестирования MANOVA были подтверждены результаты кластерного анализа и определены уровни значимости таких факторов, как широтная зональность, глубина и трофический статус. По результатам MANOVA-test ( $p$ -value < 0.01\*\*\*) значения  $R^2$  составили для параметра “Широтная зональность” — 0.628, “Глубина” — 0.567, “Трофность” — 0.302.

Таким образом, на примере проанализированных водоемов показано, что наиболее значимым из исследованных факторов, определяющим глобальное распределение микробных сообществ, является широтная зональность. Региональные и локальные факторы среды влияют на состав сообществ по принципу “среда отбирает”, фактор географического положения водоема для водных бактерий имеет ключевое значение. Общеизвестное положение “все есть везде” на уровне филотипов достоверно не подтверждается. Трофический статус водоемов, как и их геологическая история, имеют меньшую значимость по сравнению с широтной зональностью. Несмотря на древность и общность происхождения Байкала (25 млн лет), Танганьики (10 млн лет), Хубсугула (5.5 млн лет), бактериальные сообщества в них существенно различаются. На локальном уровне ведущими факторами являются сезонность и глубинная зональность, последний фактор наиболее ярко выражен в глубоководных озерах. Альпийские озера, оз. Танганьика и оз. Байкал продемонстрировали строгое разделение сообществ по глубинам.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа была профинансирована в рамках выполнения проекта РФФИ № 16-54-44035 и по теме госзадания № 0279-2021-0015.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Атлас озера Хубсугул / Под ред. Б.А. Богдавленского. М.: ГУГК, 1989. 118 с.
- Румянцев В.А., Дробкова В.Г., Измайлова А.В. Великие озера мира. Санкт-Петербург: Лема, 2012. 370 с.
- Belykh O.I., Sorokovikova E.G., Tomberg I.V., Fedorova G.A., Kuzmin A.V., Krasnopeev A.Y., Suslova M.Y., Potapov S.A., Belykh T.I., Norovsuren J., Galachyants A.D., Tikhonova I.V. Water quality, toxicity and diversity of planktonic and benthic cyanobacteria in pristine ancient Lake Khubsugul (Hövsgöl), Mongolia // *Toxins*. 2023. V. 15. Art. 213.
- Callbeck C.M., Ehrenfels B., Baumann K.B.L., Wehrli B., Schubert C.J. Anoxic chlorophyll maximum enhances local organic matter remineralization and nitrogen loss in Lake Tanganyika // *Nat. Commun.* 2021. V. 12. Art. 830.
- Farkas M., Kaszab E., Radó J., Háhn J., Tóth G., Harkai P., Ferincz Á., Lovász Z., Táncsics A., Vörös L., Balázs K., Szoboszlai S. Planktonic and benthic bacterial communities of the largest central european shallow lake, Lake Balaton and its main inflow Zala River // *Curr. Microbiol.* 2020. V. 77. P. 4016–4028.
- Gevorgyan G., Rinke K., Schultze M., Mamyan A., Kuzmin A., Belykh O., Sorokovikova E., Hayrapetyan A., Hovsepian A., Khachikyan T., Aghayan S., Fedorova G., Krasnopeev A., Potapov S., Tikhonova I. First report about toxic cyanobacterial bloom occurrence in Lake Sevan, Armenia // *Int. Rev. Hydrobiol.* 2020. V. 105. № 5–6. P. 131–142.
- Marcondes M.A., Nascimento A., Pessôa R., Victor J.R., Duarte A.J.D.S., Clissa P.B., Sanabani S.S. Characterization of bacterial communities from the surface and adjacent bottom layers of water in the Billings reservoir // *Life (Basel)*. 2022. V. 12. Art. 1280.
- Piontek J., Meeske C., Hassenrück C., Engel A., Jürgens K. Organic matter availability drives the spatial variation in the community composition and activity of Antarctic marine bacterioplankton // *Environ. Microbiol.* 2022. V. 24. P. 4030–4048.

- R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing (R Foundation for Statistical Computing). 2023.
- Salmaso N.* Effects of habitat partitioning on the distribution of bacterioplankton in deep lakes // *Front. Microbiol.* 2019. V. 10. Art. 2257.
- The geology, biodiversity and ecology of Lake Hövsgöl (Mongolia) / Eds Goulden C.E., Sitnikova T.Y., Gelhaus, J., Boldgiv B. Backhuys: Leiden, Netherlands, 2006. 525 p.
- Vipindas P.V., Venkatachalam S., Jabir T., Yang E.J., Cho K.-H., Jung J., Lee Y., Krishnan K.P.* Water mass controlled vertical stratification of bacterial and archaeal communities in the Western Arctic Ocean during summer sea-ice melting // *Microb. Ecol.* 2023. V. 85. P. 1150–1163.
- Wang N., Guo Y., Li G., Xia Y., Ma M., Zang J., Ma Y., Yin X., Han W., Lv J., Cao H.* Geochemical-compositional-functional changes in arctic soil microbiomes post land submergence revealed by metagenomics // *Microb. Environ.* 2019. V. 34. P. 180–190.

---

---

**SHORT COMMUNICATIONS**

---

---

## Biogeography of Planktonic and Benthic Bacterial Communities of Lake Khubsugul (Mongolia)

O. I. Belykh<sup>1</sup>\*, A. Yu. Krasnopeev<sup>1</sup>, E. G. Sorokovikova<sup>1</sup>, S. A. Potapov<sup>1</sup>, N. Jadamba<sup>1, 2</sup>,  
T. I. Belykh<sup>3</sup>, and I. V. Tikhonova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Limnological Institute, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Irkutsk, 664033 Russia*

<sup>2</sup>*Institute of Biology, Mongolian Academy of Sciences, Ulaanbaatar, 13330 Mongolia*

<sup>3</sup>*Baikal State University, Irkutsk, 664074 Russia*

\*e-mail: belykh@lin.irk.ru

Received October 14, 2023; revised October 27, 2023; accepted November 1, 2023

**Abstract**—The bacterioplankton of Lake Khubsugul (Hövsgöl) has significant differences from that of large ancient and oligotrophic water bodies. The greatest similarity was noted, however, between the microbiomes of Lake Khubsugul and Lake Baikal, the lakes located in the same rift zone and connected by the river system, which emphasizes the similarity of microbiomes at the regional level. In the global aspect, geographical zonation had the greatest reliable significance in the microbial community biogeography, while depth had the lowest. Trophic status of the lakes, as well as their ancient origin, did not affect the clustering of microbiomes, with the seasonal factor playing the major part at the local and regional levels.

**Keywords:** Lake Khubsugul, Mongolia, microbiomes, ancient oligotrophic lakes, biogeography, Lake Baikal, Lake Tanganyika

УДК 579.264

## АКТИВНОСТЬ ГРИБОВ РОДА *TRICHODERMA*, ВЫДЕЛЕННЫХ В ВОСТОЧНОЙ СИБИРИ, ПРОТИВ ФИТОПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

© 2024 г. В. Е. Кузнецова<sup>а, \*</sup>, Е. А. Матвеева<sup>а</sup>, Л. А. Беловежец<sup>а</sup><sup>а</sup>Иркутский институт химии им. А.Е. Фаворского СО РАН, Иркутск, 664033 Россия

\*e-mail: uchiha-viksya@mail.ru

Поступила в редакцию 13.10.2023 г.

После доработки 30.10.2023 г.

Принята к публикации 01.11.2023 г.

*Trichoderma* является важным антагонистом патогенных грибов и может быть использована в сельском хозяйстве для борьбы с различными заболеваниями растений. В ходе данной работы были выделены 2 микромицета со спилов древесины в Восточной Сибири, которые по морфологическим и молекулярно-генетическим признакам идентифицированы как *Trichoderma atroviride* и *Trichoderma harzianum*. Выделенные штаммы *Trichoderma* эффективно подавляют развитие исследуемых патогенных грибов (до 80%). Представленные в работе данные позволяют сделать вывод о возможности использования *Trichoderma atroviride* и *Trichoderma harzianum* в дальнейшем изучении средств биоконтроля болезней растений.

**Ключевые слова:** микроорганизмы-антагонисты, *Trichoderma*, фитопатогены, биоконтроль

DOI: 10.31857/S0026365624020123

Во всем мире основные потери сельскохозяйственной продукции связаны с болезнями растений, причем около половины из них ассоциированы с микроскопическими грибами. Используемые на данный момент химические фунгициды токсичны (Kekalo et al., 2023), и их применение приводит к негативным последствиям, загрязнению окружающей среды, возрастанию резистентности возбудителей (Jiang et al., 2022, Rola et al., 2023). Для решения этой проблемы исследуются биологические альтернативы (Naghi et al., 2023). Особый интерес представляют грибы рода *Trichoderma*, обладающие потенциалом для защиты от ряда грибковых заболеваний у сельскохозяйственных культур (Illescas et al., 2022; Putranto et al., 2021).

*Trichoderma* — распространенный сапрофитный гриб, обитающий в почве (Kumar et al., 2021), который широко используется в качестве агента биологической борьбы с различными болезнями растений (Arasu et al., 2023; Guzmán-Guzmán et al., 2023). Он способен к продукции антибиотиков, выработке гидролитических ферментов, разрушающих клеточные стенки и споры патогенных грибов (Lyubenova et al., 2023). Кроме того, при колонизации корней *Trichoderma* способна смягчать абиотические стрессы. Это происходит за счет повышения глобальной устойчивости растений (Nagman et al., 2019). *Trichoderma* может использоваться

в качестве биопрепарата на разных стадиях роста растений. При обработке семян микроорганизм способствует улучшению их всхожести (Pani et al., 2021), а в фазу роста растений позволяет уменьшить инфекционную нагрузку, повысить иммунитет растений и улучшить качество урожая.

Целью данного исследования было изучение антагонистических взаимодействий двух микромицетов рода *Trichoderma*, выделенных со спилов древесины в Восточной Сибири, и фитопатогенных грибов.

Объектами служили культуры фитопатогенных грибов: *Fusarium (orthoceras) oxysporum* F-845, *Alternaria botrytis* F-737, *Stemphylium botryosum* F-3044, *Phytophthora drechsleri* F-3149 (предоставлены ВКМ, г. Пушино; <http://www.vkm.ru/rus>), *Trichoderma harzianum* и *Trichoderma atroviride*, выделенные нами из зараженной древесины. Культуры идентифицированы на основе анализа последовательности рибосомальных генов (26-sRNA) (ВКПМ, г. Москва) (<https://vkpm.genetika.ru>). Антагонистическую активность *Trichoderma* против фитопатогенов тестировали *in vitro* методом встречных культур в 5 повторностях на картофельно-глюкозном агаре (г/л): картофель 200, глюкоза 20, агар 20 г. Контролем служила монокультура гриба. Все варианты инкубировали в чашках Петри в термостате при 27°C в течение 7 сут. По окончании

эксперимента производили измерение радиально-го роста антагонистов и фитопатогенов (Guzmán-Guzmán et al., 2023).

Для корректной оценки антагонистической активности было проведено определение скорости роста каждой культуры (рис. 1).

Максимальной скоростью роста обладала *Ph. drechsleri* (в экспоненциальной фазе роста 37.23 мм/сут), уже на 4 сут она заполняла всю поверхность питательной среды. У *T. harzianum* и *T. atroviride* скорость роста была близка и составляла 17.38 и 19.85 мм/сут, соответственно. Самые медленно растущие культуры — *F. (orthoceras) oxysporum* — 10.56 мм/сут, *A. botrytis* — 8.87 мм/сут и *S. botryosum* — 10.22 мм/сут; к концу эксперимента площадь поверхности питательной среды, занятой данными культурами, не превышала половины. Интересно, что ярко выраженная лаг-фаза характерна только для *T. harzianum*.

Следующим этапом работы было определение антагонистической активности культур по

проценту ингибирования радиального роста фитопатогенов (рис. 2).

Обе исследованные культуры эффективно (более чем на 50%) подавляли рост патогенов. Максимальное подавление характерно для *T. harzianum* против *F. oxysporum* и *A. botrytis* (более 80%). Следует отметить, что развитие колоний фитопатогенов идет примерно на одном уровне (рис. 3).

Интересно, что мицелий *T. harzianum* расположен поверх колоний патогенов (рис. 3а), а для *T. atroviride* характерна полоса чистого агара 3–8 мм, с последующим ростом на колонии патогена (рис. 3а). Это, вероятно, связано с продукцией *T. atroviride* антибиотиков (Manzar et al., 2022). Также можно отметить, что в двойных культурах патогены (*A. botrytis*, *S. botryosum*) не успевали синтезировать пигмент, что может свидетельствовать о замедлении роста культуры патогена, предположительно, связанного с синтезом *Trichoderma* хитиноподобных ферментов (Manzar et al., 2022).

Подавление роста *Ph. drechsleri* обоими антагонистами в первую неделю культивирования

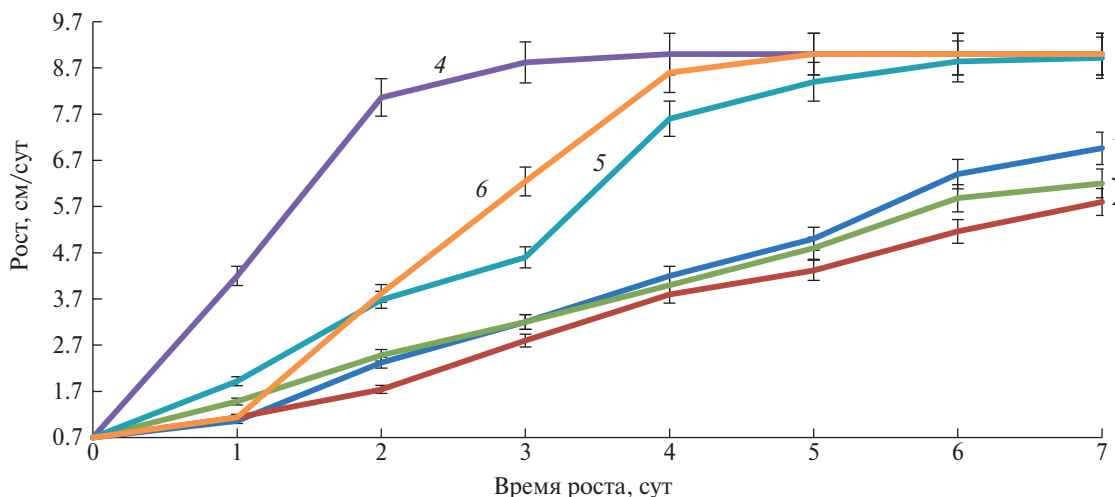


Рис. 1. Скорость роста микроорганизмов на плотной питательной среде (M ± с): 1 – *Fusarium (orthoceras) oxysporum*; 2 – *Alternaria botrytis*; 3 – *Stemphylium botryosum*; 4 – *Phytophthora drechsleri*; 5 – *Trichoderma atroviride*; 6 – *Trichoderma harzianum*.

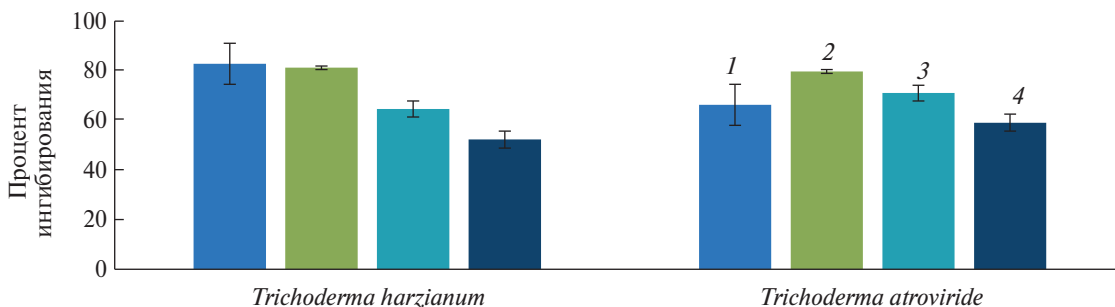
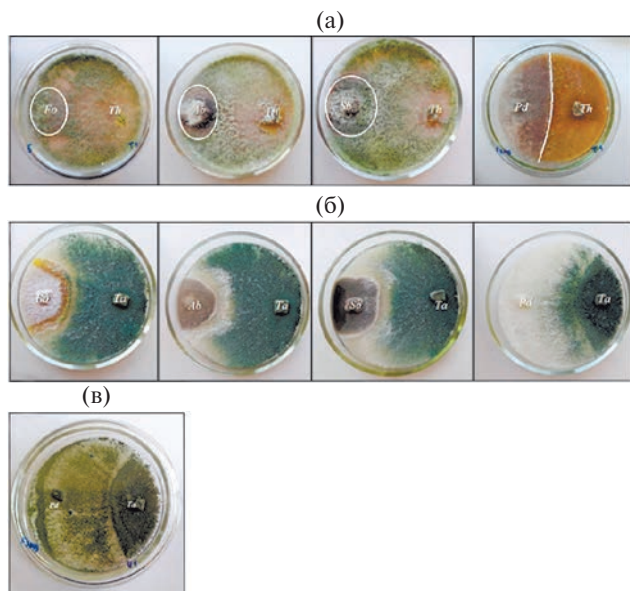


Рис. 2. Ингибирование радиального роста фитопатогена через 7 сут культивирования, %; (M ± с). 1 – *Fusarium (orthoceras) oxysporum*; 2 – *Aliernaria botrytis*; 3 – *Stemphylium botryosum*; 4 – *Phytophthora drechsleri*.





**Рис. 3.** Антагонизм *in vitro*: ряд (а) справа (*Th*) *Trichoderma harzianum*; ряд (б) справа (*Ta*) *Trichoderma atroviride*, фитопатогены слева (*Fo*) *Fusarium (orthoceras) oxysporum*, (*Ab*) *Alternaria botrytis*, (*Sb*) *Stemphylium botryosum*, (*Pd*) *Phytophthora drechsleri* (возраст культур 7 сут); ряд (в) (*Pd*) *Phytophthora drechsleri* и (*Ta*) *Trichoderma atroviride*. Возраст культур 14 сут.

существенно ниже. *Ph. drechsleri*, как более быстро растущий микромицет, успевает колонизировать около 50% питательной среды до контакта с антагонистом. Однако при более длительной инкубации (14 сут) поверхность фитопатогена оказывается покрыта мицелием и спорами *Trichoderma* (рис. 3с).

Таким образом, оба исследуемых штамма *Trichoderma* эффективно (на 52–82%) подавляют исследованные культуры фитопатогенов. Ингибирование *Ph. drechsleri* происходит с задержкой, связанной со скоростью роста патогена. Различия между штаммами *Trichoderma* в подавлении исследуемых патогенов связано с разнообразными стратегиями в подавлении фитопатогенов. Предположительно, *T. atroviride* способна к синтезу антибиотиков, а *T. harzianum* – хитинолитических ферментов (Manzar et al., 2022).

Представленные в работе данные позволяют сделать вывод о возможности использования в сельском хозяйстве *T. atroviride* и *T. harzianum* в качестве средств биологического контроля как для профилактики болезни, так и на начальном этапе заражения растений в отношении распространенных фитопатогенов.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФ № 23-26-10008.

#### 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

Всероссийская коллекция микроорганизмов. [Электронный ресурс] URL: <http://www.vkm.ru/rus>. (дата обраш. 25.04.2023).

Научный центр “Курчатовский институт”. Научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов. [Электронный ресурс] URL: <https://vkpm.genetika.ru>. (дата обраш. 25.04.2023).

Arasu M.V., Vijayaraghavan P., Al-Dhabi N.A., Choi K.C., Moovendhan M. Biocontrol of *Trichoderma gamsii* induces soil suppressive and growth-promoting impacts and rot disease-protecting activities // J. Basic Microbiol. 2023. V. 63. P. 801–813.

<https://doi.org/10.1002/jobm.202300016>

Guzmán-Guzmán P., Kumar A., de los Santos-Villalobos S., Parra-Cota F.I., Orozco-Mosqueda Md.C., Fadji A.E., Hyder S., Babalola O.O., Santoyo G. *Trichoderma* species: our best fungal allies in the biocontrol of plant diseases — a review // Plants. 2023. V. 12. Art. 432.

<https://doi.org/10.3390/plants12030432>

Haghi Z., Mostowfizadeh-Ghalamfarsa R., Steinberg C. The efficacy of Iranian *Pythium oligandrum* isolates in biocontrol of soil-borne fungal pathogens of tomato // J. Plant Pathol. 2023. V. 105. P. 185–196.

<https://doi.org/10.1007/s42161-022-01245-5>

Harman G.E., Doni F., Khadka R.B., Uphoff N. Endophytic strains of *Trichoderma* increase plants' photosynthetic capability // J. Appl. Microbiol. 2019. V. 130. P. 529–546.

<https://doi.org/10.1111/jam.14368>

Illescas M., Morán-Diez M.E., Martínez de Alba Á.E., Hermosa R., Monte E. Effect of *Trichoderma asperellum* on wheat plants' biochemical and molecular responses, and yield under different water stress conditions // Int. J. Mol. Sci. 2022. V. 23. Art. 6782.

<https://doi.org/10.3390/ijms23126782>

Jiang F., Peng Ye., Sun Q. Pesticides exposure induced obesity and its associated diseases: recent progress and challenges // J. Future Foods. 2022. V. 2. P. 119–124.

<https://doi.org/10.1016/j.jfutfo.2022.03.005>

Kekalo A.Yu., Zargaryan N.Yu., Nemchenko V.V. Effectiveness of fungicidal protection of spring wheat against powdery mildew and tan spot // Siberian Herald of Agricultural Science. 2023. V. 53. № 1. P. 45–52.

<https://doi.org/10.26898/0370-8799-2023-1-6>

- Kumar J., Kumar M., Tomar A., Vaishali, Kumar P., Chand P. Morphological and molecular characterization of *Trichoderma* spp. from rhizosphere soil and their antagonistic activity against *Fusarium* spp. // Int. J. Plant Soil Sci. 2021. V. 33. P. 100–112.  
<https://doi.org/10.9734/ijpss/2021/v33i1930605>
- Lyubenova A., Rusanova M., Nikolova M., Slavov S.B. Plant extracts and *Trichoderma* spp.: possibilities for implementation in agriculture as biopesticides // Biotechnology and Biotechnological Equipment. 2023. V. 37. P. 159–166.  
<https://doi.org/10.1080/13102818.2023.2166869>
- Manzar N., Kashyap A.S., Goutam R.S., Rajawat M.V.S., Sharma P.K., Sharma S.K., Singh H.V. *Trichoderma*: Advent of versatile biocontrol agent, its secrets and insights into mechanism of biocontrol potential // Sustainability. 2022. V. 14. Art. 12786.
- Pani S., Kumar A., Sharma A. *Trichoderma harzianum*: an overview // Bull. Environ. Pharmacol. Life Sci. 2021. V. 10. № 6. P. 32–39.
- Putranto W.A., Nugroho R.A., Hardiyanta S.P., Cahyaningrum D.Ch. Are *Trichoderma atroviride* and *Trichoderma harzianum* effective to control *Fusarium* associated with tomato wilt? // Microbiology Indonesia. 2021. V. 15. № 3. P. 84–90.  
<https://doi.org/10.5454/mi.15.3.2>
- Rola K., Majewska E., Chowaniec K. Interaction effect of fungicide and chitosan on non-target lichenized fungi // Chemosphere. 2023. V. 316. P. 137772.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.137772>

---



---

 SHORT COMMUNICATIONS
 

---



---

### Activity of East Siberian *Trichoderma* Isolates against Plant-pathogenic Microorganisms

V. E. Kuznetsova<sup>1, \*</sup>, E. A. Matveeva<sup>1</sup>, and L. A. Belovezhets<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Favorsky Irkutsk Institute of Chemistry, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Irkutsk, 664033 Russia

\*e-mail: uchiha-viksyia@mail.ru

Received October 13, 2023; revised October 30, 2023; accepted November 1, 2023

**Abstract**—The genus *Trichoderma* comprised important antagonists of pathogenic fungi and can be used in agriculture to combat various plant diseases. In the course of the present work, two micromycete strains were isolated from wood cuts in Eastern Siberia, which were identified by morphological and molecular genetic characteristics as *Trichoderma atroviride* and *Trichoderma harzianum*. These *Trichoderma* strains efficiently inhibited the development of the pathogenic fungi studied (by up to 80%). The data presented in the paper indicate that *Trichoderma atroviride* and *Trichoderma harzianum* may be promising for further study of the means of biocontrol of plant diseases.

**Keywords:** microbial antagonists, *Trichoderma*, plant pathogens, biocontrol

УДК 579.262

## БАКТЕРИАЛЬНЫЕ СООБЩЕСТВА, АССОЦИИРОВАННЫЕ С ПРЕСНОВОДНЫМ МОЛЛЮСКОМ *KAMTSCHATICANA* *KAMTSCHATICA* (MIDDENDORFF, 1850), В СЕВЕРО-ВОСТОЧНОЙ СИБИРИ

© 2024 г. А. С. Аксенов<sup>a, b, \*</sup>, О. Я. Кисиль<sup>a, b</sup>, А. С. Червочкина<sup>b</sup>, И. С. Хребтова<sup>a</sup>, К. С. Манцурова<sup>a, b</sup>, Ю. В. Беспалая<sup>a</sup>, О. В. Аксенова<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Федеральный исследовательский центр комплексного изучения Арктики УрО РАН  
им. академика Н.П. Лаврова, Архангельск, 163020, Россия

<sup>b</sup>Северный (Арктический) федеральный университет им. М.В. Ломоносова, Архангельск, 163002, Россия

\*e-mail: a.s.aksenov@narfu.ru

Поступила в редакцию 16.10.2023 г.

После доработки 27.10.2023 г.

Принята к публикации 28.10.2023 г.

В работе получены первые сведения о микробных сообществах, ассоциированных с пресноводным моллюском *Kamtschaticana kamtschatica*, населяющим разнотипные водоемы Восточной Сибири и Дальнего Востока России. С использованием данных метабаркодирования на основе фрагментов генов 16S рРНК проведено таксономическое профилирование бактериальных сообществ, ассоциированных с моллюсками, из трех водоемов Магаданской области. Показано, что преобладающими филумами в изучаемых бактериальных сообществах являются: *Pseudomonadota*, *Bacillota*, *Cyanobacteriota*, *Actinomycetota*, *Verrucomicrobiota*, *Planctomycetota* и *Bacteroidota*. Максимальное  $\alpha$ -разнообразие бактерий по индексу Chao1 характерно для моллюсков из Оротуканского водохранилища. Относительная численность бактерий родов *Snowella*, *Leptolyngbya*, *Nodosilinea*, *Arenimonas* и *Polaromonas* существенно отличается моллюска данного местообитания от двух других. Наибольшие сходства в составе микробиоты у *K. kamtschatica* проявляются по роду *Pseudomonas*, присутствующего в большинстве образцов в количестве более 1% и не обнаруженного в образцах грунта. Полученные данные о разнообразии и составе бактериальных сообществ, ассоциированных с прудовиками, имеют фундаментальное значение для экологии пресноводных моллюсков.

**Ключевые слова:** *Lymnaeidae*, 16S рРНК, микробиота, *Mycobacterium*, Магаданская область, бассейн реки Колыма

DOI: 10.31857/S0026365624020135

Моллюски играют важную роль в структуре и функционировании пресноводных экосистем, участвуя в фильтрации воды, трансформации органического вещества или являясь элементом питания различных видов рыб (Böhm et al., 2021) и других позвоночных животных. Несмотря на значимость и давнюю историю исследований моллюсков, до сих пор существуют пробелы в фундаментальных аспектах их экологии, а также практическом использовании. В последнее время с развитием технологий высокопроизводительного секвенирования все большее внимание уделяется микробиоте, ассоциированной с беспозвоночными животными (Недолужко и соавт., 2017), в том числе и моллюсками (Dag et al., 2017). Например, благодаря подобным исследованиям выясняется роль микроорганизмов в массовом вымирании

двустворчатых моллюсков (Richard et al., 2021), круговороте азота в водоемах (Marzocchi et al., 2021), адаптации инвазионных видов в новых местообитаниях (Chiarello, 2022), функционировании отдельных таксонов в тройной системе: моллюск–бактериальное сообщество–паразиты (Schols et al., 2023). Вместе с тем, данные о структуре сообществ и роли отдельных представителей бактерий у пресноводных моллюсков семейства *Lymnaeidae*, которые распространены по всему земному шару, практически отсутствуют (Hu et al., 2018; Kivistik et al., 2022). Одним из интересных представителей этого семейства является широко распространенный в Восточной Сибири и на Дальнем Востоке России вид *Kamtschaticana kamtschatica*, который населяет разнотипные водоемы и, помимо озер

и рек, часто встречается в термальных источниках (Vinarski et al., 2021).

Целью настоящего исследования является таксономическое профилирование бактериальных сообществ, ассоциированных с пресноводным моллюском *Kamtschaticana kamtschatica*.

Экземпляры моллюсков были отобраны в августе 2022 года в Магаданской области по 4–5 экземпляров из пойменного озера р. Магаданка на окраине г. Магадан (59.5478° с.ш., 150.8758° в.д.), водохранилища близ пгт. Оротукан (62.2672° с.ш., 151.7030° в.д.), и р. Сеймчан в 16 км выше впадения в реку Колыма (63.0302° с.ш., 152.2764° в.д.) (рис. 1).

Видовую идентификацию анализируемых образцов проводили на основе морфологии и подтверждали методом генетического баркодинга, описание которого дано в нашей предыдущей работе (Vinarski et al., 2021). Анализ интегральных гидрохимических показателей водоемов осуществляли в соответствии с ранее описанными методами (Bespalaya et al., 2021).

Образцы моллюсков и грунта после отбора помещали в стерильные емкости, замораживали при температуре -20°C и транспортировали в лабораторию с сохранением температурного режима. Экстракцию ДНК из мягких тел моллюсков осуществляли с помощью модифицированного СТАВ метода. Разрушение бактериальных клеток проводили двукратной гомогенизацией (скорость 6000 встряхиваний/мин в течение 30 с). На основе полученных препаратов ДНК создавали библиотеки участков маркерного гена 16S рРНК (вариабельный участок V4) за счет амплификации с использованием праймеров: F515/R806 (GTGCCAGCMGCCGCGGTAA/GGACTACVSGGGTATCTAAT). Рабочая смесь ПЦР состояла из полимеразы Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (“NEB”, США), прямого и обратного праймеров, матрицы-ДНК и каждого dNTP (“LifeTechnologies”). Параметры амплификации: денатурация при 94°C, 1 мин, 25 циклов с режимами: 94°C — 30 с, 55°C — 30 с, 72°C — 1 мин, заключительная элонгация при 72°C — 3 мин. Очистку ПЦР продуктов проводили с помощью магнитных

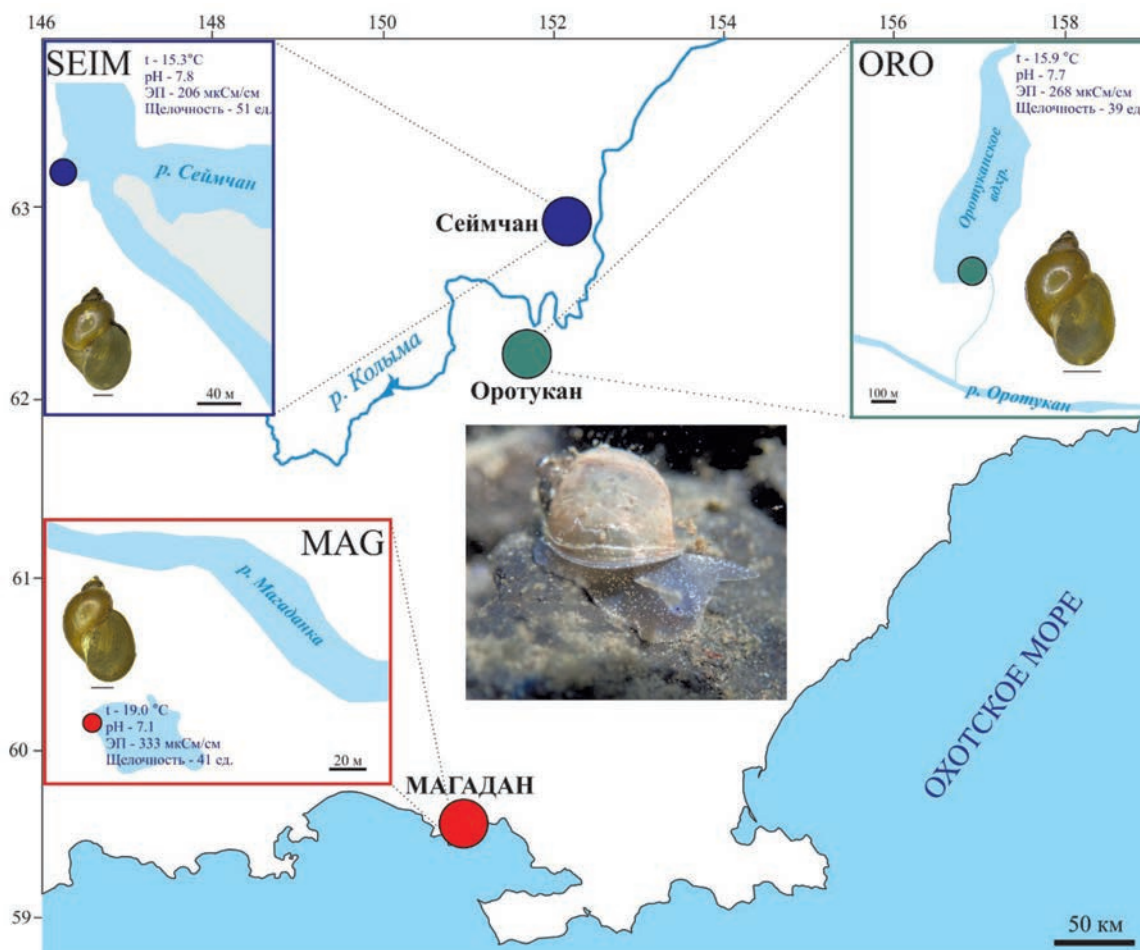


Рис. 1. Карта-схема района исследований с указанием мест отбора образцов: SEIM — р. Сеймчан (синие точки); ORO — Оротуканское водохранилище (зеленые точки); MAG — пойменное озеро в устье р. Магаданка (красные точки). Масштабная линейка для раковин моллюсков — 2.5 мм.



частиц AMPureXP (“BeckmanCoulter”, США). Секвенирование осуществляли на приборе Illumina MiSeq (“Illumina”, США) с применением коммерческого набора MiSeq® ReagentKit v3 с двусторонним чтением (2 по 300 н). Использовали программное обеспечение компании Illumina, а также программные пакеты dada2, phyloseq и DECIPHER и программную среду R. Для представления данных таксономического анализа полученных исходных флотипов (Amplicon sequence variant, ASV) использовали средства программного пакета QIIME. Первичные данные секвенирования представлены в виде биопроекта NCBI (PRJNA1026928).

В химическом отношении изучаемые водоемы были сходны, однако температура в пойменном озере р. Магаданка более чем на 3°C превышала значения данного параметра в двух других местах отбора. Гидрохимические параметры исследованных водоемов приведены на рис. 1.

В результате нами были установлены различия в α-разнообразии бактериальных сообществ, ассоциированных с моллюсками (рис. 2а).

Наибольшее значение индекса разнообразия Chao-1 характерно для последовательностей генов 16S рРНК образцов микробиоты, отобранных

в Оротуканском водохранилище. Минимальные значения характерны для моллюсков из пойменного озера р. Магаданка (от 172 до 723).

Таксономический анализ бактериальных сообществ показал, что доминирующими филумами являются: *Pseudomonadota*, *Bacillota*, *Cyanobacteriota*, *Actinomycetota*, *Verrucomicrobiota*, *Planctomycetota* и *Bacteroidota*. В минорных количествах в некоторых образцах встречаются бактерии, относящиеся к филумам *Desulfobacterota*, *Мухосoccota*, *Patescibacteria*. Для моллюсков в точках отбора ORO и MAG идентифицированы представители *Chloroflexota*, SEIM и MAG — *Bdellovibrionota*, SEIM — *Deinococcota*, *Gemmatimonadota*, SEIM и ORO — *Fusobacteriota*. Относительная численность бактерий филума *Bacillota*, ассоциированных с *Kamtschaticana kamtschatica*, в 10 и более раз выше, чем в бактериальных сообществах грунтов изучаемых объектов.

Обнаружены сходства и различия между родами бактерий в моллюсках изучаемого вида, обитающих в различных водоемах Магаданской области (рис. 2б). Например, на основании данных, полученных методом 16S рРНК-метабаркодинга, род *Pseudomonas* присутствовал практически во

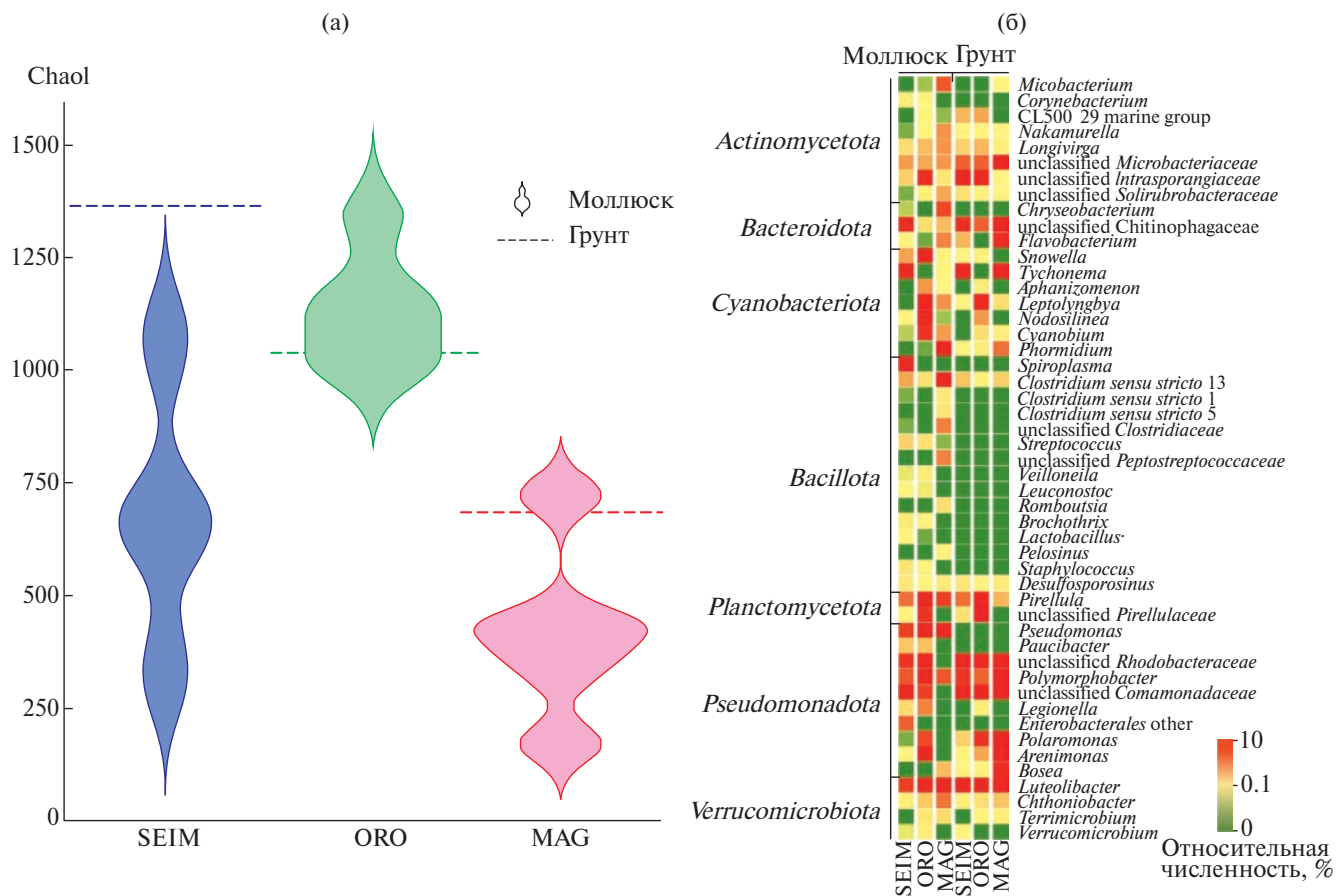


Рис. 2. α-Разнообразие (а) и таксономический состав (б) бактериальных сообществ, ассоциированных с прудовиками *Kamtschaticana kamtschatica*, и грунтов в пресных водоемах Магаданской области.

всех образцах мягких тел моллюсков в количестве более 1%. При этом в образцах грунта он не был обнаружен. Наличие данных бактерий в пищеварительном тракте моллюсков обусловлено их способностью к расщеплению полимерных компонентов растительной пищи (Hu et al., 2018). Для бактериального сообщества, ассоциированного с моллюсками из пойменного озера р. Магаданка, характерна высокая относительная численность различных родов семейства *Clostridiaceae*, а также неклассифицированного рода семейства *Peptostreptococcaceae* в сравнении с сообществами моллюсков из других районов. Для моллюсков р. Сеймчан, самой северной точки отбора в данном исследовании, отмечается высокая доля бактерий родов *Spiroplasma* и *Tychoneta*, а также представителей семейства *Comamonadaceae*. Для бактериальных сообществ, ассоциированных с моллюсками из Оротуканского водохранилища, отмечаются существенные отличия от микробиоты моллюсков из других водоемов по следующим родам: *Snowella*, *Leptolyngbya*, *Nodosilinea*, *Arenimonas* и *Polaromonas*.

В настоящее время не существует единого набора маркеров для оценки состояния моллюсков в ответ на широкий спектр стрессовых факторов. Вместе с тем, данные о составе бактериальных сообществ, ассоциированных с моллюсками, могут использоваться для оценки здоровья изучаемых популяций в различных экосистемах (Aldridge et al., 2021). Например, в точке МАГ у *Kamtschaticana kamtschatica* нами были обнаружены в значительном количестве микобактерии (рис. 26), отдельные представители которых вызывают заболевания легких и кожных покровов у животных и человека (Carella et al., 2019). Учитывая, что моллюски могут выступать в качестве “резервуара” патогенов, возникает риск для здоровья представителей более высоких уровней трофических цепей.

Полученные нами сведения о разнообразии и таксономическом профилировании микробных сообществ, ассоциированных с прудовиками *Kamtschaticana kamtschatica*, имеют фундаментальное значение для познания экологии данного вида. В прикладном аспекте исследования интерес представляет изучение микроорганизмов, ассоциированных с данным видом моллюсков, в других типах местообитаний, например, в термальных источниках Камчатки (Vinarski et al., 2021), где вероятно обнаружение малоизученных бактерий, участвующих в деградации полисахаридов и обладающих биотехнологическим потенциалом.

### БЛАГОДАРНОСТИ

Результаты получены с использованием оборудования ЦКП “Геномные технологии, протеомика и клеточная биология” ФГБНУ ВНИИСХМ.

### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследования выполнены при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 21-74-10155).

### 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

- Недолужко А.В., Кадников В.В., Белецкий А.В., Шарко Ф.С., Цыганкова С.В., Марданов А.В., Равин Н.В., Скрябин К.Г. Микроорганизмы, ассоциированные с микронасекомыми *Megaphragma amalphantum* и *Scydosella musawasensis* // Микробиология. 2017. Т. 86. С. 520–522.
- Nedoluzhko A.V., Kadnikov V.V., Beletsky A.V., Sharko F.S., Tsygankova S.V., Mardanov A.V., Ravin N.V., Skryabin K.G. Microorganisms associated with microscopic insects *Megaphragma amalphantum* and *Scydosella musawasensis* // Microbiology (Moscow). 2017. V. 86. P. 532–533.
- Aldridge D.C., Ollard I., Bepalaya Y.V., Bolotov I.N., Douda K., Geist J., Haag W.R., Klunzinger M.W., Lopes-Lima M., Mlambo M.C., Riccardi N., Sousa R., Strayer D.L., Torres S.H., Vaughn C.C., Zajac T., Zieritz A. Freshwater mussel conservation: a global horizon scan of emerging threats and opportunities // Global Change Biol. 2022. V. 29. P. 575–589.
- Bepalaya Y.V., Aksenova O.V., Bolotov I.N., Aksenov A.S. Freshwater mollusks in lakes of the Solovetsky Islands (White Sea) // Lake Water: Properties and Uses (Case Studies of Hydrochemistry and Hydrobiology of Lakes in Northwest Russia). Ch. 10. N.Y.: Nova Sci. Publishers, 2021. P. 249–267.
- Böhm M., Dewhurst-Richman N.I., Seddon M., Ledger S.E.H., Albrecht C., Allen D., Bogan A.E., Cordeiro J. et al. The conservation status of the world’s freshwater molluscs // Hydrobiologia. 2021. V. 848. P. 3231–3254.
- Carella F., Aceto S., Pollaro F., Miccio A., Iaria C., Carrasco N., Prado P., De Vico G. A mycobacterial disease is associated with the silent mass mortality of the pen shell *Pinna nobilis* along the Tyrrhenian coastline of Italy // Sci. Rep. 2019. V. 9. Art. 2725.
- Chiarello M., Buchholz J.R., McCauley M., Vaughn S.N., Hopper G.W., Gonzalez I.S., Atkinson C.L., Lozier J.D., Jackson C.R. Environment and co-occurring native mussel species, but not host genetics, impact the microbiome of a freshwater invasive species (*Corbicula fluminea*) // Front. Microbiol. 2022. V. 13. Art. 800061.

- Dar M.A., Pawar K.D., Pandit R.S. Gut microbiome analysis of snails: a biotechnological approach // Organismal and Molecular Malacology / Ed. S. Ray. InTech., 2017. P. 189–217.
- Hu Z., Chen X., Chang J., Yu J., Tong Q., Li S., Niu H. Compositional and predicted functional analysis of the gut microbiota of *Radix auricularia* (Linnaeus) via high-throughput Illumina sequencing // PeerJ. 2018. V. 6. Art. e5537.
- Kivistik C., Kairo K., Tammert H., Sokolova I.M., Kisand V., Herlemann D.P.R. Distinct stages of the intestinal bacterial community of *Ampullaceana balthica* after salinization // Front. Microbiol. 2022. V. 13. Art. 767334.
- Marzocchi U., Bonaglia S., Zaiko A., Quero G.M., Vybernaite-Lubiene I., Politi T., Samuiloviene A., Zilius M., Bartoli M., Cardini U. Zebra mussel holobionts fix and recycle nitrogen in lagoon sediments // Front. Microbiol. 2021. V. 11. Art. 610269.
- Richard J.C., Campbell L.J., Leis E.M., Agbalog R.E., Dunn C.D., Waller D.L., Knowles S., Putnam J.G., Goldberg T.L. Mussel mass mortality and the microbiome: evidence for shifts in the bacterial microbiome of a declining freshwater bivalve // Microorganisms. 2021. V. 9. Art. 1976.
- Schols R., Vanoverberghe I., Huyse T., Decaestecker E. Host-bacteriome transplants of the schistosome snail host *Biomphalaria glabrata* reflect species-specific associations // FEMS Microbiol. Ecol. 2023. V. 99. P. 1–9.
- Vinarski M.V., Aksenova O.V., Bepalaya Yu.V., Kondakov A.V., Tomilova A.A., Khrebtova I.S., Gofarov M.Yu., Bolotov I.N. One beringian genus less: a re-assessment of *Pacifimyxa* Kruglov & Starobogatov, 1985 (Mollusca: Gastropoda: Lymnaeidae) questions the current estimates of beringian biodiversity // J. Zool. Syst. Evol. Res. 2021. V. 59. P. 44–59.

---



---

SHORT COMMUNICATIONS

---



---

## Bacterial Communities within the Freshwater Lymnaeid Snail *Kamtschaticana kamtschatica* (Middendorff, 1850) in Northeastern Siberia

A. S. Aksenov<sup>1, 2, \*</sup>, O. Ya. Kisil<sup>1, 2</sup>, A. S. Chervochkina<sup>2</sup>, I. S. Khrebtova<sup>1</sup>,  
K. S. Mantsurova<sup>1, 2</sup>, Yu. V. Bepalaya<sup>1</sup>, and O. V. Aksenova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*N. Laverov Federal Center for Integrated Arctic Research, Ural Branch,  
Russian Academy of Sciences, Arkhangelsk, 163020 Russia*

<sup>2</sup>*Northern (Arctic) Federal University, Arkhangelsk, 163002 Russia*

\*e-mail: a.s.aksenov@narfu.ru

Received October 16, 2023; revised October 27, 2023; accepted October 28, 2023

**Abstract**—This is the first report on microbial communities associated with the freshwater snail *Kamtschaticana kamtschatica* inhabiting diverse types of water basins in Eastern Siberia and the Russian Far East. Using metabarcoding data based on the 16S rRNA gene fragments, taxonomic profiling of bacterial communities associated with snails from three basins of the Magadan Oblast was carried out. Predominant phyla in the studied bacterial communities were *Pseudomonadota*, *Bacillota*, *Cyanobacteriota*, *Actinomycetota*, *Verrucomicrobiota*, *Planctomycetota*, and *Bacteroidota*. The highest alpha-diversity, according to the Chaol index, was revealed in the mollusks from the Orotukan reservoir. The relative abundance of bacteria of the genera *Snowella*, *Leptolyngbya*, *Nodosilinea*, *Arenimonas*, and *Polaromonas* significantly distinguished the mollusks of this habitat from those of the other two. The greatest similarities in the composition of the microbiota in *K. kamtschatica* were found for the genus *Pseudomonas*, which was present in the majority of samples in the amount of more than 1% and was not found in the sediment samples. Obtained data on the diversity and composition of bacterial communities associated with lymnaeid snails are of fundamental importance for the ecology of freshwater mollusks.

**Keywords:** *Lymnaeidae*, 16S rRNA, microbiota, *Mycobacterium*, Magadan Oblast, Kolyma River basin

## ВЛИЯНИЕ МОДИФИКАЦИЙ О-ПОЛИСАХАРИДОВ НА УСПЕШНОСТЬ БАКТЕРИАЛЬНОЙ КОЛОНИЗАЦИИ РАСТЕНИЙ

© 2024 г. Г. Л. Бурьгин<sup>a, b, c, \*</sup>, А. А. Ханина<sup>c</sup>, М. В. Филиппова<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов, ФИЦ “Саратовский научный центр РАН”, Саратов, 410049, Россия

<sup>b</sup>Саратовский исследовательский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, Саратов, 410012, Россия

<sup>c</sup>Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии им. Н.И. Вавилова, Саратов, 410012, Россия

\*e-mail: burygingl@gmail.com

Поступила в редакцию 16.10.2023 г.

После доработки 07.11.2023 г.

Принята к публикации 08.11.2023 г.

О-полисахариды грамотрицательных бактерий — высоко вариабельный компонент молекул липополисахаридов, расположенных на поверхности клеточной стенки и вовлеченных во взаимодействия микроорганизмов с клетками животных и растений. Активность генов профагов часто приводит к различным нестехиометрическим модификациям (метилованию, ацетилированию и другим) гликанов поверхности бактериальных клеток. Доля модифицированных О-полисахаридов возрастает в стационарной фазе роста культуры и приводит к повышению гидрофобности поверхности микробов. Клетки бактерий, различающиеся по гидрофобности, с разной интенсивностью прикрепляются к корням растений. Установлено, что повышение индекса гидрофобности клеток значительно повышает количество адсорбированных микроорганизмов на единицу длины корня. Таким образом, предполагается опосредованное участие генов ацетилтрансфераз и метилтрансфераз вирусного происхождения на успешность колонизации ризосферными бактериями корней растений.

**Ключевые слова:** липополисахарид, О-полисахарид, профаги, ацетилирование, гидрофобность клеток, PGPR, растительно-микробные взаимодействия, бактериальная колонизация корней

DOI: 10.31857/S0026365624020148

Грамотрицательные бактерии на поверхности наружной мембраны содержат липополисахаридные молекулы (ЛПС), занимающие большую часть поверхности клеточной стенки (Lerouge, Vanderleyden, 2002). В состав ЛПС входит липид А, связывающий олигосахарид (кор) и высоко вариабельный О-полисахарид (ОПС). ОПС представляет собой полимер повторяющихся олигосахаридных звеньев, различающихся по моносахаридному составу, гликозидным связям и физико-химическим свойствам. При этом за счет своей экспонированности на поверхности клетки ОПС вовлечен во взаимодействия бактерий с клетками животных и растений (Alexander, Rietschel, 2001).

Почвенные и ризосферные бактерии почти всегда содержат в своем геноме большое количество профагов и других генов, имеющих вирусное происхождение (Roy et al., 2020; Sigida et al., 2020). Активность генов фагов в бактериальных клетках может приводить к модификации ОПС через их

нестехиометрическое метилирование, ацетилирование, глюкозилирование или другие реакции (Lerouge, Vanderleyden, 2002; Sigida et al., 2020; Teh et al., 2020). Подобные изменения поверхностных полисахаридов защищают бактериальные клетки от новых бактериофагов, для которых молекулами узнавания являются немодифицированные ОПС. В свою очередь, введение метильных или ацильных групп в ОПС приводит к повышению гидрофобности бактериальной поверхности и, соответственно, изменению физико-химических свойств клеток. Отражением активности вирусных механизмов модификации бактериальных ОПС может служить преобладание “R-формы” колоний у почвенных грамотрицательных бактерий. Ранее у ризосферного штамма *Azospirillum brasilense* Sp7 была продемонстрирована R-S-диссоциация без характерной для этого процесса у энтеробактерий утраты ОПС (Матора и соавт., 2003). Анализ структуры повторяющихся звеньев ОПС штамма Sp7 показал присутствие нестехиометрического метилирования

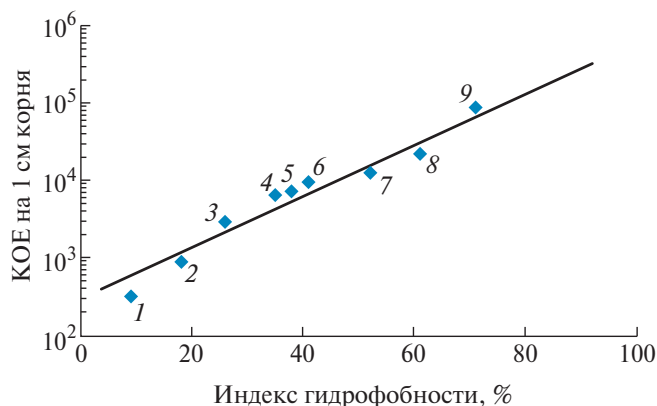


одного из остатков рамнозы (Sigida et al., 2013). Таким образом, повышение степени метилирования ОПС приводит к гидрофобному фенотипу “R-форма”, а снижение — к гидрофильному фенотипу “S-форма”.

Целью данной работы было изучить связь между гидрофобностью бактериальных клеток и их адсорбцией на поверхности корней картофеля, а также рассмотреть возможность участия генов профагов нестехиметрического ацетилирования ОПС в повышении активности колонизации ризосферными бактериями растения-партнера.

В работе были использованы микрорастения картофеля сорта Невский. Штаммы ризобактерий родов *Azospirillum*, *Enterobacter*, *Ensifer*, *Ochrobactrum* и *Pseudomonas* были получены из коллекций ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН. Бактериальные культуры выращивали на малатно-солевой среде (Tkachenko et al., 2015) в течение 18 ч при 35 °С. Клетки дважды отмывали фосфатно-солевым буфером (PBS; pH 7.2). Для определения гидрофобности бактериальных клеток использовали тест сродства к *n*-гексадекану (Krepesky et al., 2003).

Адсорбцию на корнях растений оценивали для бактериальных суспензий с оптической плотностью  $A_{600} = 0.1$  при 600 нм. Десятисуточные микрорастения картофеля (*Solanum tuberosum* L. сорт Невский) из культуры *in vitro* на 30 мин погружали в суспензию бактерий, после чего дважды по 10 мин при встряхивании 120 об./мин отмывали в стерильном PBS. Для каждого варианта для анализа отбирали 10 см корней, из которых получали гомогенат в 1 мл стерильного PBS. Готовили серию десятикратных разведений с последующим высевом на агаризованную малатно-солевою среду.



**Рис. 1.** Зависимость адгезивной активности ризосферных штаммов на корнях картофеля от индекса гидрофобности бактериальных клеток. 1 — *Ensifer adherens* T1Ks14; 2 — *Pseudomonas chlororaphis* K3; 3 — *Enterobacter ludwigii* K7; 4 — *Ochrobactrum cytisi* IPA7.2; 5 — *Azospirillum lipoferum* SR65; 6 — *Ochrobactrum quorumnocens* T1Kг02; 7 — *Azospirillum brasilense* Sp7; 8 — *Azospirillum lipoferum* SR66; 9 — *Azospirillum brasilense* Jm6B2.

Чашки Петри инкубировали в течение 3 сут при 35 °С, после чего подсчитывали количество сформированных колоний для различных разведений.

Результаты соотнесения гидрофобности бактериальных клеток с уровнем их адсорбции на корнях микрорастений картофеля приведены на рис. 1.

Установлена прямая зависимость количества прикрепляемых за 30 мин бактерий от индекса гидрофобности. Так, клетки штаммов с гидрофильной поверхностью (*Ensifer adherens* T1Ks14 и *Pseudomonas chlororaphis* K3) адсорбировались на корнях в незначительном количестве (менее  $10^3$  КОЕ на 1 см корня). Для штаммов со слабогидрофобной поверхностью клеток (*Enterobacter ludwigii* K7, *Ochrobactrum cytisi* IPA7.2, *Azospirillum lipoferum* SR65 и *Ochrobactrum quorumnocens* T1Kг02) выявлено до  $10^4$  КОЕ/см корня. Адсорбция среднегидрофильных штаммов (*Azospirillum brasilense* Sp7 и *Azospirillum lipoferum* SR66) на корнях картофеля была еще выше и составила  $1.3 \times 10^4$  и  $2.2 \times 10^4$  КОЕ/см. И максимальное количество КОЕ на корнях было выявлено для штамма с сильногидрофобными клетками (*Azospirillum brasilense* Jm6B2) —  $8 \times 10^4$  КОЕ/см. Следует отметить, что штаммы *Azospirillum brasilense* Sp7, *A. lipoferum* SR66 и *A. brasilense* Jm6B2 в составе повторяющихся звеньев О-полисахаридов (дополнительные материалы, табл. S1) содержат нестехиометрическое метилирование (Sp7 и Jm6B2) или ацетилирование (SR66) остатков L-рамнозы (Fedonenko et al., 2015), что увеличивает гидрофобность поверхности клеток этих штаммов и повышает адсорбцию на корнях растений.

В литературе описано, что ацетилирование О-полисахарида грамтрицательных ризосферных бактерий снижает активность запуска иммунных реакций растительного партнера при формировании растительно-микробного взаимодействия (Vanacore et al., 2022). Это может приводить к большей выживаемости адсорбированных на поверхности корней бактерий и, как следствие, к более успешной колонизации растений. В связи с тем, что степень метилирования или ацетилирования О-полисахаридов штаммов IPA7.2, Sp7, Jm6B2 и SR66 составляет от 40 до 65% (Fedonenko et al., 2015; Sigida et al., 2020), мы предполагаем, что в оптимальных условиях культивирования бактерий активность модификации гликанов ниже скорости биосинтеза новых О-полисахаридов. Причинами для этого могут быть как недостаток восстановительных субстратов для модификаций, так и сниженная активность генов профагов. Однако при снижении скорости роста бактериальной культуры из-за неоптимальных или стрессовых условиях биосинтез О-полисахарида должен замедляться или останавливаться, что даже при сохранении активности профаговых генов модификации поверхностных гликанов должно приводить к повышению процента модифицированных

повторяющихся звеньев. Тем более что абиотический стресс может быть активатором генов профагов (Choi et al., 2010). Таким образом, бактерии в оптимальных условиях имеют более гидрофильный О-полисахарид, что снижает адсорбцию микробных клеток на корнях растений, а при контакте с растительными клетками активизирует запуск фитоиммунных реакций, приводящих к подавлению бактериальной колонизации поверхности корней. В стрессовых же для бактерий условиях модификации О-полисахаридов приводят к повышению гидрофобности поверхности клеток, что способствует адсорбции бактерий на корнях и снижает уровень фитоиммунных реакций. В итоге бактериальная колонизация растений проходит более успешно. Информация о генетике и физико-химических свойствах клеток ризосферных штаммов должна учитываться при внедрении ризобактерий в качестве биоудобрений в тех вариантах, когда предполагается прикрепление вегетативных бактериальных клеток к растениям.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность О.В. Ткаченко за предоставление растительного материала микроклонов картофеля из *in vitro*-коллекции кафедры «Растениеводство, селекция и генетика» Агрономического факультета Саратовского государственного университета генетики, биотехнологии и инженерии им. Н.И. Вавилова.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 22-26-00293).

#### 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

Матора Л.Ю., Серебренникова О.Б., Петрова Л.П., Бурьгин Г.Л., Щеголев С.Ю. Нетипичный характер R-S диссоциации *Azospirillum brasilense* // Микробиология. 2003. Т. 72. С. 60–63.

Matora L.Y., Serebrennikova O.B., Petrova L.P., Burygin G.L., Shchegolev S.Y. Atypical R–S dissociation in *Azospirillum brasilense* // Microbiology (Moscow). 2003. V. 72. P. 48–51.

Alexander C., Rietschel E.T. Invited review: Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity // J. Endotoxin Res. 2001. V. 7. P. 167–202.

Choi J., Kotay S.M., Goel R. Various physico-chemical stress factors cause prophage induction in *Nitrosospora multiformis* 25196—an ammonia oxidizing bacteria // Water Res. 2010. V. 44. P. 4550–4558.

Fedonenko Y.P., Sigida E.N., Konnova S.A., Ignatov V.V. Structure and serology of O-antigens of nitrogen-fixing rhizobacteria of the genus *Azospirillum* // Russ. Chem. Bull. 2015. V. 64. P. 1024–1031.

Krepesky N., Ferreira R.B.R., Nunes A.P.F., Lins U.G.C., e Silva Filho F.C., de Mattos-Guaraldi A.L., Netto Santos K.R. Cell surface hydrophobicity and slime production of *Staphylococcus epidermidis* Brazilian isolates // Curr. Microbiol. 2003. V. 46. P. 280–286.

Lerouge I., Vanderleyden J. O-antigen structural variation: mechanisms and possible roles in animal/plant–microbe interactions // FEMS Microbiol. Rev. 2002. V. 26. P. 17–47.

Roy K., Ghosh D., DeBruyn J.M., Dasgupta T., Womack K.E., Liang X., Wagner R.E., Radosevich M. Temporal dynamics of soil virus and bacterial populations in agricultural and early plant successional soils // Front. Microbiol. 2020. V. 11. Art. 1494.

Sigida E.N., Fedonenko Y.P., Shashkov A.S., Zdorovenko E.L., Konnova S.A., Ignatov V.V., Knirel Y.A. Structural studies of the O-specific polysaccharide(s) from the lipopolysaccharide of *Azospirillum brasilense* type strain Sp7 // Carbohydr. Res. 2013. V. 380. P. 76–80.

Sigida E.N., Kargapolova K.Y., Shashkov A.S., Zdorovenko E.L., Ponomaryova T.S., Meshcheryakova A.A., Tkachenko O.V., Burygin G.L., Knirel Y.A. Structure, gene cluster of the O-antigen and biological activity of the lipopolysaccharide from the rhizospheric bacterium *Ochrobactrum cytisi* IPA7.2 // Int. J. Biol. Macromol. 2020. V. 154. P. 1375–1381.

Teh M.Y., Furevi A., Widmalm G., Morona R. Influence of *Shigella flexneri* 2a O-antigen acetylation on its bacteriophage Sf6 receptor activity and bacterial interaction with human cells // J. Bacteriol. 2020. V. 202. Art. e00363-20.

Tkachenko O.V., Evseeva N.V., Boikova N.V., Matora L.Y., Burygin G.L., Lobachev Y.V., Shchyogolev S.Y. Improved potato microclonal reproduction with the plant-growth promoting rhizobacteria *Azospirillum* // Agron. Sustain. Develop. 2015. V. 35. P. 1167–1174.

Vanacore A., Vitiello G., Wanke A., Cavasso D., Clifton L.A., Mahdi L., Campanero-Rhodes M.A., Solís D., Wuhrer M., Nicolardi S., Molinaro A. Lipopolysaccharide O-antigen molecular and supramolecular modifications of plant root microbiota are pivotal for host recognition // Carbohydr. Polym. 2022. V. 277. Art. 118839.

## Effect of O-Polysaccharide Modifications on Successful Plant Colonization by Bacteria

G. L. Burygin<sup>1, 2, 3, \*</sup>, A. A. Khanina<sup>3</sup>, and M. V. Filippova<sup>3</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Saratov Scientific Centre of the Russian Academy of Sciences, Saratov, 410049 Russia*

<sup>2</sup>*Saratov State University, Saratov, 410012 Russia*

<sup>3</sup>*Saratov State University of Genetics, Biotechnology, and Engineering named after N.I. Vavilov, Saratov, 410012 Russia*

\*e-mail: burygingl@gmail.com

Received October 16, 2023; revised November 7, 2023; accepted November 8, 2023

**Abstract**—O-polysaccharides of gram-negative bacteria are a highly variable component of the lipopolysaccharide molecules located at the cell wall surface and involved in microbial interaction with plant and animal cells. Activity of prophage genes often results in various non-stoichiometric modifications (methylation, acetylation, etc.) of glycans at bacterial cell surface. The share of modified O-polysaccharides increases during the stationary growth phase and results in increased hydrophobicity of microbial surface. Bacterial cells with different hydrophobicity showed difference in attachment to plant roots. Increased cell hydrophobicity index was found to result in a significant increase in the number of adsorbed microorganisms per unit root length. Thus, acetyl transferase and methyl transferase genes of viral origin may be indirectly involved in successful colonization of plant roots by rhizosphere bacteria.

**Keywords:** lipopolysaccharide, O-polysaccharide, prophages, acetylation, cell hydrophobicity, PGPR, plant-microbial interactions, bacterial root colonization

## ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

ВЛИЯНИЕ МОДИФИКАЦИЙ О-ПОЛИСАХАРИДОВ НА УСПЕШНОСТЬ  
БАКТЕРИАЛЬНОЙ КОЛОНИЗАЦИИ РАСТЕНИЙ© 2024 г. Г. Л. Бурьгин<sup>a, b, c, \*</sup>, А. А. Ханина<sup>c</sup>, М. В. Филиппова<sup>c</sup><sup>a</sup>Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов, ФИЦ “Саратовский научный центр РАН”,  
Саратов, 410049, Россия<sup>b</sup>Саратовский научно-исследовательский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского,  
Саратов, 410012, Россия<sup>c</sup>Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии им. Н.И. Вавилова,  
Саратов, 410012, Россия

\*e-mail: burygingl@gmail.com

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Федоненко Ю.П., Бойко А.С., Здорovenko Э.Л., Коннова С.А., Шашков А.С., Игнатов В.В., Книрель Ю.А. Структурные особенности О-специфических полисахаридов бактерий *Azospirillum* серогруппы III // Биохимия. 2011. Т. 76. № 7. С. 976–982.

Fedonenko Y.P., Boiko A.S., Zdorovenko E.L., Konnova S.A., Shashkov A.S., Ignatov V.V., Knirel Y.A. Structural peculiarities of the O-specific polysaccharides of *Azospirillum* bacteria of serogroup III // Biochemistry (Moscow). 2011. V. 76. P. 797–802.

Boyko A.S., Dmitrenok A.S., Fedonenko Y.P., Zdorovenko E.L., Konnova S.A., Knirel Y.A., Ignatov V.V. Structural analysis of the O-polysaccharide of the lipopolysaccharide from *Azospirillum brasilense* Jm6B2 containing 3-O-methyl-D-rhamnose (D-acofriose) // Carbohydr. Res. 2012. V. 355. P. 92–95.

Fedonenko Y.P., Zdorovenko E.L., Konnova S.A., Kachala V.V., Ignatov V.V. Structural analysis of the O-antigen of

the lipopolysaccharide from *Azospirillum lipoferum* SR65 // Carbohydr. Res. 2008. V. 343. P. 2841–2844.

Filatov A.V., Perepelov A.V., Shashkov A.S., Burygin G.L., Gogoleva N.E., Khlopko Y.A., Grinev V.S. Structure and genetics of the O-antigen of *Enterobacter cloacae* K7 containing di-N-acetylpsuedaminic acid // Carbohydr. Res. 2021. V. 508. Art. 108392.

Sigida E.N., Fedonenko Y.P., Shashkov A.S., Zdorovenko E.L., Konnova S.A., Ignatov V.V., Knirel Y.A. Structural studies of the O-specific polysaccharide(s) from the lipopolysaccharide of *Azospirillum brasilense* type strain Sp7 // Carbohydr. Res. 2013. V. 380. P. 76–80.

Sigida E.N., Kargapolova K.Y., Shashkov A.S., Zdorovenko E.L., Ponomaryova T.S., Meshcheryakova A.A., Tkachenko O.V., Burygin G.L., Knirel Y.A. Structure, gene cluster of the O antigen and biological activity of the lipopolysaccharide from the rhizospheric bacterium *Ochrobactrum cytisi* IPA7.2 // Int. J. Biol. Macromol. 2020. V. 154. P. 1375–1381.



Таблица S1. Структуры повторяющихся олигосахаридных звеньев O-полисахаридов использованных в работе штаммов.

Штамм	Структура повторяющихся звеньев O-полисахарида	Примечание
<i>Ensifer adhaerens</i> T1Ks14	Нет данных	
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> K3	$\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-GalpNAc-(1}\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-QuipNAc-(1}\rightarrow 6)\text{-}\alpha\text{-D-GlcpNAc-(1}\rightarrow$ $\beta\text{-D-GlcpNAc-(1}\rightarrow 3)$	Предварительные неопубликованные данные
<i>Enterobacter ludwigii</i> K7	$\rightarrow 8)\text{-}\beta\text{-Psep5Ac7Ac-(2}\rightarrow 2)\text{-}\beta\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-Galp-(1}\rightarrow$ $\sim 50\% \text{ } \beta\text{OAc}$	Filatov et al., 2021
<i>Ochrobactrum cytisi</i> IPA7.2	$\rightarrow 6)\text{-}\alpha\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-ManpNAcA-(1}\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-GlcpNAc-(1}\rightarrow$ $3\text{OAc}$	Sigida et al., 2020
<i>Azospirillum lipoferum</i> SR65	$\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow$ $\beta\text{-D-Glcp-(1-3)}$	Fedonenko et al., 2008
<i>Ochrobactrum quorutnocens</i> T1Kr02	$\rightarrow 2)\text{-}\beta\text{-D-Fucf-(1}\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-Fucp-(1}\rightarrow 2)\text{-}\beta\text{-D-Fucf(1}\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-Fucp-(1}\rightarrow$ $3$ $\text{OAc}$	Предварительные неопубликованные данные
<i>Azospirillum brasilense</i> Sp7	$\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-GlcpNAc-(1}\rightarrow$ $2$ $\text{OMe} \sim 40\%$ $\alpha\text{-D-Rhap}$ $1$ $1$ $3$ $\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-Fucp}$ $\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-Fucp-(1}\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-Xylp-(1}\rightarrow$	Sigida et al., 2013
<i>Azospirillum lipoferum</i> SR66	$\beta\text{-D-Glcp}$ $1$ $3$ $\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow$ $\text{OAc} \sim 60\text{--}65\%$ $1$ $2$	Федоненко с соавт., 2011
<i>Azospirillum brasilense</i> Jm6B2	$\alpha\text{-D-Rhap3OMe} \sim 50\%$ $1$ $1$ $3$ $\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-Fucp-(1}\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-Xylp-(1}\rightarrow$	Boyko et al., 2012

## ПЕПТИДНЫЕ ПАТТЕРНЫ МАМР БАКТЕРИАЛЬНЫХ ФЛАГЕЛЛИНОВ И ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С РАСТИТЕЛЬНЫМИ РЕЦЕПТОРАМИ: БИОИНФОРМАТИЧЕСКИЙ И КОЭВОЛЮЦИОННЫЙ АСПЕКТЫ

© 2024 г. С. Ю. Щеголев<sup>а, \*</sup>, Г. Л. Бурыгин<sup>а</sup>, Ю. В. Красова<sup>а</sup>, Л. Ю. Маторы<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов, ФИЦ “Саратовский научный центр РАН”, Саратов, 410049, Россия

\*e-mail: shegolev\_s@ibppm.ru

Поступила в редакцию 04.09.2023 г.

После доработки 24.10.2023 г.

Принята к публикации 13.11.2023 г.

В аминокислотных последовательностях флагеллинов представителей фитопатогенной ассоциативной и клубеньковой микрофлоры идентифицированы консервативные мотивы (пептидные паттерны), определяющие элиситорные свойства фитопатогенных бактерий. У PGPR выявлены аналоги одного (flg22) из двух (flg22 и flgII-28) специфических пептидов, характерных для патогенов. Вместо глицина G18, являющегося признаком элиситора, в аналогах flg22 у большинства PGPR идентифицирован тирозин Y18, что препятствует растению задействовать для PGPR механизм фитоиммунитета. Молекулярный докинг с применением программного комплекса AlphaFold продемонстрировал достоверность взаимодействий растительного рецептора FLS2 с каноническим пептидом flg22 и его аналогами из фитопатогена и азоспириллы. Однако в случае растительного рецептора FLS3 достоверными оказались только его взаимодействия с каноническим пептидом flgII-28 и его аналогом из фитопатогена.

**Ключевые слова:** PGPR, фитопатогены, бактериальные флагеллины, пептидные паттерны, элиситорные свойства, фитоиммунитет, растительные рецепторы, коэволюционные изменения, молекулярный докинг

DOI: 10.31857/S0026365624020155

Ассоциированные с микробами молекулярные паттерны МАМР (РАМР для фитопатогенов) представляют собой высоко консервативные пептидные мотивы во флагеллинах бактерий, распознаваемые поверхностными рецепторами растительных клеток (Felix et al., 1999). В случае патогенов это приводит к запуску систем фитоиммунитета (Fliegmann, Felix, 2016) с участием обогащенного лейцином киназного рецептора FLS2, вовлеченного в восприятие пептида из N-концевой части бактериального флагеллина, состоящего из 22 аминокислотных остатков (ao) (flg22) (Gómez-Gómez, Boller, 2000), и FLS3, взаимодействующего с другим пептидом длиной 28 ao (flgII-28) из той же части флагеллина (Hind et al., 2016). В работе (Cai et al., 2011) отмечается, что появление во флагеллине фитопатогенов характерного паттерна flgII-28 может быть обусловлено реакцией растений на ослабление FLS2+flg22-зависимого иммунитета при коэволюционных изменениях в геномах организмов.

Взаимодействие МАМР с растительными рецепторами является одной из основ механизма ассоциативных/симбиотических растительно-микробных отношений (Проворов и соавт., 2018).

Однако для широкого круга стимулирующих рост растений ризобактерий (PGPR) наличие указанных выше паттернов и их взаимодействия с растительными рецепторами практически мало изучены.

В данной работе нами была проведена сравнительная идентификация МАМР во флагеллинах различных типов — белке полярного (FliC) и латерального (LafI) жгутиков, соединительном белке крюка с филаментом (FlgL), весьма сходном в 3D-структуре с флагеллином (Hu, Reevesa, 2020) — у представителей фитопатогенной, ассоциативной и клубеньковой микрофлоры. При этом мы принимали во внимание отличия в размерах молекул среди флагеллинов одного и того же типа. В статье Thomson et al. (2018) дано много примеров бактериальных жгутиковых систем с флагеллинами, размеры которых варьируют в широких пределах и нередко значительно превышают общеизвестные, достигая порядка 1000 ao и выше. В таких случаях для обозначения размера белка мы использовали нижний индекс, к примеру, FliC<sub>274</sub>, FliC<sub>621</sub> и т.д.

Нашей целью было выяснение мотивов в последовательностях флагеллинов, определяющих наличие или отсутствие у них элиситорных (связанных с иммунитетом растений) свойств, и оценка взаимодействий МАРП с растительными рецепторами методом молекулярного докинга.

В качестве канонических образцов МАРП использованы аминокислотные последовательности пептидов flg22 и flgII-28, являющихся фрагментами флагеллинов FliC, соответственно, из животного патогена *Pseudomonas aeruginosa* ATCC700888 и фитопатогена *P. syringae* pv. tomato T1. Аминокислотная последовательность пептида flg22 идентична соответствующему участку флагеллинов многих штаммов рода *Pseudomonas*, включая указанный выше штамм, выделенный из промышленных вод. Учитывая его принадлежность к виду синегнойной палочки, данный штамм был условно отнесен нами к животным патогенам, при том, что известно его выраженное элиситорное действие на ряд растений (Felix et al., 1999; Gomez-Gomez, Boller, 2000), дабы отличить его от признанных фитопатогенов и PGPR. Примеры взаимодействий энтеробактерий с растениями приведены также в работе (Garcia et al., 2014). Со стороны растений использованы последовательности рецепторов FLS2 и FLS3, соответственно, из *Arabidopsis thaliana* L. и *Solanum lycopersicum* L.

Были задействованы наборы из базы данных GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) десятков гомологичных последовательностей FliC, FlaI и FlgL представителей патогенной микрофлоры, использованных в работе (Garcia et al., 2014), и PGPR семейств *Azospirillaceae*, *Brucellaceae* и *Rhizobiaceae*. При необходимости для указания длины аминокислотной последовательности белка в его обозначении использовали нижний индекс (см. выше).

Множественные выравнивания последовательностей (МВП) белков проводили с использованием программы Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo>). Логотип, соответствующий МВП с гомологичными последовательностями, получали с помощью программы Blast2logo (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?Blast2logo-1.1>). Предсказания 3D-структур белковых комплексов (молекулярный докинг) выполняли с применением программы AlphaFold2 в варианте AlphaFold-Multimer (<https://github.com/deepmind/alphafold#running-alphafold-multimer>), инсталлированной в вычислительном центре Саратовского госуниверситета (СГУ) (Щеголев и соавт., 2022). Достоверность предсказаний оценивали по параметру pDockQ с помощью программы FoldDock (<https://github.com/ElofssonLab/FoldDock>). Физико-химические свойства границ раздела между взаимодействующими белковыми структурами анализировали с программой PDBePISA ([https://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot\\_int/pistart.html](https://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot_int/pistart.html)). Визуализацию 3D-структур белков и их комплексов осуществляли с применением программы Jmol (<http://www.jmol.org>).

Расположение пептидов в высококонсервативных N-концевых доменах флагеллинов в пределах 30–51 ао (flg22) и 84–111 ао (flgII-28) характеризует логотип МВП на рис. S1 в дополнительных материалах, полученный нами с последовательностью FliC *P. aeruginosa* ATCC700888 и пятьюстами гомологичными последовательностями. Он иллюстрирует весьма существенное отличие в уровне консервативности N- и C-концевых участков белков от их высоковариабельной промежуточной части.

Результаты биохимических исследований и рентгеноструктурного анализа в работах (Garcia et al., 2014; Sun et al., 2013) продемонстрировали ключевую роль глицина G18 в 18-й позиции последовательности пептида flg22 в образовании тройного комплекса FLS2+flg22 с корцептором ВАК1, необходимого для запуска реакций фитоиммунитета. Мутационная замена G18 на иной остаток в аналогах flg22 делает невозможным проявление элиситорных свойств носителями такого пептида.

На дополнительном рис. S2 представлен фрагмент полученного нами МВП для флагеллинов из патогенов и PGPR семейства *Azospirillaceae*, иллюстрирующий такую замену во флагеллинах представителей PGPR. Это исключает образование отмеченного выше тримера, но не препятствует взаимодействиям между FLS2 и аналогами flg22 (Sun et al., 2013), что может служить сигналом для растения к установлению ассоциативных взаимоотношений с представителями PGPR (Проворов и соавт., 2018).

Полученные нами МВП с десятками белковых последовательностей показали, что пара специфических пептидов типа flg22 и flgII-28 неизменно присутствует во флагеллинах патогенной микрофлоры, в то время как у представителей семейства *Azospirillaceae*, *Brucellaceae* и *Rhizobiaceae* в подавляющем большинстве случаев регистрируется только flg22. Неожиданным исключением оказался лишь “короткий” флагеллин FliC<sub>274</sub> представителей семейства *Azospirillaceae* размером 274 ао (в отличие от “длинного” FliC<sub>621</sub> размером около 600 ао), в составе которого были выявлены аналоги обоих пептидов flg22 и flgII-28 (рис. 1; А, В). Более того, в составе его аналогов flg22 в 18-й позиции оказался глицин G18 (рис. 1; А), что характерно для фитопатогенов. Эти факты переводят “короткий” флагеллин представителей *Azospirillaceae* в категорию элиситоров, в то время как сами эти бактерии проявляют себя в качестве несомненных PGPR.

Из литературы известны примеры образования гетерогенных филаментов флагеллинов бактерий и архей из белков с разными размерами и структурой. Среди вероятных причин для формирования жгутиков сложного состава отмечается расширение набора средств для взаимодействия бактерий с другими организмами. Например, с бактериофагами для уклонения от фаговой инфекции и др. Результаты молекулярного моделирования (дополнительный





**Рис. 1.** Фрагменты МВП с пептидами flg22 (A, C), flgII-28 (B) и последовательностями FliC<sub>274</sub> из представителей *Azospirillaceae* (A, B); фрагмент МВП с пептидом flg22 и последовательностями FliC из представителей PGPR (C). A. — *Azospirillum*, B. — *Brucella*, S. — *Sinorhizobium*.

рис. S3) для двух штаммов *Azospirillum*, целью которого была оценка принципиальной возможности образования комплексов FliC<sub>621</sub>+FliC<sub>274</sub>, дают основания предположить использование подобного механизма азоспириллами. Однако, в целом, роль “короткого” флагеллина у представителей *Azospirillaceae*, проявившего признаки элиситора, и возможность его вклада в формирование жгутика на сегодняшний день не выяснены и требуют дополнительных исследований.

На рис. 1 (ряд C) приведен пример МВП с флагеллинами PGPR, иллюстрирующий замену G18 на тирозин Y18 в аналогах flg22 у представителей бруцелл и ризобий. В дополнительных материалах (рис. S4–S6) приведены результаты выявления паттернов flg22 и flgII-28 в более широком круге объектов из ассоциативной и клубеньковой микрофлоры: флагеллинах латеральных жгутиков *Azospirillum* и флагеллинах представителей *Brucellaceae* и *Rhizobiaceae*. В них продемонстрирована универсальность замены G18 на Y18 в аналогах flg22 и отсутствие аналогов пептида flgII-28 во флагеллинах PGPR. В соединительных белках FlgL во всех рассмотренных нами таксонах аналоги специфических пептидов flg22 и flgII-28 не обнаружены. Для иллюстрации этого на дополнительных рис. S7, S8 приведены примеры для азоспирилл. С учетом специфической роли FlgL и его исчезающе мало-го количества в жгутике по сравнению с десятками

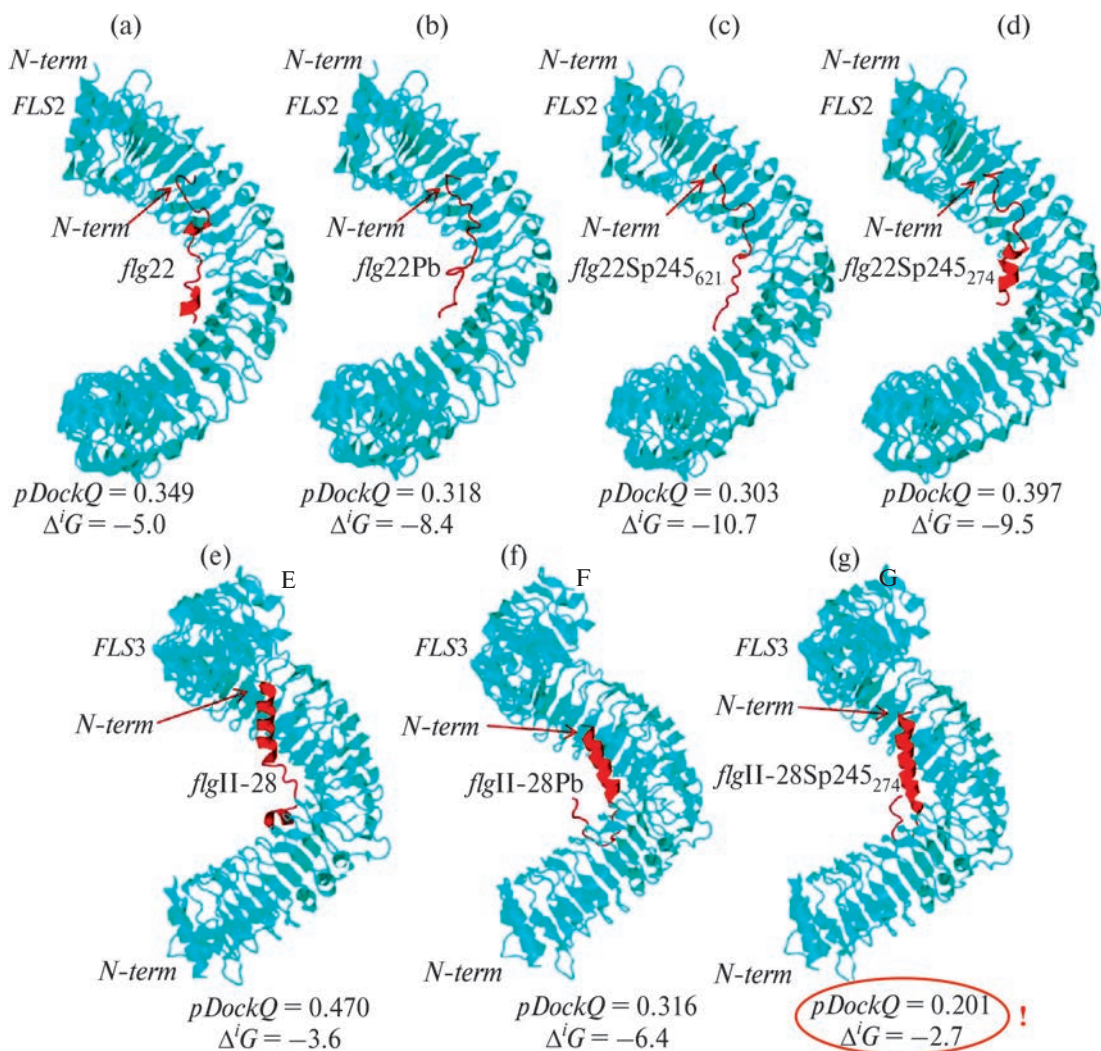
тысяч основных белков филамента, данный результат можно рассматривать в качестве свидетельства эффективности (отрицательного контроля) использованной нами методики выявления flg22 и flgII-28.

На рис. 2 показаны результаты молекулярного докинга, нацеленные на выяснение принципиальной возможности и особенностей взаимодействий выявленных нами аналогов специфических пептидов flg22 и flgII-28 из фитопатогена (*Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043) и ассоциативной бактерии (*Azospirillum balidaniorum* Sp245) с растительными рецепторами FLS2 и FLS3.

В случае димера FLS2+flg22 (рис. 2; A–D) все представленные здесь пары по критерию pDockQ ≥ 0.23 (Bryant et al., 2022) относятся к категории истинно взаимодействующих протеинов. Однако для FLS3+flgII-28 эффективными по этому критерию (рис. 2; E, F) следует признать взаимодействия специфических пептидов с растительными рецепторами только для патогенов. В то время как для аналога flgII-28 из “короткого” флагеллина азоспириллы (рис. 2; G) предсказанная модель не может считаться достоверной (pDockQ < 0.23, выделено овалом на рис. 2; G).

Эти выводы согласуются с результатами независимых оценок интерфейсов взаимодействий, полученных с помощью программы PDBePISA. Изменения





**Рис. 2.** Молекулярный докинг растительных рецепторов FLS2 (*Ar. thaliana*) (A–D), FLS3 (*S. lycopersicum*) (E–G) с бактериальными пептидами flg22 (A–D), flgII-28 (E–G) и их аналогами из фитопатогена и PGPR: *P. aeruginosa* ATCC700888 (A); *Pc. atrosepticum* SCRI1043 (B, F); *A. baldaniorum* Sp245, “длинный” флагеллин (C); *A. baldaniorum* Sp245, “короткий” флагеллин (D, G); *P. syringae* pv. *tomato* T1 (E). Овалом на рис. 2; G, выделены значения параметров, свидетельствующие о неэффективности взаимодействия для данной пары — рецептор + пептид.

свободной энергии сольватации  $\Delta^iG$  (ккал/моль), представленные на рис. 2, свидетельствуют об эффективности взаимодействий в шести из семи рассмотренных вариантов (рис. 2; A–F). В отличие от них, самопроизвольное образование комплекса специфического пептида из “короткого” флагеллина азоспириллы с растительным рецептором FLS3 (рис. 2; G) по механизму гидрофобных взаимодействий оказывается невозможным ( $\Delta^iG > 0$ , выделено овалом на рис. 2; G).

Полученные результаты представляются достаточно обоснованными с коэволюционной точки зрения. В случае фитопатогена специфическое связывание рецептора с дополнительным паттерном flgII-28 нацелено на обнаружение патогена с усилением фитоиммунитета. Однако в случае PGPR у растения нет причин для столь строгого контроля за возможной

“мимикрией” микропартнера с целью избежать действия фитоиммунитета, чем, вероятно, можно объяснить отсутствие аналогов flgII-28 в “длинном” флагеллине у представителей семейства *Azospirillaceae*. Несмотря на наличие в “коротком” флагеллине азоспириллы обоих паттернов flg22 и flgII-28, азоспириллы не проявляют себя как фитопатогены. Так что коэволюционные с растениями изменения в геномах данных представителей почвенной микрофлоры не должны достигать того состояния, при котором возможное взаимодействие дополнительного пептида flgII-28 с рецептором FLS3 могло бы послужить сигналом к проявлению фитоиммунитета.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность К.С. Тихонову и Д.К. Андрейченко за установку в вычислительном центре СГУ и помощь в использовании AlphaFold-Multimer и сопутствующего программного обеспечения.

## 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

Проворов Н.А., Тихонов И.А., Воробьев Н.И. Симбиоз и симбиогенез. СПб.: Информ-Навигатор, 2018. 464 с.

Шеголев С.Ю., Тихонов К.С., Андрейченко Д.К. Об опыте инсталляции и использования программного комплекса AlphaFold2 и его оптимизированных версий для определения 3D-структур белков и белковых комплексов // Методы компьютерной диагностики в биологии и медицине — 2022: Сборник статей Всероссийской школы-семинара / Ред. Ан.В. Скрипаль. Саратов: Изд-во "Саратовский источник", 2022. С. 100–106.

Bryant P., Pozzati G., Elofsson A. Improved prediction of protein-protein interactions using AlphaFold2 // Nat. Commun. 2022. V. 13. Art. 1265. P. 1–11.

Cai R., Lewis J., Yan S., Liu H., Clarke C.R., Campanile F., Almeida N.F., Studholme D.J., Lindeberg M., Schneider D., Zaccardelli M., Setubal J.C., Morales-Lizcano N.P., Bernal A., Coaker G., Baker C., Bender C.L., Leman S., Vinatzer B.A. The plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. tomato is genetically monomorphic and under strong selection to evade tomato immunity // PLoS Pathog. 2011. V. 7. Art. e1002130. P. 1–15.

Felix G., Duran J.D., Volko S., Boller T. Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin // Plant J. 1999. V. 18. P. 265–276.

Fliegmann J., Felix G. Immunity: flagellin seen from all sides // Nature Plants. 2016. V. 2. Art. 16136. P. 1–2.

Garcia A.V., Charriera A., Schikorab A., Bigearda J., Pateyronc S., de Tauzia-Moreau M.-L., Evrarda A., Mithöferd A., Martin-Magnietea M. L., Virlogeux-Payantg I., Hirta H. *Salmonella enterica* flagellin is recognized via FLS2 and activates PAMP-triggered immunity in *Arabidopsis thaliana* // Mol. Plant. 2014. V. 7. P. 657–674.

Gómez-Gómez L., Boller T. FLS2: a LRR receptor-like kinase involved in recognition of the flagellin elicitor in *Arabidopsis* // Mol. Cell. 2000. V. 5. P. 1–20.

Hind S.R., Strickler S.R., Boyle P.C., Dunham D.M., Bao Z., O'Doherty I.M., Baccile J.A., Hoki J.S., Viox E.G., Clarke C.R., Vinatzer B.A., Schroeder F.C., Martin G.B. Tomato receptor FLAGELLIN-SENSING 3 binds flgII-28 and activates the plant immune system // Nature Plants. 2016. V. 2. Art. 16128. P. 1–8.

Hu D., Reeves P.R. The remarkable dual-level diversity of prokaryotic flagellins // mSystems. 2020. V. 5. Art. e00705-19.

Sun Y., Li L., Macho A.P., Han Z., Hu Z., Zipfel C., Zhou J.-M., Chai J. Structural basis for flg22-induced activation of the *Arabidopsis* FLS2-BAK1 immune complex // Science. 2013. V. 342. P. 624–628.

Thomson N.M., Rossmann F.M., Ferreira J.L., Matthews-Palmer T.R., Beeby M., Pallen M.J. Bacterial flagellins: does size matter? // Trends Microbiol. 2018. V. 26. P. 575–581.

## SHORT COMMUNICATIONS

## The MAMP Peptide Patterns of Bacterial Flagellins and Their Interaction with Plant Receptors: Bioinformatic and Coevolutionary Aspects

S. Yu. Shchyogolev<sup>1</sup>\*, G. L. Burygin<sup>1</sup>, Yu. V. Krasova<sup>1</sup>, and L. Yu. Matora<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Saratov Scientific Centre of the Russian Academy of Sciences, Saratov, 410049 Russia

\*e-mail: shegolev\_s@ibppm.ru

Received September 4, 2023; revised October 24, 2023; accepted November 13, 2023

**Abstract**—Conservative motifs (peptide patterns) determining the elicitor properties of plant-pathogenic bacteria were revealed in amino acid sequences of the flagellins of phytopathogenic, associated, and root nodule microflora. In plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR), analogs of one (flg22) out of two (flg22 and flgII-28) specific peptides, characterizing pathogens were revealed. Instead of glycine G18, characteristic of an elicitor, tyrosine Y18 was identified in flg22 analogs of most PGPR, which prevents actuation of the phytoimmunity mechanism against PGPR. Molecular docking with the AlphaFold software complex demonstrated reliability of the interaction between the plant receptor FLS2 and the canonical peptide flg22 and its analogs from a plant pathogen and an *Azospirillum*. However, in the case of the FLS3 plant receptor only its interactions with the canonical peptide flgII-28 and its analog from the plant pathogen were reliable.

**Keywords:** PGPR, plant pathogens, bacterial flagellins, peptide patterns, elicitor properties, phytoimmunity, plant receptors, coevolutionary modifications, molecular docking

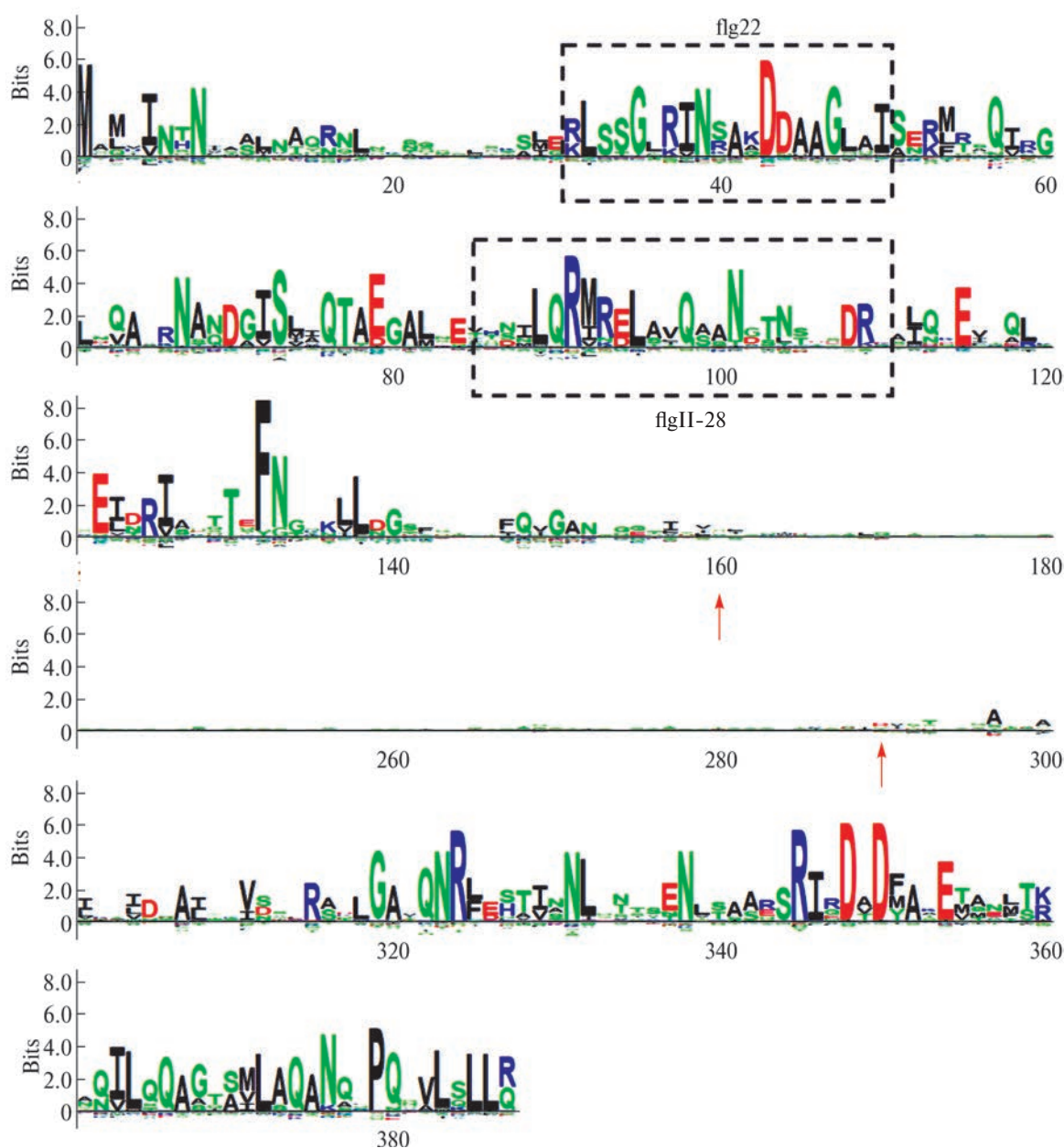
## ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

### ПЕПТИДНЫЕ ПАТТЕРНЫ МАМР БАКТЕРИАЛЬНЫХ ФЛАГЕЛЛИНОВ И ИХ КОЭВОЛЮЦИОННЫЙ АСПЕКТЫ

© 2024 г. С. Ю. Щеголев<sup>а,\*</sup>, Г. Л. Бурьгин<sup>а</sup>, Ю. В. Красова<sup>а</sup>, Л. Ю. Матора<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов, ФИЦ “Саратовский научный центр РАН”,  
Саратов, 410049, Россия

\*e-mail: shegolev\_s@ibppm.ru



**Рис. S1.** Фрагменты логотипа профиля последовательности FlhC из *P. aeruginosa* ATCC 700888 с 500 гомологичными последовательностями демонстрируют весьма существенное отличие уровня консервативности N- и С-концевых участков белков от их высоковариабельной промежуточной части, отмеченной стрелками, в которой сигнал логотипа исчезающе мал по сравнению с остальными частями логотипа.



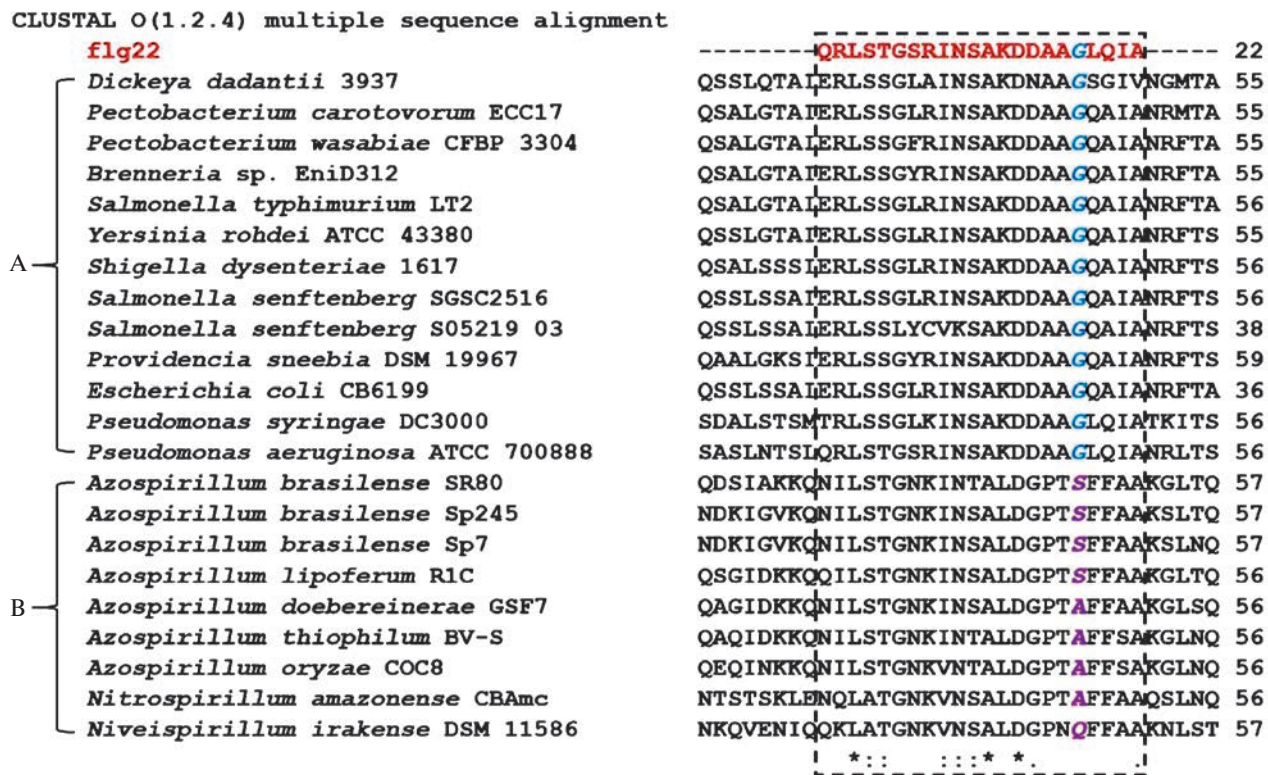


Рис. S2. Фрагмент множественного выравнивания последовательностей (МБИ) с flg22 для FliC бактерий — патогенных (A) и PGPR семейства *Azospirillaceae* (B) — демонстрирует присутствие у патогенов остатка G18 — ключевого для наличия у них элиситорных свойств — но замену его иными остатками у *Azospirillaceae*.

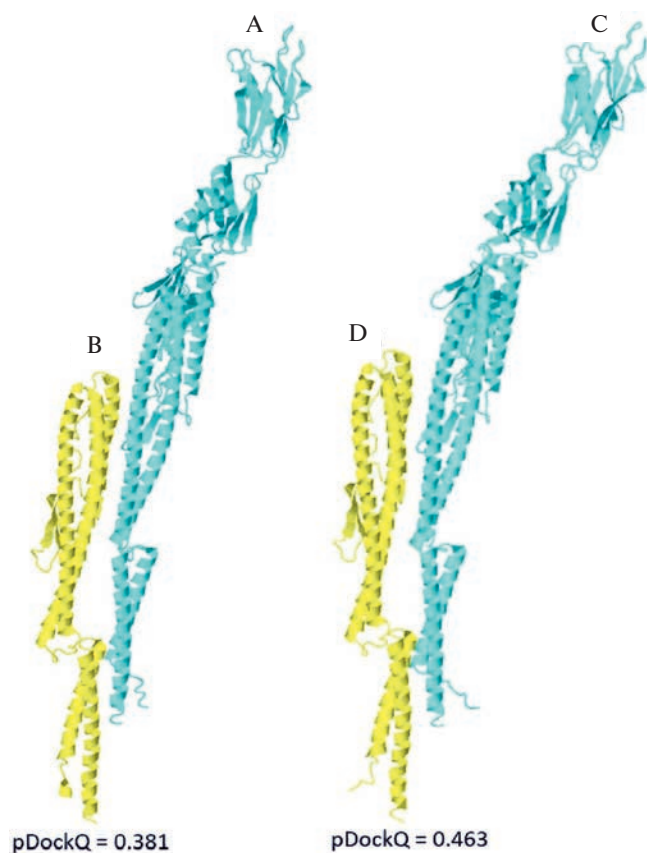


Рис. S3. 3D-модели AlphaFold-Multimer димерных комплексов FliC<sub>621</sub> (A, C)+FliC<sub>274</sub> (B, D) для *A. brasilense* Sp7 (A, B) и *A. baldaniorum* Sp245 (C, D). Значения pDockQ ≥ 0.23 свидетельствуют о достаточно высоком качестве моделирования и о принципиальной принадлежности димера FliC<sub>621</sub>+FliC<sub>274</sub> к категории истинно взаимодействующих белков (Bryant *et al.*, 2022).



```

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment
flg22 -----QRLSTGSRINSAKDDAAGLQIA----- 22
...
A. rugosum IMMIB AFH-6 MASIMTNTSAMTALQTLRRVTDDLATTODRISTGLKVNNAKDNAAYWSIAITMRADVAGF 60
A. formosense CC-NFb-7 MASIMTNTSAMTALQTLRRVTDDLATTODRISTGLKVNNAKDNAAYWSIAITMRADVAGF 60
...
A. baldaniorum Sp245 MASIMTNTSAMTALQTLRRVTDDLATTODRISTGLKVNNAKDNAAYWSIAITMRADVAGF 60
...
A. brasilense Sp7 MASIMTNTSAMTALQTLRRVTDDLATTODRISTGLKVNNAKDNAAYWSIAITMRADVAGF 60
...
A. halopraeferens DSM 3675 MASILTNASAMTALQTLRRVTGDLATTODRISTGLKVNNAKDNAAYWSIAITMKADVAGF 60
...
A. thiophilum BV-S MASIMTNTSAMTALQTLRRVTGDLETTDRISTGLKVNNAKDNAAYWSIAITMKADVAGF 60
A. ramasamyi M2T2B2 MASIMTNTSAMTALQTLRRVTGDLETTDRISTGLKVNNAKDNAAYWSIAITMKADVAGF 60
...
A. melinis TMCY0552 MASIMTNTSAMTALQTLRRVTGDLETTDRISTGLKVNNAKDNAAYWSIAITMKADVAGF 60
...
A. humicireducens SgZ-5 MASIMTNTSAMTALQTLRRVTGDLETTDRISTGLKVNNAKDNAAYWSIAITMKADVAGF 60
A. lipoferum 4b MASIMTNTSAMTALQTLRRVTGDLETTDRISTGLKVNNAKDNAAYWSIAITMKADVAGF 60
...
35 lines
:*** :*.***:* **
    
```

Рис. S4. Фрагмент МВП с flg22 для флагеллина FliC<sub>414</sub>=LafI латерального жгутика представителей рода *Azospirillum* демонстрирует замену глицина G18 на тирозин Y18, что исключает наличие у LafI элиситорных свойств. Показанные строки отражают видовое разнообразие использованных объектов. МВП с *тем же* набором последовательностей LafI показало отсутствие в них аналогов flgII-28.

```

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment
flg22 -----QRLSTGSRINSAKDDAAGLQIA----- 22
B. haematophila MASILTNSALTALQTLAATNKALETTNRISTGLRIGEASDNAAYWSIAITSMTSDNKAN 60
...
Ochrobactrum quorumnocens MASILTNSALTALQTLSSSTNKSLETTNRISTGLRIGEADNAAYWSIAITSMKSDNKAN 60
...
B. intermedia MASILTNSALTALQTLSSSTNKALESTNRISTGLKVAGASDNAAYWSIAITMRSDNKAN 60
O. soli MASILTNSAALTALQTLSTTNKSLEATNRISTGLKVAGASDNAAYWSIAITMRSDNKAN 60
B. tritici MASILTNSALTALQTLSSSTNKALESTNRISTGLKVAGASDNAAYWSIAITMRSDNKAN 60
...
O. teleogrylli MASILTNSAALTALQTLSTTNKSLEATNRISTGLKVAGASDNAAYWSIAITMRSDNKAN 60
...
B. anthropi MASILTNSALTALQNLATTNKALETTGRISTGLRIGEASDNAAYWSIAITMKSDNKAN 60
B. pecoris MASLLTNSALTALQNLASTNRSLETTGRISTGLRVGEAADNAAYWSIAITMRSDNKAN 60
...
B. cytisi MASLLTNSALTALQNLASTNRSLETTGRISTGLRVGEAADNAAYWSIAITMRSDNKAN 60
B. pseudintermedia MASLLTNSALTALQNLASTNRALETTGRISTGLRVGEAADNAAYWSIAITMRSDNKAN 60
...
35 lines
*:* ** : : * * : : .**
    
```

Рис. S5. Фрагмент МВП с flg22 для FliC<sub>300</sub> представителей семейства *Brucellaceae* демонстрирует замену глицина G18 на тирозин Y18, что исключает наличие у FliC<sub>300</sub> элиситорных свойств. Показанные строки отражают видовое разнообразие использованных объектов. МВП с *тем же* набором последовательностей FliC<sub>300</sub> показало отсутствие в них аналогов flgII-28.





## CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

flgII-28          1  ------ESTNIIQRMRE------L-----          12
WP_029009299.1  180  LILEYGVTDADNPAIEKALRAINLLATMPDTPIDTDRVNEAAEELADAASDALTVVQTRLGA 239
WP_094302698.1  178  LIVQYGVTDADDPSEIEKALRSISLIANMSTDPVDTALVDEASDLADEAADGLTVVQTKLGS 237
WP_137140038.1  178  LIVQYGVTDADDPSEIEKALRSISLIANMSTDPVDTALVDEASDLADAAADGLTVVQTKLGS 237
WP_109070079.1  178  LIIQYGVTDADDPSEIEKALRSISLIANMSTDPVDTALVDEASDLADAAADGLTVVQTTLGS 237
WP_119507627.1  178  LIVQYGVTDADDPSEIEKALRSISLIANMSTNPVDTALVDEASDLADAAADRLTVVQTKLGS 237
...
WP_109048479.1  178  FVLSYGVTDADQPAFEKALRAFSLIANMSTDPVDTDLLAEATQLASDATDGLSIVQAKLGA 237
WP_109447154.1  178  FVLSYGVTDADQPAFEKALRAFSLIANMSTDPVDTDLLAEATQLASDATDGLSIVQAKLGA 237
WP_127001928.1  179  LILSYGVTDADQPAFEKALRAFNLIANLQTDVDTDLAEATKLASDSTDALAVTQAKLGA 238
WP_126616929.1  181  LILSYGVTDADQPAFEQALRAFNLIANMSTSPVDTDVLDEATQLASDATDGLSIVQAKLGA 240
WP_119828889.1  181  LILSYGVTDADQPAFEKALRAFNLIANLTTTPVDDDLVDEASQLASDATDGLAVTQAKLGA 240
                                     .: .: :  :
                                     *

35 lines

flgII-28          13  ------AVQSRNDSNSATDRDA------          28
WP_029009299.1  240  TSATLERTIDRHLEEQVLVLETRVDDVRAIDLAEAAATRASQLRTSLEATLSLIRLETTLNL 299
WP_094302698.1  238  ASATLERTIDRHLEEQVLVQTHVEDIRNIDLAEATTRLSQLQANLESTMSLMKILQQTNL 297
WP_137140038.1  238  ASATLERTIDRHLEEQVLVQTHVEDIRNIDLAEATTRLSQLQANLESTMSLMKILQQTNL 297
WP_109070079.1  238  ASATLERTIDRHLEEQVLVQTHVEDIRNIDLAEATTRLSQLQANLESTLSLMKILQQTNL 297
WP_119507627.1  238  ASATLERTIDRHLEEQVLVQTHVEDIRNIDLAEATTRLSQLQANLESTMSLMKILQQTNL 297
...
WP_109048479.1  238  ASSSLENTIDRHVDEQVLVLTQVEDIRSVDLAESTTKLSQLQASLEATMSLMKILEENNL 297
WP_109447154.1  238  ASSSLENTIDRHVDEQVLVLTQVEDIRSVDLAESTTKLSQLQASLEATMSLMKILEENNL 297
WP_127001928.1  239  SSASLERTIDRHVDEQVLVQSHVDDIRSVDLAESTTRLSQLQASLEATMSLMKILEENNL 298
WP_126616929.1  241  TSASLERTIDRHVDEQVLVQTHVDDIRSVDLAESTVRLSQLQASLEATMSLMKILEDTSL 300
WP_119828889.1  241  TSASLERTIDRHVDEQVLVQTHVDDIRSVDLAESTTRLSQLTASLEATMSLMNSLEENSL 300
                                     .: : : .:
                                     *

35 lines

```

**Рис. S8.** Фрагменты МВП с flgII-28 для FlgL представителей рода *Azospirillum* демонстрируют отсутствие в данных белках структур, гомологичных пептиду flgII-28, поскольку выровненными являются лишь отдельные, разделенные брешами части flgII-28 в областях МВП за пределами высококонсервативного участка, соответствующего flgII-28 во флагеллине Flc бактерий (см. рис. S1), весьма сходного в 3D-структуре с FlgL (Hu, Reevesa, 2020).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bryant P., Pozzati G., Elofsson A. Improved prediction of protein-protein interactions using AlphaFold2 // Nat. Commun. 2022. V. 13. № 1265. P. 1–11.
2. Hu D., Reevesa P.R. The remarkable dual-level diversity of prokaryotic flagellins // mSystems. 2020. V. 5. № 5. e00705-19.

УДК 579.255+579.258: 579.222.4

## ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА P450-МОНООКСИГЕНАЗЫ ГРИБА *CURVULARIA* SP. В БАКТЕРИЯХ *ESCHERICHIA COLI* И ПОДТВЕРЖДЕНИЕ ФУНКЦИИ 7-ГИДРОКСИЛИРОВАНИЯ

© 2024 г. В. В. Коллеров<sup>а, \*</sup>, С. В. Тарлачков<sup>а</sup>, А. А. Шутов<sup>а</sup>, М. В. Донова<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, ФИЦ “Пушкинский научный центр биологических исследований РАН”, Пушкино, 142290, Московская обл., Россия

\*e-mail: svkollerov@rambler.ru

Поступила в редакцию 13.10.2023 г.

После исправления 28.10.2023 г.

Принята к опубликованию 01.11.2023 г.

Разнообразие и уникальность грибных цитохромов P450 (CYP), способных катализировать регио- и стереоспецифическое гидрокселирование стероидов, делает их важным объектом в области микробиологического синтеза ценных гидроксистероидов. В ходе настоящей работы изучена функция рекомбинантной грибной P450 монооксигеназы (CYP1) штамма *Curvularia* sp. ВКМ F-3040 — перспективного биокатализатора реакции 7-гидрокселирования стероидов андростанового ряда. Осуществлена ОТ-ПЦР амплификация кДНК последовательностей кандидатного гена CYP1 и гена его природного редокс партнера (POR), их клонирование и гетерологическая экспрессия в клетках *Escherichia coli* BL 21 DE(3). В экспериментах *in vitro* показана способность полученной рекомбинантной монооксигеназы катализировать гидрокселирование дегидроэпиандростерона в положениях 7 $\alpha$  и 7 $\beta$ . Полученные результаты расширяют знания о грибных стероидных гидроксилазах и открывают перспективы синтеза ценных 7-гидроксистероидов с использованием рекомбинантных продуцентов.

**Ключевые слова:** *Curvularia* sp., гидрокселирование, ДГЭА, цитохром P450, гетерологическая экспрессия, *E. coli* BL 21 DE(3)

DOI: 10.31857/S0026365624020168

Известно, что представители низших эукариот, мицелиальные грибы, могут являться источником специфических P450 монооксигеназ (CYP), способных катализировать введение гидроксильных групп по различным положениям стероидных субстратов, что делает их важным объектом в области микробиологического синтеза ценных гидроксистероидов (Nassiri-Коopaеi, Faramarzi, 2015; Kristan, Rižner 2012; Durairaj et al., 2016; Girvan, Munro 2016).

Ранее нами был выявлен перспективный грибной штамм *Curvularia* sp. ВКМ F-3040, обладающий крайне редкой для микромицетов способностью катализировать реакцию 7 $\beta$ -гидрокселирования, сопряженную с введением гидроксильной группы в положение СН-7 $\alpha$  и возможностью синтеза ценных 7-гидроксипроизводных (Коллеров и соавт., 2020). Изучение ферментативной гидрокселирующей активности данного штамма и последующий транскриптомный анализ позволили выявить кандидатный ген P450 (CYP1), экспрессия которого значительно увеличивалась в ответ на индукцию клеток мицелия стероидным субстратом (Коллеров и соавт., 2022; Kollerov et al., 2023).

Целью настоящей работы являлось клонирование и гетерологическая экспрессия кандидатного гена CYP1 штамма *Curvularia* sp. в клетках *E. coli* BL 21 DE(3) с подтверждением функциональной активности рекомбинантного фермента.

Штамм мицелиального гриба *Curvularia* sp. ВКМ F-3040 был получен из Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ ИБФМ РАН). Грибную культуру поддерживали на сусло-агаре. Для получения мицелия первой и второй генерации использовали условия, описанные ранее (Kollerov et al., 2022).

Штаммы *E. coli* DH5  $\alpha$  и *E. coli* BL 21 DE(3) выращивали при 37°C в среде LB (г/л): триптон – 10; дрожжевой экстракт — 5; NaCl — 10; агар — 15; pH 7.0

Суммарную РНК выделяли из индуцированного ДГЭА мицелия *Curvularia* sp. с использованием набора RNeasy Mini Kit (“Qiagen”, США) в соответствии с инструкциями производителя. Обратную транскрипцию и синтез кДНК проводили на основе тотальной РНК с использованием М-MLV обратной транскриптазы (набор для синтеза кДНК MINT, “Evrogen”, Россия) в соответствии с протоколом производителя. Гомогенаты разрушенных



клеток, несущих рекомбинантные плазмиды со вставками целевых генов *CYP1* и *POR* смешивали в равных пропорциях и центрифугировали при 20000 об./мин в течение 30 мин. Полученный осадок ( $R_{20\,000}$ ) и супернатант ( $S_{20\,000}$ ) использовали для трансформации стероидного субстрата ДГЭА *in vitro*. Для проведения трансформации к 3 мл фракции  $R_{20\,000}$  или  $S_{20\,000}$  добавляли  $MgCl_2$  — 10 мМ, НАДФН — 1 мМ, ФАД — 10 мкМ, ФМН — 10 мкМ, стероид ДГЭА — 0.35 мМ и продолжали инкубирование при 220 об./мин и 28°C в течение 72 ч.

ТСХ и ВЭЖХ анализ стероидных метаболитов осуществляли в условиях, описанных ранее (Kollegov et al., 2022). Времена удерживания ( $R_t$ ): ДГЭА, 8.46 мин; 7 $\alpha$ -ОН-ДГЭА, 3.53 мин; 7 $\beta$ -ОН-ДГЭА, 3.38 мин.

Известно, что грибные гидроксилазы, участвующие в реакциях гидроксилирования стероидных субстратов, требуют присутствия НАДФН-цитохром Р450-редуктазы (*POR*) для переноса электронов (Šrešnar, Petrič, 2011). Среди транскриптов грибной культуры *Curvularia* sp., помимо обнаруженного кандидатного гена *cypI* (1551 п.о.), был также выявлен ген *por* (2091 п.о.), кодирующий синтез редокс-партнера для цитохрома Р450.

Выделение РНК является важным шагом для проведения последующей обратной транскрипции, синтеза кДНК и ОТ-ПЦР амплификации целевых генов (Sánchez-Rodríguez et al., 2008).

На основе суммарной РНК, выделенной из клеток индуцированного ДГЭА мицелия, был осуществлен синтез первой цепи кДНК. С использованием сконструированных ген-специфических праймеров FPCYP1 и RPCYP1, а также синтезированной первой цепи кДНК и Q5 ДНК-полимеразы была проведена ОТ-ПЦР амплификация кандидатных генов *CYP1* и *POR*. На рис. 1а, 1б представлены результаты амплификации кДНК последовательностей генов *CYP1* и *POR*, свидетельствующие о чистоте полученных

ПЦР-продуктов и соответствии их исходным размерам (~1.6 и 2.1 т.п.о., соответственно).

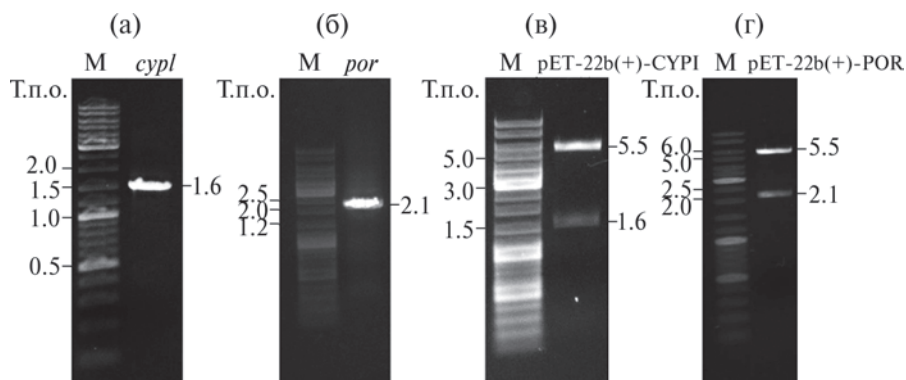
ПЦР-продукты генов *CYP1* и *POR* были по отдельности клонированы в плазмидный экспрессионный вектор pET-22b(+) под контроль T7 промотора. Полученные лигазные смеси использовали для трансформации компетентных клеток *E. coli* DH5 $\alpha$  с последующим отбором положительных трансформантов на агаризованной среде LB, содержащей 100 мкг/мл ампициллина. Наличие вставок целевых генов в рекомбинантных плаزمидах выделенных из выборочных положительных трансформантов подтверждали экспресс-ПЦР-реакцией с использованием ген-специфических праймеров, а также рестрикционным анализом (рис. 1в, 1г).

Полученными рекомбинантными плазмидами pET-22b(+)-*CYP1* и pET-22b(+)-*POR* была осуществлена трансформация компетентных клеток *E. coli* BL 21 DE(3). Биоконверсию ДГЭА проводили *in vitro* с применением клеточных фракций полученного рекомбинантного штамма бактерий. При трансформации ДГЭА клеточными фракциями контрольного штамма *E. coli* BL 21 DE(3)-pET-22b(+), несущего пустой вектор, образование гидроксилированных стероидов не выявлено (рис. 2а, варианты 1, 2).

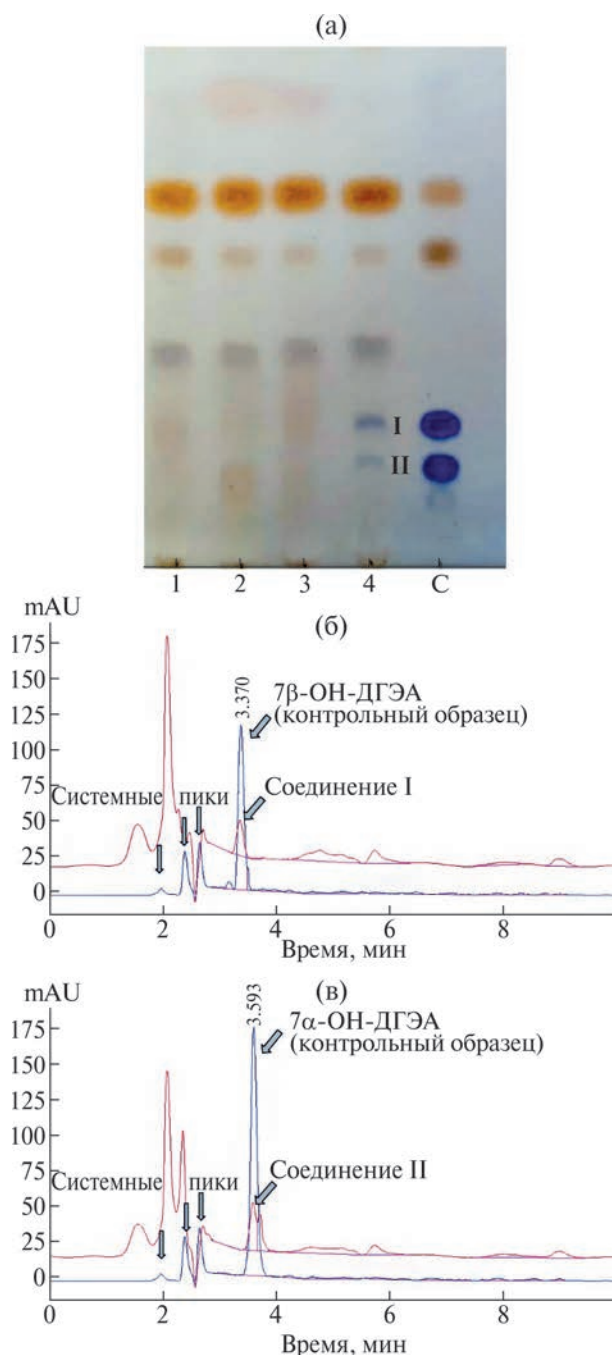
В то же время при использовании супернатанта  $S_{20\,000}$  разрушенных клеток рекомбинантных штаммов *E. coli* BL 21 DE(3)-pET-22b(+)-*CYP1* и *E. coli* BL 21 DE(3)-pET-22b(+)-*POR* после 72 ч инкубации в среде конверсии отмечалось образование двух продуктов трансформации (соединения I и II) (рис. 2а, вариант 4).

Соединения I и II были выделены и на основании сопоставления с аутентичными гидрокси-стероидами были идентифицированы как 7 $\beta$ -ОН-ДГЭА и 7 $\alpha$ -ОН-ДГЭА, соответственно (рис. 2б, 2в).

Следует отметить, что в литературе сведения о грибных монооксигеназах, осуществляющих 7 $\beta$ -гидроксилирование стероидов, ограничены одной



**Рис. 1.** Визуализация ПЦР-продуктов генов *CYP1* (а) и *POR* (б), амплифицированных с использованием в качестве матрицы первой цепи кДНК и рекомбинантной плазмиды pET-22b(+)-*CYP1* (в) и pET-22b(+)-*POR* (г) после обработки эндонуклеазами рестрикции *NdeI/NotI* и *EcoRI/NotI*, соответственно; гель-электрофорез на 0.8% агарозе (120 В; 40 мин) с окрашиванием этидиум бромидом; М — ДНК маркер (~0.5 мкг).



**Рис. 2.** ТСХ профиль образцов трансформационной жидкости биоконверсии ДГЭА (0.1 г/л) осадком  $R_{20\,000}$  (варианты 1, 3) и супернатантом  $S_{20\,000}$  (варианты 2, 4), полученными из гомогената разрушенных рекомбинантных клеток *E. coli* BL 21 DE(3)-pET-22b(+), несущих пустой вектор (варианты 1, 2) и гомогената разрушенных рекомбинантных клеток *E. coli* BL 21 DE(3)-pET-22b(+)-POR, несущих целевые гены CYP1 и POR, соответственно (варианты 3, 4) (72 ч трансформации); С – смесь стандартных стероидов в точке (сверху вниз): ДГЭА (2 мкг), андростендиол (3 мкг), 7β-ОН-ДГЭА (2 мкг), 7α-ОН-ДГЭА (2 мкг) (а); Сравнительный ВЭЖХ анализ соединений I и II с контрольными образцами 7β-ОН-ДГЭА (б) и 7α-ОН-ДГЭА (в).

публикацией, в которой упоминается способность гидроксилазы CYP5150AP3, выявленной в клетках мицелия *Thanatephorus cucumeris*, катализировать 7β- и 6β-гидроксилирование, однако данная активность проявлялась лишь в отношении кортексолона и тестостерона (Lu et al., 2019). В данной работе впервые идентифицирована грибная гидроксилаза, катализирующая 7β-гидроксилирование ДГЭА.

Таким образом, изучение функциональной активности рекомбинантных ферментов CYP1 и POR *in vitro* в отношении стероидного субстрата ДГЭА позволило сделать вывод в пользу того, что ген *cup1* в клетках грибной культуры *Curvularia* sp. кодирует синтез 7-гидроксилазы. Результаты расширяют представления о разнообразии стероидных гидроксилаз микромицетов и важны для биоинженерии микробных продуцентов ценных гидроксистероидов.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 21-64-00024.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Kristan K., Rižner T.L. Steroid-transforming enzymes in fungi // *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 2012. V. 129. P. 79–91.  
<https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2011.08.012>
- Nassiri-Koopaee N., Faramarzi M.A. Recent developments in the fungal transformation of steroids // *Biocatal. Bio-transform.* 2015. V. 33. P. 1–28.  
<https://doi.org/10.3109/10242422.2015.1022533>
- Kollerov V., Shutov A., Kazantsev A., Donova M. Bio-transformation of androstenedione and androstadienedione by selected *Ascomycota* and *Zygomycota* fungal strains // *Phytochem.* 2020. V. 169. Art. 112160.  
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2019.112160>
- Kollerov V., Shutov A., Kazantsev A., Donova M. Steroid modification by filamentous fungus *Drechslera* sp.: Focus on 7-hydroxylase and 17β-hydroxysteroid dehydrogenase activities // *Fungal Biol.* 2022. V. 126. P. 91–100.  
<https://doi.org/10.1016/j.funbio.2021.11.002>
- Kollerov V.V., Tarlachkov S.V., Donova M.V. De novo transcriptome assembly of *Curvularia* sp. VKM F-3040, a

promising steroid-modifying ascomycete // Microbiol. Resour. Announc. 2023.

<https://doi.org/10.1128/MRA.00663-23>

Črešnar B., Petrič Š. Cytochrome P450 enzymes in the fungal kingdom // Biochim. Biophys. Acta. 2011. V. 1814. P. 29–35.

<https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2010.06.020>

Sánchez-Rodríguez A., Portal O., Rojas L.E., Ocaña B., Mendoza M., Acosta M., Jiménez E., Höfte M. An efficient

method for the extraction of high-quality fungal total RNA to study the *Mycosphaerella fijiensis*-*Musa* spp. interaction // Mol. Biotechnol. 2008. V. 40. P. 299–305.

<https://doi.org/10.1007/s12033-008-9092-1>

Lu W., Feng J., Chen X., Bao Y.J., Wang Y., Wu Q., Ma Y., Zhu D. Distinct regioselectivity of fungal P450 enzymes for steroidal hydroxylation // Appl. Environ. Microbiol. 2019. V. 85. Art. e01182–19.

<https://doi.org/10.1128/AEM.01182-19>

---



---

## SHORT COMMUNICATIONS

---



---

### Expression of the *Curvularia* sp. P450 Monooxygenase Gene in *Escherichia coli* and Confirmation of Its 7-Hydroxylation Function

V. V. Kollerov<sup>1, \*</sup>, S. V. Tarlachkov<sup>1</sup>, A. A. Shutov<sup>1</sup>, and M. V. Donova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>G.K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Federal Research Center “Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences,” Pushchino, 142290 Russia

\*e-mail: [svkollerov@rambler.ru](mailto:svkollerov@rambler.ru)

Received October 13, 2023; revised October 28, 2023; accepted November 1, 2023

**Abstract**—The diversity and uniqueness of fungal cytochromes P450 (CYP), capable of catalyzing the regio- and stereospecific hydroxylation of steroids, makes them important for microbiological synthesis of valuable hydroxysteroids. In the present work, the function of recombinant fungal P450 monooxygenase (CYPI) of *Curvularia* sp. strain VKM F-3040, a promising biocatalyst of 7-hydroxylation of androstane steroids, was studied. RT-PCR amplification of cDNA of the candidate CYPI gene and of the gene of its natural redox partner (POR), their cloning and heterologous expression in the cells of *E. coli* BL 21 DE(3) was carried out. In vitro experiments showed the ability of the obtained recombinant monooxygenase to catalyze hydroxylation of dehydroepiandrosterone at positions 7 $\alpha$  and 7 $\beta$ . Our results expand the knowledge about fungal steroid hydroxylases and open up the prospects for the synthesis of valuable 7-hydroxysteroids by using recombinant producers.

**Keywords:** *Curvularia* sp., hydroxylation, DHEA, cytochrome P450, heterologous expression, *E. coli* BL 21 DE(3)

## ВЛИЯНИЕ БЕЛКА POTN НА АКТИВНОСТЬ БЕЛКОВ GLNR И POTA В КЛЕТКАХ *LENTILACTOBACILLUS HILGARDII*

© 2024 г. З. И. Исхакова<sup>а</sup>, \*, Д. Э. Журавлева<sup>а</sup>, А. Р. Каюмов<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, 420008, Россия

\*e-mail: zalinunya@mail.ru

Поступила в редакцию 14.10.2023 г.

После доработки 03.11.2023 г.

Принята к публикации 04.11.2023 г.

В бактериях PII-подобные белки являются глобальными регуляторами азотного и энергетического обмена, которые в ответ на доступность питания связывают белки-партнеры, модулируя их активность. Белок PotN из *Lentilactobacillus hilgardii*, представитель нового семейства PII-подобных белков, способен конкурентно связывать АТФ и АДФ, тем самым регулируя метаболизм в ответ на энергетический статус клетки. Так, при избытке АДФ, PotN связывает этот нуклеотид и преимущественно взаимодействует с субъединицей PotA ABC-транспортера полиаминов, подавляя ее АТФазную активность. При этом PotN также диссоциирует от фактора транскрипции GlnR, что восстанавливает способность последнего связывать ДНК и модулировать транскрипцию генов GlnR-регулона. Наоборот, в АТФ-состоянии PotN диссоциирует от PotA и связывается с фактором Gln R.

**Ключевые слова:** PII белок, регуляторные белки, *Lentilactobacillus hilgardii*

DOI: 10.31857/S0026365624020173

Лактобактерии широко используются в качестве пробиотических бактерий для поддержания гомеостаза кишечника и производства ферментированных и функциональных пищевых продуктов. В естественной среде обитания (ротовая полость и ЖКТ человека и животных, сырые и ферментированные молочные и растительные продукты) лактобациллы подвержены множественным стрессовым воздействиям, в том числе из-за несбалансированности легко метаболизируемых источников энергии, азота и углерода и должны иметь инструменты для регуляции обменных процессов в ответ на доступность питательных веществ.

PII белки представляют собой глобальные регуляторы, встречающиеся в клетках бактерий, архей и пластидах растений. PII белки реагируют на изменения в метаболическом состоянии клетки путем конкурентного связывания в различных соотношениях и комбинациях ключевых метаболитов — нуклеотидов, 2-оксоглутарата, глутамин. Связываясь с лигандами, PII белки меняют свою конформацию, что дает им возможность обратимо взаимодействовать с широким спектром белков-мишеней и, тем самым, изменять их активность, обеспечивая оптимальный уровень азотного и углеродного обмена в зависимости от доступности питательных веществ (Lüddecke, Forchhammer, 2013). Среди белков-мишеней для PII белков

широко распространены факторы транскрипции, ABC-транспортеры, ферменты ассимиляции азота и углерода (Xu et al., 2020, Selim et al., 2020, Grau et al., 2021). Связываясь со своими мишенями, PII белки модулируют их активность и за счет этого управляют интенсивностью ключевых этапов метаболизма, транспорта в клетку источников азота, а также могут регулировать выработку сигнальных молекул (ц-ди-ГМФ) и кофакторов (НАД<sup>+</sup>) (Gerhardt et al., 2020, Santos et al., 2020). Таким образом, PII белки являются основными регуляторными центрами клеточного метаболизма, “молекулярными процессорами”, обеспечивающими оптимальный уровень обмена веществ клетки в ответ на доступность питательных веществ (Forchhammer et al., 2022). PII-подобный белок встречается только у пяти из более чем 400 видов семейства *Lactobacillaceae*, идентифицированных к сегодняшнему дню. К ним относятся: *Lentilactobacillus hilgardii*, выделенный из вина, *Lentilactobacillus farragines*, выделенный из компостного материала, *Lentilactobacillus buchneri* из ротовой полости человека, *Loigolactobacillus bif fermentans*, выделенный из кисломолочных продуктов, *Liquorilactobacillus ghanensis*, выделенный из ферментированного какао. Более того, в клетках этих бактерий ген, кодирующий гомолог PII белка, расположен внутри оперона ABC-транспортера полиаминов *potABCD*, что не характерно для генов других описанных PII



белков (Zhuravleva et al., 2020). Нами было продемонстрировано, что PotN может связываться с субъединицей PotA ABC-транспортера полиаминов и фактором транскрипции GlnR, который относится к семейству MerR, и гомологи которого контролируют экспрессию генов азотного метаболизма в других бактериях (Iskhakova et al., 2022).

В данной работе мы показываем, что связывание PotN с АТФазой PotA подавляет активность последней, тем самым представляя инструмент адаптации *L. hilgardii* к условиям различной доступности питательных веществ для энергетического и пластического обмена.

Рекомбинантные штаммы *Escherichia coli* BL-21(DE3) (*dcm ompT hsdS* ( $r_B^- m_B^-$ ) *gal λ(DE3)*) (“Stratagene”, США) выращивали в питательной среде LB (Sambrook et al., 1989) с ампициллином 100 мкг/мл. Плазмиды pASK3-PotN и pASK3-PotN91 обеспечивают синтез полноценного и мутантного (с заменой G91A) белков PotN и PotN91, соответственно, несущих C-концевую StrepII-аффинную метку (Iskhakova et al., 2022). Плазмиды pET15-GlnR и pET15-PotAc обеспечивают синтез белка GlnR и C-концевого АТФазного домена белка PotA, несущих N-концевой гексагистидиновый олигопептид (Iskhakova et al., 2022). Для индукции биосинтеза белка к культуре клеток, находящихся в экспоненциальной фазе роста, добавляли изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид до конечной концентрации 1 мМ или ангидротетрациклина гидрохлорид до конечной концентрации 0.2 мкг/мл (Iskhakova et al., 2022).

Хроматографическую очистку белков, содержащих гистидиновый аффинный пептид, проводили на Ni-NTA сефарозе, а белков со стрептавидиновой аффинной меткой — на стрептактин сефарозе (“Iba LifeScience”, Германия) (Iskhakova et al., 2022).

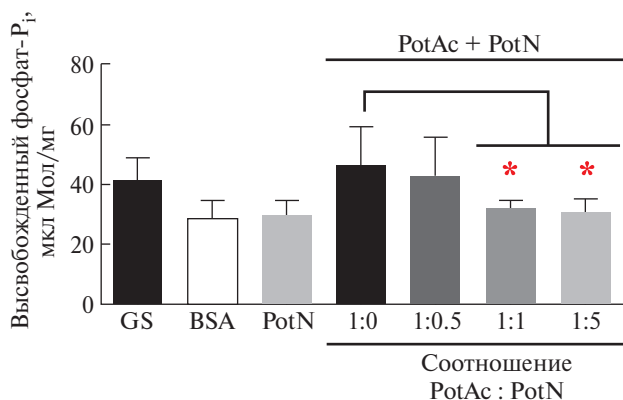
Уровень АТФазной активности определяли по содержанию образующегося при гидролизе АТФ неорганического фосфата (Pi) методом по Lanzetta et al., 1979. Кратко, 20 мкл смеси 20 мкМ PotAc в фосфатно-солевом буфере (рН 8.0), содержащем 2 мМ MgATФ, инкубировали при 30 °С в течение 15, 30, 60, 120 и 240 мин. Затем реакцию останавливали внесением 80 мкл раствора малахитового зеленого MG-AM. В качестве холостой пробы использовали 2 мМ MgATФ без фермента. Через 1–2 мин вносили 10 мкл 34% цитрата натрия и через 5 мин измеряли поглощение при длине волны 650 нм на планшетном спектрофотометре TECAN Infinite 200 Pro (“Tecan”, Швейцария). Для приготовления реагента MG-AM смешивали 1 мл раствора молибдата аммония (4.2% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> в 4 N HCl) с 3 мл 0.045% раствора малахитового зеленого и инкубировали в течение 20 мин при комнатной температуре (до прозрачности), добавляли 0.08 мл 2% Nonidet P-40, перемешивали и фильтровали через бумажный фильтр.

Взаимодействие между белками PotN, PotAc, GlnR и ДНК исследовали методом микромасштабного термофореза (MST). Для анализа были сконструированы два комплементарных олигонуклеотида, один из которых содержал флуорофор Cy3 на 5'-конце (/Cy3/-CAA TAAATAAATGTTACСТААТСТТАСАТТGAA TGCTAC и GТАГСАТТСААТGТААГАТТА-GTAAСАТТТАТТТАТТG). После гибридизации олигонуклеотиды образовывали ДНК-дуплекс, способный к взаимодействию с Gln R. Гибридизацию проводили в буфере GB (10 мМ *tris*-HCl, 1 мМ ЭДТА, 100 мМ NaCl; рН 7.4), смешивая меченые и немеченые олигонуклеотиды в эквимольных концентрациях путем охлаждения с 98 до 25°С в течение 1 ч. PotN, PotAc, GlnR и ДНК-дуплексы смешивали в эквимольном соотношении 1 : 1 : 1 : 1 с конечной концентрацией 1 мкМ в буфере для MST с добавлением 0.05% Tween 20 и инкубировали 10 мин при 25°С. Образцы центрифугировали в течение 10 мин при 10 тыс. об./мин и загружали в капилляры Monolith NT.115 (“NanoTemper Technologies”, Германия). MST проводили на Monolith NT.115 (“NanoTemper Technologies”, Германия) при температуре 25°С, мощности светодиода 20% и средней мощности MST. Данные трех независимых измерений были проанализированы (программное обеспечение MO.Affinity Analysis, версия 2.1.3, “NanoTemper Technologies”, Германия) с использованием сигнала от времени включения MST, равного 20 с.

Транспорт полиаминов в клетку осуществляется белковым комплексом PotABCD при участии АТФазного белка PotA, который является белком-партнером для PotN. Поэтому можно ожидать влияние взаимодействия PotN с PotA на АТФазную активность последнего и функционирование всего ABC-транспортера. Исследовали АТФазную активность рекомбинантного C-концевого цитоплазматического домена PotAc в присутствии PotN при соотношении белков PotAc : PotN — 1 : 0.5, 1 : 1, 1 : 5. Белки глутаминсинтетаза и БСА (бычий сывороточный альбумин) были использованы в качестве положительного и отрицательного контролей, соответственно.

Как видно на рис. 1, уровень активности белка PotN соответствует отрицательному контролю, следовательно, белок не имеет АТФазной активности.

C-концевой домен белка PotA сохранил АТФазную активность. Низкое количество белка PotN не оказывало влияния на активность белка PotAc, тогда как PotN в эквимольной концентрации и выше в значительной степени снижал активность PotAc. Следовательно, связывание с PotN негативно влияет на функциональную активность этой АТФазы, по всей видимости, приводя к прекращению поступления полиаминов в клетку путем транспорта ABC-транспортером PotABCD.



**Рис. 1.** Влияние PotN на АТФазную активность PotAc. В качестве контроля были использованы глутаминсинтаза (GS, положительный контроль) и бычий сывороточный альбумин (BSA, отрицательный контроль). На графике представлены средние значения ± стандартное отклонение из 3 повторов эксперимента. Значимость различий между комплексом PotN-PotAc и PotAc оценивали методом Крускала–Уоллиса с поправкой Шидака. Достоверными различия считали при \* $p < 0.05$ .

Уровень полиаминов в клетках бактерий регулируется биосинтезом, утилизацией и транспортом (Igarashi, Kashiwagi, 2010). Анализ генома *L. hilgardii* показал, что данной бактерии доступна только система транспорта полиаминов, следовательно, PotN может контролировать рост и развитие клетки, а также предохранять клетку от избытка полиаминов в условиях низкой доступности энергетического питания.

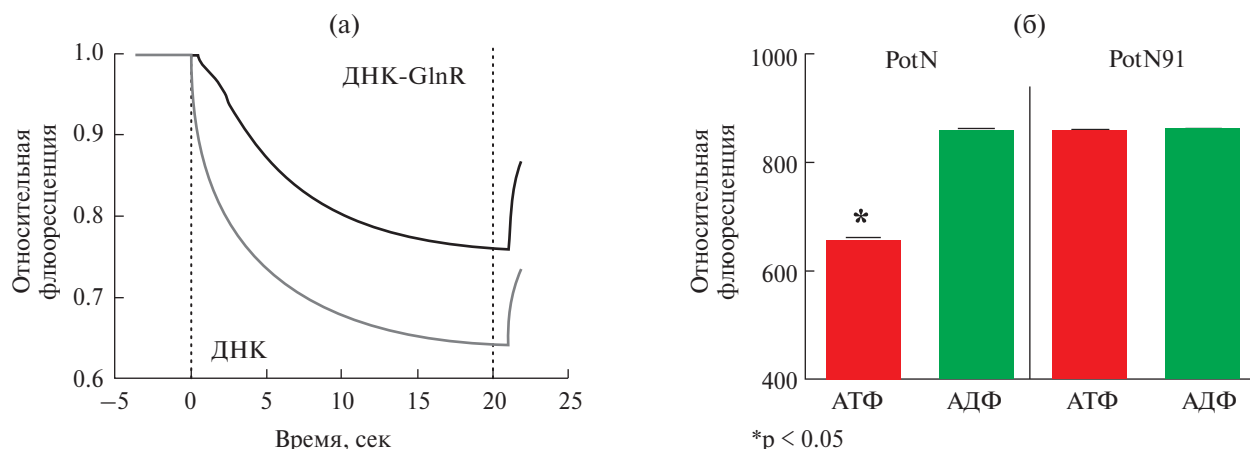
Ранее было показано, что белок PotN подавляет активность фактора транскрипции GlnR: GlnR в присутствии PotN с большей эффективностью связывается с ДНК в присутствии АДФ, чем при АТФ (значения КД = 0.46 и 1.26 мкМ, соответственно) (Журавлева, 2021). При этом PotN

связывается с GlnR преимущественно в присутствии АТФ (Iskhakova et al., 2022), следовательно, в этих условиях комплекс GlnR–ДНК образуется в значительно более низких количествах. Также присутствие PotA должно вносить вклад в способность GlnR связывать ДНК.

Чтобы смоделировать комплексный эффект АТФ и АДФ на взаимодействие GlnR с ДНК в присутствии PotN и PotA, исследовали подвижность ДНК в смеси PotN–GlnR–PotAc–ДНК с помощью MST. Белки и двухцепочечную ДНК, меченную Су3, смешивали в эквимольном соотношении 1 : 1 : 1 : 1 и измеряли подвижность ДНК в комплексе с белком GlnR в различных условиях (рис. 2а).

Снижение флуоресценции коррелирует с повышением массы молекулы/комплекса. В присутствии АТФ флуоресценция была в 2 раза ниже, следовательно, ДНК более подвижна за счет малой эффективности образования комплекса ДНК–GlnR. Это, по всей вероятности, происходит за счет того, что GlnR связан с PotN. Наоборот, в присутствии АДФ наблюдается высокий уровень флуоресценции (рис. 2б). Следовательно, образуется комплекс ДНК–GlnR, в то время как PotN, скорее всего, находится в комплексе с PotA. Чтоб доказать роль АТФ и АДФ в этом процессе, этот эксперимент был проведен с белком PotN91, неспособным связывать нуклеотиды (Iskhakova et al., 2022). Как видно из рис. 2, в присутствии PotN91 внесение АТФ и АДФ не влияло на подвижность ДНК.

Таким образом, полученные результаты позволяют заключить, что в клетках *L. hilgardii* белок PotN в зависимости от соотношения АТФ: АДФ связывает либо PotA, либо GlnR, соответственно, тем самым регулируя поступление полиаминов в клетку и транскрипцию генов GlnR регулона в ответ на доступность энергетического питания.



**Рис. 2.** Уровень относительной флуоресценции ДНК. (а) — Типичные MST-трассировки изменения интенсивности флуоресценции одиночной ДНК и комплекса ДНК–GlnR. (б) — Изменение интенсивности флуоресценции ДНК в системе PotN–GlnR–PotAc–ДНК в сочетании с различными нуклеотидами. Значимость различий флуоресценции в присутствии разных нуклеотидов оценивали по  $t$ -тесту Стьюдента. Достоверными различия считали при \* $p < 0.05$ .

## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность профессору Карлу Форшхаммеру (Университет Тюбингена, Германия) за консультации при планировании экспериментов и руководителю Центра высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины Максименко Оксане Геннадьевне за использование услуг и возможностей Центра коллективного пользования Института биологии гена РАН. Работа выполнена в рамках Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030).

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности; проект № FZSM-2023-0013.

## 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

З.И. Исхакова, Д.Э. Журавлева — экспериментальные процедуры, А.Р. Каюмов — руководство работой; все авторы участвовали в написании и утверждении рукописи.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

*Журавлева Д.Э.* Регулон фактора транскрипции GlnR в клетках *Lentilactobacillus hilgardii* и механизм регуляции его ДНК-связывающей активности. Автореферат дис. ... канд. биол. наук, 28.12.2021. Казань: Казанский федеральный университет, 2021. 24 с.

*Каюмов А.Р.* Молекулярные механизмы регуляции азотного обмена грамположительных бактерий. Автореферат дис. ... докт. биол. наук, 24.01.2019. Казань: Казанский федеральный университет, 2018. 40 с.

*Forchhammer K., Selim K.A., Huergo L.F.* New views on PII signaling: from nitrogen sensing to global metabolic control // *Trends Microbiol.* 2022. V. 30. P. 733–735.

*Gerhardt E.C.M., Parize E., Gravina F., Pontes F.L.D., Santos A.R.S., Araújo G.A.T., Goedert A.C., Urbanski A.H., Steffens M.B.R., Chubatsu L.S., Pedrosa F.O., Souza E.M., Forchhammer K., Ganusova E., Alexandre G., de Souza G.A., Huergo L.F.* The protein–protein interaction network reveals a novel role of the signal transduction protein PII in the control of c-di-GMP homeostasis in *Azospirillum brasilense* // *mSystems.* 2020. V. 5. Art. e00817–20.

*Grau F.C., Burkovski A., Muller Y.A.* Crystal structures of adenylylated and unadenylylated PII protein GlnK from *Corynebacterium glutamicum* // *Acta Crystallogr. D Struct. Biol.* 2021. V. 77. P. 325–335.

*Igarashi K., Kashiwagi K.* Modulation of cellular function by polyamines // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2010. V. 42. P. 39–51.

*Iskhakova Z., Zhuravleva D., Laykov A., Forchhammer K., Kayumov A.* The preliminary characterization of P-II like protein GlnK from *Lactobacillus brevis* // *FEBS J.* 2016. V. 283. P. 228.

*Iskhakova Z., Zhuravleva D.E., Heim C., Hartmann M.D., Laykov A.V., Forchhammer K., Kayumov A.R.* PotN represents a novel energy-state sensing PII subfamily, occurring in firmicutes // *FEBS J.* 2022. V. 289. P. 5305–5321.

*Lanzetta P.A., Alvarez L.J., Reinach P.S., Candia O.A.* An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate // *Anal. Biochem.* 1979. V. 100. P. 95–97.

*Lüddecke J., Forchhammer K.* From PII signaling to metabolite sensing: a novel 2-oxoglutarate sensor that details PII-NAGK complex formation // *PLoS. One.* 2013. V. 8. Art. e83181.

*Santos A.R.S., Gerhardt E.C.M., Parize E., Pedrosa F.O., Steffens M.B.R., Chubatsu L.S., Souza E.M., Passaglia L.M.P., Sant'Anna F.H., de Souza G.A., Huergo L.F.* NAD<sup>+</sup> biosynthesis in bacteria is controlled by global carbon/nitrogen levels via PII signaling // *J. Biol. Chem.* 2020. V. 295. P. 6165–6176.

*Selim K.A., Lapina T., Forchhammer K., Ermilova E.* Interaction of N-acetyl-l-glutamate kinase with the PII signal transducer in the non-photosynthetic alga *Polytomella parva*: co-evolution towards a hetero-oligomeric enzyme // *FEBS J.* 2020. V. 287. P. 465–482.

*Xu M., Tang M., Chen J., Yang T., Zhang X., Shao M., Xu Z., Rao Z.* PII signal transduction protein GlnK alleviates feedback inhibition of N-acetyl-l-glutamate kinase by l-arginine in *Corynebacterium glutamicum* // *Appl. Environ. Microbiol.* 2020. V. 86. Art. e00039–20.

*Zhuravleva D.E., Iskhakova Z.I., Ozhegov G.D., Gogoleva N.E., Khusnutdinova D.R., Shagimardanova E.I., Forchhammer K., Kayumov A.R.* Complete genome sequence of *Lactobacillus hilgardii* LMG 7934, carrying the gene encoding for the novel PII-like protein PotN // *Curr. Microbiol.* 2020. V. 77. P. 3538–3545.

## Effect of the PotN Protein on Activities of the GlnR and PotA Proteins in the Cells of *Lentilactobacillus hilgardii*

Z. I. Iskhakova<sup>1, \*</sup>, D. E. Zhuravleva<sup>1</sup>, and A. R. Kayumov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, 420008 Russia

\*e-mail: zalinunya@mail.ru

Received October 14, 2023; revised November 3, 2023; accepted November 4, 2023

**Abstract**—Bacterial PII-like proteins are global regulators of nitrogen and energy metabolism, which respond to nutrient availability by binding their partner proteins, thus modulating their activity. The PotN protein from *Lentilactobacillus hilgardii*, a member of the new family of PII-like proteins, is capable of competitive binding of ATP and ADP, thus regulating metabolism in response to the cell energy status. Thus, under ADP excess, PotN binds this nucleotide and interacts mostly with the PotA subunit of the polyamine ABC transporter, suppressing its ATPase activity. PotN also dissociates from the transcription factor GlnR, restoring its ability to bind DNA and modulate expression of the genes of the GlnR regulon. On the contrary, in the ATP state PotN dissociates from PotA and binds to the GlnR factor.

**Keywords:** PII protein, regulatory proteins, *Lentilactobacillus hilgardii*



## СПЕЦИФИЧЕСКИЙ ОТВЕТ БАКТЕРИАЛЬНЫХ КЛЕТОК НА ДЕЙСТВИЕ $\beta$ -ИОНОНА

© 2024 г. Д. Е. Сидорова<sup>а</sup>, О. Е. Мелькина<sup>а</sup>, О. А. Кокшарова<sup>а, б</sup>, Е. Н. Вагнер<sup>а, с</sup>,  
И. А. Хмель<sup>а</sup>, В. А. Плюта<sup>а, \*</sup>

<sup>а</sup>ФГБУ КК НБИКС-ПТ НИЦ “Курчатовский институт”, 123182 Москва

<sup>б</sup>НИИФХБ имени А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова, 119992 Москва

<sup>с</sup>ФГБУ ВО РХТУ им. Д.И. Менделеева, 125047 Москва

\*e-mail: plyutaba@gmail.com

Поступила в редакцию 13.10.2023 г.

После доработки 11.11.2023 г.

Принята к публикации 11.11.2023 г.

Исследована биологическая активность и механизмы действия ненасыщенного кетона  $\beta$ -ионона – летучего соединения, представляющего серьезный интерес для биотехнологии, медицины и сельского хозяйства. С использованием специфических *lux*-биосенсоров на основе *Escherichia coli* MG1655 установлено, что  $\beta$ -ионон вызывает окислительный стресс в клетках *E. coli*, индуцируя экспрессию с промоторов *PkatG* и *Pdps*, но не с промотора *PsoxS*. Эффекты  $\beta$ -ионона на индукцию теплового шока (экспрессия с *PibpA* и *PgrpE* промоторов) и на повреждение ДНК (экспрессия с *PcolD* и *PdinI* промоторов, SOS-ответ) в клетках *E. coli* были значительно слабее.  $\beta$ -ионон не вызывал окислительный стресс в клетках грамположительной бактерии *Bacillus subtilis*.

**Ключевые слова:** летучие органические соединения,  $\beta$ -ионон, *lux*-биосенсоры, промоторы, окислительный стресс

DOI: 10.31857/S0026365624020186

Микроорганизмы синтезируют огромное количество летучих соединений различной природы, большинство из которых относится к летучим органическим соединениям (ЛОС). ЛОС характеризуются, в основном, как липофильные соединения с низкой молекулярной массой (~300 Да), низкой температурой кипения; они могут легко распространяться в воздухе и жидкостях, передаваться в почве и действовать на коротких и длинных расстояниях. В настоящее время опубликована база данных идентифицированных ЛОС (mVOC3.0 database; <http://bioinformatics.charite.de/mvoc/>), которая включает в себя около 2000 соединений, выделяемых почти 1000 видами микроорганизмов. Это, конечно, лишь малая часть ЛОС, которые могут быть продуцированы микроорганизмами. Совокупность всех летучих веществ, синтезируемых организмом или экосистемой, получила название “волатилома” (от англ. “volatile” — летучий).

ЛОС обладают различной биологической активностью. Они могут подавлять или стимулировать рост бактерий, грибов и растений, вызывать системную резистентность растений, оказывать влияние на насекомых, действуя как аттрактанты или репелленты, подавлять развитие нематод и т.д. Продукция ЛОС может играть существенную роль

в конкурентных отношениях микроорганизмов, в антагонизме ассоциированных с растениями бактерий и фитопатогенов, а также микроорганизмов микрофлоры человека и животных. Большой интерес представляет изучение способности синтезировать ЛОС почвенными и ассоциированными с растениями бактериями, перспективными для биологического контроля заболеваний растений. Исследуется возможность использования ЛОС как фумигантов, например, запатентован препарат на основе диметилдисульфида (ДМДС) для предпосевной обработки почв. На основе ЛОС разрабатываются пестициды нового типа; они экологически безопасны, т.к. улетучиваются после воздействия на фитопатогенные микроорганизмы (Kai et al., 2009; Effmert et al., 2012; Audrain et al., 2015; Schmidt et al., 2015; Tyc et al., 2017; Fincheira, Quiroz, 2018; Веселова и соавт., 2019; Weisskopf et al., 2021).

Еще одним важнейшим аспектом функционирования ЛОС является их способность участвовать в новом типе коммуникации микроорганизмов – передавать информацию дистанционно, регулируя экспрессию генов, контролирующих жизненно важные клеточные процессы, за что они получили название “infochemicals” (Chernin et al., 2011, 2013;

Ahmad et al., 2014; Schmidt et al., 2015; Helman, Chernin, 2015).

Летучие вещества, синтезируемые бактериями, представляют ценный арсенал химических соединений для биотехнологии, сельского хозяйства, медицины, пищевой промышленности и др. Возможности их использования в прикладных целях исследованы недостаточно. Вопросы о механизмах действия ЛОС, путях их биосинтеза, экологической и функциональной значимости заслуживают глубокого и детального изучения.

В наших предыдущих работах мы исследовали биологическую активность ЛОС, образуемых бактериями, и механизмы их действия на клетки различных организмов. Нами исследовались ЛОС различной химической структуры: кетоны с различной длиной углеводородной цепи, спирты, терпены, серосодержащее соединение — диметилдисульфид (ДМДС). Было показано, что ЛОС могут подавлять рост бактерий (*Agrobacterium tumefaciens*, *Escherichia coli*), образование биопленок и выживаемость бактерий в зрелых биопленках, а также миграцию бактерий по поверхности питательной среды. ЛОС подавляли и/или стимулировали рост растений (*Arabidopsis thaliana*); ингибировали прорастание семян этого растения, оказывали убивающее действие на плодовую мушку *Drosophila melanogaster* и на нематод, а при малых количествах тормозили развитие исследуемых насекомых и их личинок (Popova et al., 2014; Plyuta et al., 2016, 2021; Sidorova et al., 2022, 2023). Проведены работы по изучению механизмов действия некоторых ЛОС на бактериальные клетки (Melkina et al., 2017, 2021; Voronova et al., 2019; Koksharova et al., 2020; Плюта и соавт., 2020).

В этой работе продолжилось исследование биологической активности ненасыщенного кетона  $\beta$ -иона (рис. 1).

Это летучее соединение вызывает большой интерес исследователей, работающих как в фундаментальном, так и в прикладном направлении.  $\beta$ -ион синтезируется цианобактериями, водорослями и растениями (является существенным компонентом эфирных масел различных растений, обнаруживается в плодах, овощах и др.).  $\beta$ -ион — важное ароматическое вещество, он широко используется в парфюмерной промышленности,

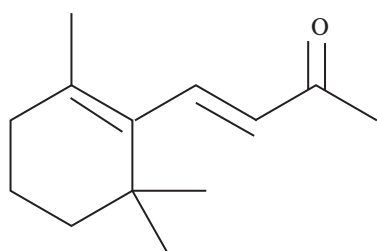


Рис. 1. Химическая структура  $\beta$ -иона.

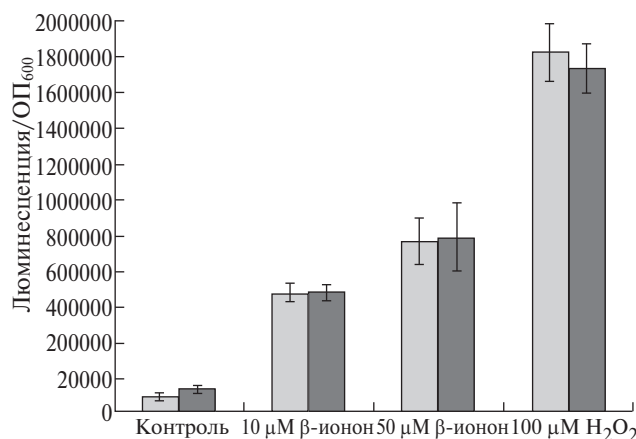
в косметике; проявляет фармакологические активности, например, оказывает противовоспалительное, противогрибковое, антилейшманиозное, противораковое действие (Ansari et al., 2016; Paparella et al., 2021). Поскольку  $\beta$ -ион обладает ограниченной растворимостью в воде (169 мг/л при 25°C) и обычно образуется в растениях в относительно низких концентрациях, в настоящее время ведутся активные генно-инженерные работы по созданию и улучшению уже существующих штаммов-продуцентов на основе бактерий и дрожжей для получения высоких концентраций этого соединения (Czajka et al., 2018; Shi et al., 2020).

Ранее мы показали, что  $\beta$ -ион в больших дозах (400–800 мкмоль) уменьшает количество выросших колоний фитопатогенной бактерии *Agrobacterium tumefaciens* в 1.5–5 раз, подавляет рост растений *A. thaliana*, ингибирует прорастание семян этого растения, ингибирует развитие и убивает дрозифил (Sidorova et al., 2022). Однако механизмы действия  $\beta$ -иона на бактерии изучены недостаточно.

С целью изучения механизмов действия  $\beta$ -иона на бактерии мы использовали специфические люминесцентные *lux*-биосенсоры на основе штаммов *Escherichia coli*, которые содержат индуцируемые промоторы, реагирующие на окислительный стресс, повреждение ДНК и белков, транскрипционно слитые с репортерными генами *luxCDABE* бактерии *Photobacterium luminescens* (Kotova et al., 2010).

Ночные культуры биосенсоров разводили до концентрации  $10^7$  кл./мл и растили при 30°C 2–3 ч с аэрацией. Затем пробы по 200 мкл переносили в специальные кюветы, одна из которых служила контролем (в нее добавляли 4 мкл ДМСО), а в другие вносили по 4 мкл  $\beta$ -иона в различной концентрации (необходимая концентрация раствора была получена разведением 96%  $\beta$ -иона в ДМСО). Кюветы располагали перед фотоумножителем в люминометре LMA01 (“Beckman”, США) при комнатной температуре и через определенные интервалы времени измеряли интенсивность биолюминесценции.

В клетках *E. coli* на окислительный стресс отвечают OxyR/OxyS и SoxR/SoxS регулоны, которые специфически активируются при появлении пероксида водорода и супероксидного анион-радикала, соответственно. Для определения действия  $\beta$ -иона на окислительный стресс бактерий использовали биосенсоры *E. coli* MG1655 (pKatG::lux) и *E. coli* MG1655 (pSoxS::lux). Степень экспрессии с соответствующих промоторов определялась по интенсивности биолюминесценции. Перекись водорода (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) и паракват (стимулирует образование супероксид-анион-радикала) были использованы в качестве положительного контроля. Полученные нами результаты показали, что  $\beta$ -ион индуцирует окислительный стресс (увеличивает экспрессию



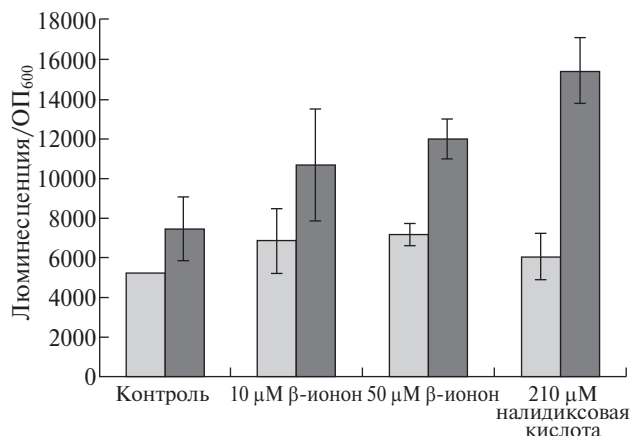
**Рис. 2.** Индукция биOLUMИНЕСЦЕНЦИИ *lux*-биосенсора *E. coli* MG1655 (pKatG':*lux*) при действии β-ионона. По оси ординат показано отношение значения люминесценции к величине оптической плотности культуры *lux*-биосенсора *E. coli* MG1655 (pKatG':*lux*) через 60 мин (светлые столбцы) и 120 мин (темные столбцы) роста в контроле (без добавления ЛОС) и при действии 10 и 50 мкмоль β-ионона, соответственно. В качестве положительного контроля использовали перекись водорода (100 мкмоль). Все величины представляют средние значения ± стандартные отклонения.

с *PkatG* и *Pdps* промоторов) (рис. 2) через специфический ответ, контролируемый *OxyR/OxyS* регулоном, но не *SoxR/SoxS* регулоном; β-ионон не индуцирует экспрессию с *PsoxS* промотора.

Таким образом, впервые было показано, что β-ионон вызывает специфичный ответ в бактериальных клетках, а именно, окислительный стресс с образованием активных форм кислорода — перекиси водорода, но не супероксид-анион-радикала.

Для оценки способности β-ионона индуцировать повреждения ДНК, приводящие к SOS-ответу бактериальной клетки, использовались *lux*-биосенсоры *E. coli* (pColD':*lux*) и *E. coli* MG1655 (pDinI':*lux*). Положительным контролем была налидиксовая кислота, которая существенно индуцировала экспрессию с промотора *PcolD*. β-ионон слабо повышал экспрессию с *PcolD* промотора при концентрациях 10 и 50 μM (рис. 3) и незначительно снижал ее при 100 мкмоль. Такая же закономерность наблюдалась и при действии β-ионона на штамм *E. coli* MG1655 (pDinI':*lux*).

Для изучения действия β-ионона на тепловой шок и повреждение белков были использованы биосенсоры *E. coli* MG1655 (pIbpA':*lux*) и *E. coli* MG1655 (PGrpE':*lux*). В качестве положительного контроля использовался 96% этанол. Действие β-ионона на штамм *E. coli* MG1655 (pIbpA':*lux*) вызывало индукцию экспрессии генов теплового шока при его концентрациях 50 и 100 μM. Концентрации β-ионона 10, 50 и 100 мкмоль не вызывали индукции экспрессии с *PgrpE* промотора.



**Рис. 3.** Индукция биOLUMИНЕСЦЕНЦИИ *lux*-биосенсора *E. coli* MG1655 (pColD':*lux*) при действии β-ионона. По оси ординат показано отношение значения люминесценции к величине оптической плотности культуры *lux*-биосенсора *E. coli* MG1655 (pColD':*lux*) через 60 мин (светлые столбцы) и 120 мин (темные столбцы) роста в контроле (без добавления ЛОС) и при действии 10 и 50 мкмоль β-ионона, соответственно. В качестве положительного контроля использовали налидиксовую кислоту (210 мкмоль). Все величины представляют средние значения ± стандартные отклонения.

Для оценки способности β-ионона вызывать окислительный стресс у грамположительных бактерий мы использовали биосенсор на основе *Bacillus subtilis*. Было показано, что действие β-ионона не вызывает окислительный стресс в клетках *B. subtilis* 168 pNK-MrgA даже при длительном времени инкубации.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа частично финансировалась в рамках Тематического плана Государственного задания НИЦ «Курчатовский институт» и соглашения с Минобрнауки № 075-15-2019-1659.

#### 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

Веселова М.А., Плюта В.А., Хмель И.А. Летучие вещества бактерий: структура, биосинтез, биологическая активность // Микробиология. 2019. Т. 88. С. 272–287.



- Veselova M.A., Plyuta V.A., Khmel I.A.* Volatile compounds of bacterial origin: structure, biosynthesis, and biological activity // *Microbiology (Moscow)*. 2019. V. 88. P. 261–274.
- Плюта В.А., Сидорова Д.Е., Завильгельский Г.Б., Котова В.Ю., Хмель И.А.* Влияние летучих органических соединений, синтезируемых бактериями, на экспрессию с промоторов генов *zntA*, *copA* и *arsR*, индуцируемых в ответ на действие меди, цинка и мышьяка // *Мол. генетика, микробиол. вирусол.* 2020. Т. 3. С. 128–135.
- Plyuta V.A., Sidorova D.E., Zavigelsky G.B., Kotova V. Yu., Khmel I.A.* Effects of volatile organic compounds synthesized by bacteria on the expression from promoters of the *zntA*, *copA*, and *arsR* genes induced in response to copper, zinc, and arsenic // *Mol. Genet. Microbiol. Virol.* 2020. V. 35. P. 152–158.
- Ahmad A., Viljoen A.M., Chenia H.Y.* The impact of plant volatiles on bacterial quorum sensing // *Lett. Appl. Microbiol.* 2014. V. 60. P. 8–19.
- Ansari M., Emami S.*  $\beta$ -Ionone and its analogs as promising anticancer agents // *Eur. J. Med. Chem.* 2016. V. 123. P. 141–154.
- Audrain B., Farag M.A., Ryu C.-M., Ghigo J.-M.* Role of bacterial volatile compounds in bacterial biology // *FEMS Microbiol. Rev.* 2015. V. 39. P. 222–233.
- Chernin L., Toklikishvili N., Ovadis M., Kim S., Ben-Ari J., Khmel I., Vainstein A.* Quorum sensing quenching by rhizobacterial volatiles // *Environ. Microbiol. Rep.* 2011. V. 3. P. 698–704.
- Chernin L., Toklikishvili N., Ovadis M., Khmel I.* Quorum-sensing quenching by volatile organic compounds emitted by rhizosphere bacteria // *Molecular Microbiol. Ecology of the Rhizosphere*. V. 2. / Ed. Frans J. de Bruijn. John Wiley & Sons. Inc., 2013. P. 791–800.
- Czajka J.J., Nathenson J.A., Benites V.T., Baidoo E.E.K., Cheng Q., Wang Y., Tang Y.J.* Engineering the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* to produce the aroma compound  $\beta$ -ionone // *Microb. Cell Fact.* 2018. V 17. P. 1–13.
- Effmert U., Kalderas J., Warnke R., Piechulla B.* Volatile mediated interactions between bacteria and fungi in the soil // *J. Chem. Ecol.* 2012. V. 38. P. 665–703.
- Fincheira P., Quiroz A.* Microbial volatiles as plant growth inducers // *Microbiol. Res.* 2018. V. 208. P. 63–75.
- Helman Y., Chernin L.* Silencing the mob: Disrupting quorum sensing as a means to fight plant disease // *Mol. Plant Pathol.* 2015. V. 16. P. 316–329.
- Kai M., Haustein M., Molina F., Petri A., Scholz B., Piechulla B.* Bacterial volatiles and their action potential // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2009. V. 81. P. 1001–1012.
- Koksharova O.A., Popova A.A., Plyuta V.A., Khmel I.A.* Four new genes of cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC7942 are responsible for sensitivity to 2-nonanone // *Microorganisms*. 2020. V. 8. Art. 1234.
- Kotova V.Y., Manukhov I.V., Zavigelskii G.B.* Lux-biosensors for detection of SOS-response, heat shock, and oxidative stress // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2010. V. 46. P. 781–788.
- Melkina O.E., Khmel I.A., Plyuta V.A., Koksharova O.A., Zavigelsky G.B.* Ketones 2-heptanone, 2-nonanone, and 2-undecanone inhibit DnaK-dependent refolding of heat-inactivated bacterial luciferases in *Escherichia coli* cells lacking small chaperon IbpB // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2017. V. 101. P. 5765–5771.
- Melkina O.E., Plyuta V.A., Khmel I.A., Zavigelsky G.B.* The mode of action of cyclic monoterpenes (–)-limonene and (+)- $\alpha$ -pinene on bacterial cells // *Biomolecules*. 2021. V. 11. P. 806.
- Paparella A., Shaltiel-Harpaza L., Ibdah M.*  $\beta$ -Ionone: its occurrence and biological function and metabolic engineering // *Plants (Basel)*. 2021. V. 10. P. 754.
- Plyuta V., Lipasova V., Popova A., Koksharova O., Kuznetsov A., Szegedi E., Chernin L., Khmel I.* Influence of volatile organic compounds emitted by *Pseudomonas* and *Serratia* strains on *Agrobacterium tumefaciens* biofilms // *APMIS*. 2016. V. 124. P. 586–594.
- Plyuta V.A., Chernikova A.S., Sidorova D.E., Kupriyanova E.V., Koksharova O.A., Chernin L.S., Khmel I.A.* Modulation of *Arabidopsis thaliana* growth by volatile substances emitted by *Pseudomonas* and *Serratia* strains // *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2021. V. 37. P. 82.
- Popova A.A., Koksharova O.A., Lipasova V.A., Zaitseva Ju.V., Katkova-Zhukotskaya O.A., Eremina S. Iu., Mironov A.S., Chernin L.S., Khmel I.A.* Inhibitory and toxic effects of volatiles emitted by strains of *Pseudomonas* and *Serratia* on growth and survival of selected microorganisms, *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila melanogaster* // *BioMed Res. Int.* 2014. V. 2014. Article ID125704. 11 p.
- Schmidt R., Cordovez V., de Boer W., Raaijmakers J., Garbeva P.* Volatile affairs in microbial interactions // *ISME J.* 2015. V. 9. P. 2329–2335.
- Shi J., Cao C., Xu J., Zhou C.* Research advances on biosynthesis, regulation, and biological activities of apocarotenoid aroma in horticultural plants // *J. Chem.* 2020. V. 2020. P. 1–11.
- Sidorova D.E., Plyuta V.A., Padiy D.A., Kupriyanova E.V., Roshina N.V., Koksharova O.A., Khmel I.A.* The effect of volatile organic compounds on different organisms: agrobacteria, plants and insects // *Microorganisms*. 2022. V. 10. Art. 69.
- Sidorova D.E., Skripka M.I., Khmel I.A., Koksharova O.A., Plyuta V.A.* Effects of volatile organic compounds on biofilms and swimming motility of *Agrobacterium tumefaciens* // *Microorganisms*. 2022. V. 10. Art. 1512.
- Sidorova D.E., Khmel I.A., Chernikova A.S., Chupriyanova T.A., Plyuta V.A.* Biological activity of volatiles produced by the strains of two *Pseudomonas* and two *Serratia* species // *Folia Microbiol.* 2023. V. 68. P. 617–626.
- Tyc O., Song C.X., Dickschat J.S., Vos M., Garbeva P.* The ecological role of volatile and soluble secondary metabolites produced by soil bacteria // *Trends Microbiol.* 2017. V. 25. P. 280–292.



Voronova E.N., Konyukhov I.V., Koksharova O.A., Popova A.A., Pogosyan S.I., Khmel I.A., Rubin A.B. Inhibition of cyanobacterial photosynthetic activity by natural ketones // J Phycol. 2019. V. 55. P. 840–857.

Weisskopf L., Schulz S., Garbeva P. Microbial volatile organic compounds in intra-kingdom and inter-kingdom interactions // Nat. Rev. Microbiol. 2021. V. 19. P. 391–404.

---

---

**SHORT COMMUNICATIONS**

---

---

## Specific Response of Bacterial Cells to $\beta$ -Ionone

D. E. Sidorova<sup>1</sup>, O. E. Melkina<sup>1</sup>, O. A. Koksharova<sup>1,2</sup>, E. N. Vagner<sup>1,3</sup>, I. A. Khmel<sup>1</sup>,  
and V. A. Plyuta<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Complex of NBICS Technologies of the NRC “Kurchatov Institute”, Moscow, 123182 Russia

<sup>2</sup>Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

<sup>3</sup>Department of Biotechnology, Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow 125047 Russia

\*e-mail: plyutaba@gmail.com

Received October 13, 2023; revised November 11, 2023; accepted November 11, 2023

**Abstract**—The biological activity and mechanisms of action of the unsaturated ketone  $\beta$ -ionone, a volatile compound of significant interest for biotechnology, medicine, and agriculture, were studied. Using specific *lux* biosensors based on *Escherichia coli* MG1655, we found that  $\beta$ -ionone causes oxidative stress in *E. coli* cells by inducing expression from the *PkatG* and *Pdps* promoters, but not from the *PsoxS* promoter. The effects of  $\beta$ -ionone on the heat shock induction (expression from the *PibpA* and *PgrpE* promoters) and on DNA damage (expression from the *PcolD* and *PdinI* promoters, SOS response) in *E. coli* cells were significantly weaker.  $\beta$ -Ionone did not cause oxidative stress in the cells of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*.

**Keywords:** volatile organic compounds,  $\beta$ -ionone, *lux* biosensors, promoters, oxidative stress

## ВЛИЯНИЕ СТОКОВ ОЧИСТНЫХ СООРУЖЕНИЙ НА РАСПРОСТРАНЕНИЕ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ В ВОДНОЙ СРЕДЕ

© 2024 г. Т. Ю. Измалкова<sup>а, \*</sup>, О. И. Сазонова<sup>а</sup>, И. А. Кошелева<sup>а</sup>

<sup>а</sup>ФИЦ “Пушинский научный центр биологических исследований РАН”, Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрабина РАН, Московская область, Пушкино, 142290, Россия

\*e-mail: tatiz@pbcras.ru

Поступила в редакцию 14.10.2023 г.

После доработки 26.10.2023 г.

Принята к публикации 01.11.2023 г.

В работе исследовано влияние очистных сооружений г. Пушкино на содержание в воде и седиментах реки Ока антибиотикорезистентных микроорганизмов и детерминант множественной лекарственной устойчивости. Обнаружен вклад сточных вод, прошедших очистку, в загрязнение поверхностных вод реки Ока штаммами, устойчивыми к аминогликозидам. Продемонстрирована роль очистных сооружений г. Пушкино в распространении в водной среде мультирезистентных штаммов, а также плазмид группы несовместимости А/С (IncA/C). Показано, что стоки очистных сооружений влияют как на общее содержание эубактерий в донных отложениях, так и увеличивают процентное содержание псевдомонад в них, изменяя, тем самым, состав микробного сообщества.

**Ключевые слова:** антибиотики, очистные сооружения, множественная лекарственная устойчивость, псевдомонады, плазмиды, интегроны, группы несовместимости плазмид

DOI: 10.31857/S0026365624020194

Микроорганизмы играют решающую роль в экосистемах пресных водоемов. Однако структура водных микробных сообществ весьма лабильна и подвержена как естественным природным, так и антропогенным факторам. Постоянно повышающийся уровень антимикробных препаратов в окружающей среде в настоящее время является глобальной экологической проблемой, поскольку приводит к селекции резистентных к ним бактерий и появлению новых детерминант устойчивости. Реки являются важным связующим звеном между городскими и сельскими экосистемами. Антимикробные препараты и антибиотикоустойчивые микроорганизмы попадают в водную среду путем сброса сточных вод очистных сооружений в поверхностные или грунтовые воды, ливневых стоков с сельскохозяйственных угодий, а также в результате применения антибиотиков в аквакультуре (Carvalho, Santos, 2016). В России работы по изучению загрязнения водной среды фармацевтическими препаратами начаты в 2009 году исследованиями Института водных проблем РАН. В ходе исследований 2009–2013 годов на водных объектах-источниках питьевого водоснабжения и водозаборах водоочистных сооружений г. Москва были выявлены соединения, проявляющие

бактерицидную активность (например, ампициллин, тетрациклин, ципрофлоксацин и другие) (Barenboim, Kozlova, 2018).

Река Ока с площадью водосбора 245 тыс. км<sup>2</sup> и общей длиной 1500 км является рыбохозяйственным водным объектом высшей категории. Ниже г. Серпухов р. Ока, в соответствии с удельным комбинаторным индексом загрязненности воды (УКИЗВ), относится к 4 классу качества, разряда “А” (грязная). Загрязнение поверхностных вод бассейна Оки связано с повышенным содержанием соединений азота, фосфора и органических веществ, что обычно обусловлено естественными условиями формирования речного стока и антропогенной нагрузкой промышленных и сельскохозяйственных предприятий (Джамалов и соавт., 2017). Город Пушкино Московской области (около 20 тысяч населения) не содержит на своей территории крупных производств, поэтому основным источником попадания в водную среду антибиотиков и антибиотикорезистентных штаммов служат коммунально-бытовые сточные воды.

Целью работы являлось изучение влияния сточных вод очистных сооружений г. Пушкино на изменение состава микробного сообщества на примере бактерий рода *Pseudomonas*, а также на содержание

в воде и седиментах реки Ока антибиотикорезистентных микроорганизмов и детерминант множественной лекарственной устойчивости.

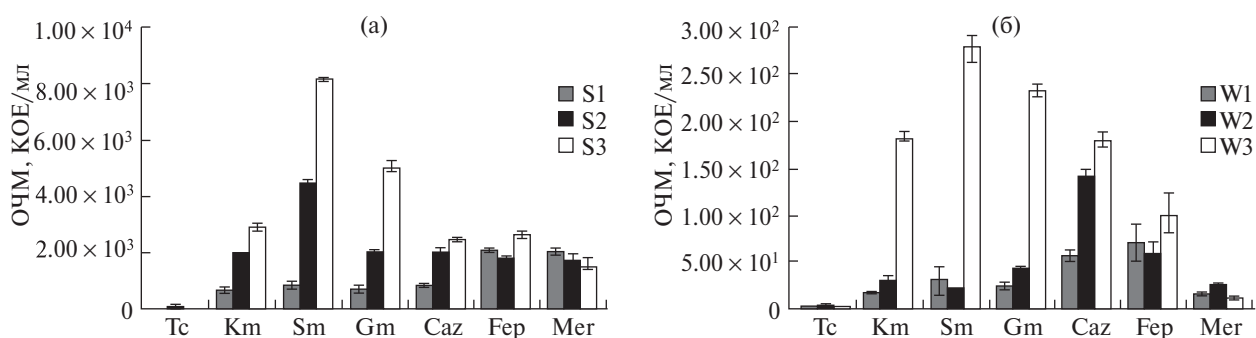
Три пляжа в окрестностях г. Пушкино были выбраны для отбора проб воды и седиментов: городской пляж г. Пушкино (№ 2), пляж отеля Царьград (№ 1), расположенный в 3 км вверх по течению, и малопосещаемый пляж в 1.8 км вниз по течению (№ 3), расположенный приблизительно в 250 м вниз от стока очистных сооружений г. Пушкино в Оку. Пляж отеля Царьград, который на момент отбора проб был больше года закрыт для посещения, выбран в качестве контрольной точки минимального антропогенного воздействия. Пробы воды на глубине 0.5 м и донных отложений у береговой линии под слоем воды 5 см были взяты из трех точек с каждого исследуемого сайта. Температура воды всех трех сайтов была 24°C, температура воздуха – от 24 до 26.2°C. Штаммы выращивали при 28°C на агаризованной среде LB (Sambrook et al., 1989), как без антибиотика, так и с добавлением одного из следующих антибиотиков: меропенем (40 мкг/мл), цефтазидим (40 мкг/мл), цефепим (40 мкг/мл), тетрациклин (30 мкг/мл), канамицин (100 мкг/мл), стрептомицин (100 мкг/мл) и гентамицин (10 мкг/мл). Концентрации антибиотиков подбирали в соответствии с работой (Кошелева и соавт., 2021). Общую численность культивируемых микроорганизмов, культивируемых антибиотикоустойчивых микроорганизмов и псевдомонад определяли методом прямого посева серии разведений в трех повторах для каждой пробы, как было описано ранее (Кошелева и соавт., 2021). Общая численность культивируемых микроорганизмов (ОЧМ) на LB-агаре без антибиотика была одного порядка и составила  $1.59 \times 10^3 \pm 30$  КОЕ/мл для пляжа № 1,  $1.35 \times 10^3 \pm 10$  и  $2.69 \times 10^3 \pm 30$  для пляжей № 2 и № 3, соответственно. ОЧМ в пробах седиментов также была схожа между собой и составила  $1.16 \times 10^5 \pm 1.5 \times 10^3$  КОЕ/мл для пляжа № 1,  $2.75 \times 10^5 \pm 2.5 \times 10^3$  и  $4.45 \times 10^5 \pm 10^3$  для пляжей № 2 и № 3, соответственно. Таким

образом, стоки очистных сооружений практически не влияют на общую численность культивируемых микроорганизмов.

Численность культивируемых антибиотикоустойчивых микроорганизмов представлена на рис. 1.

Обнаружено почти десятикратное увеличение содержания микроорганизмов, устойчивых к аминогликозидам (канамицину, стрептомицину и гентамицину) в пробах воды, отобранных ниже сброса сточных вод очистных сооружений. Микроорганизмы, устойчивые к цефалоспорином III и IV поколения, были обнаружены во всех пробах, однако их концентрация также была выше в воде зоны пляжа № 3. Крайне низкая численность микроорганизмов, устойчивых к тетрациклину (1–2 КОЕ/мл) в образцах воды и седиментов всех трех зон может свидетельствовать об отсутствии загрязнения исследуемого участка р. Оки отходами животноводства (рис. 1). Ранее нами было показано, что, в то время как обработка сточных вод очистными сооружениями г. Пушкино приводила к значительному снижению численности микроорганизмов, устойчивых к тетрациклину, то для микроорганизмов, устойчивых к канамицину, стрептомицину и хлорамфениколу, общая численность была сходной и не изменялась на всех стадиях очистки (Кошелева и соавт., 2021). В случае гентамицина численность в процессе очистки даже слегка возрастала, что, вероятно, связано с участием мобильных генетических элементов в распространении GmR-фенотипа. Таким образом, наблюдается корреляция между всплеском численности микроорганизмов, устойчивых к аминогликозидам, в воде пляжа № 3 и поступаемыми в реку очищенными сточными водами.

Пресноводные псевдомонады могут быть постоянными или эфемерными членами различных микробных консорциумов в городском водном цикле. Ранее нами было показано, что одними из наиболее часто встречающихся культивируемых



**Рис. 1.** Общая численность антибиотикоустойчивых микроорганизмов (КОЕ/мл образца), изолированных методом прямого посева из проб седиментов (а) и воды (б) реки Ока. Тс – тетрациклин, Km – канамицин, Sm – стрептомицин, Gm – гентамицин, Caz – цефтазидим, Fep – цефепим, Mer – меропенем.

**Таблица 1.** Количественное определение двух групп микроорганизмов методом qPCR в пробах воды и седиментов реки Оки

Пробы		Численность копий микробных генов 16S рРНК на 1 г образца, оцененная с помощью количественной ПЦР		Соотношение численности <i>Pseudomonas</i> к общему числу <i>Eubacteria</i> (%)
		<i>Eubacteria</i>	<i>Pseudomonas</i>	
Пляж отеля Царьград (№ 1)	Вода	$2.60 \times 10^6$	$2.40 \times 10^4$	0.92
	Седименты	$1.87 \times 10^6$	$3.71 \times 10^4$	1.99
Городской пляж (№ 2)	Вода	$2.43 \times 10^6$	$2.12 \times 10^4$	0.87
	Седименты	$2.14 \times 10^6$	$5.38 \times 10^4$	2.52
Пляж за очистными сооружениями (№ 3)	Вода	$2.60 \times 10^6$	$2.25 \times 10^4$	0.87
	Седименты	<b><math>4.83 \times 10^6</math></b>	<b><math>2.23 \times 10^5</math></b>	<b>4.62</b>

антибиотикоустойчивых микроорганизмов в очистных сооружениях г. Пушкино являются бактерии рода *Pseudomonas* (Кошелева и соавт., 2021). Из проб воды и седиментов с трех исследуемых пляжей на среде для выделения псевдомонад (PIA) были изолированы микроорганизмы, которые дополнительно проверяли на способность к флуоресценции на среде King V и устойчивость к используемым антибиотикам. Анализ антибиотикорезистентности исследуемых штаммов показал, что только 16% культивируемых штаммов псевдомонад, изолированных из проб пляжа отеля Царьград, устойчивы к трем и более используемым антибиотикам, а 18% — чувствительны ко всем используемым. Для городского пляжа и пляжа за очистными сооружениями эти доли достигали 47 и 17%, и 75 и 1.5%, соответственно. Очевидно влияние стоков очистных сооружений на распространение мультирезистентных штаммов.

Для выявления в пробах эубактерий и псевдомонад проводили количественную ПЦР (qPCR) с парами праймеров к фрагменту гена 16S рРНК бактерий — S-D-Bact-0907-a-S-20 и S-D-Bact-1054-a-A-20 (Leser et al., 2002) и к гипервариабельной области V3-V4 гена 16S рРНК *Pseudomonas* spp. — Pse435F и Pse686R (Bergmark et al., 2012). ДНК из образцов воды и седиментов выделяли с использованием ZymoBIOMICS™ DNA Miniprep Kit (“Zymo Research”, США) по протоколу фирмы-производителя. Концентрацию ДНК определяли на спектрофотометре NanoDrop 2000 (“Thermo Scientific”, США), согласно протоколу фирмы-изготовителя. ПЦР в реальном времени осуществляли в циклере ДТлайт 4 (“ДНК-Технология”, Россия) с использованием 2.5-кратной реакционной смеси (“Синтол”, Россия), согласно инструкции производителя. Значения порогового цикла (Ct) рассчитывали, как среднее из 3-х повторов для каждого образца. Для построения стандартной кривой использовали серии 10-кратных разведений фрагментов гена 16S рРНК *Pseudomonas putida* и *Citrobacter freundii*. Эффективность ПЦР составила 86–99%, коэффициент детерминации  $R^2 > 0.99$ . После пересчета с использованием стандартов

результаты выражали как число рибосомальных оперонов на 1 г образца. Результаты qPCR демонстрируют схожее содержание как эубактерий, так и псевдомонад в пробах воды исследованных участков (табл. 1).

Однако в пробах седиментов пляжа № 3, испытывающего влияние стоков очистных сооружений г. Пушкино, обнаружено повышенное содержание как эубактерий (в 2.5 раза по сравнению с контрольным пляжем), так и бактерий рода *Pseudomonas* (в 6 раз). Процентное содержание псевдомонад от общего количества эубактерий было также самое большое в пробах седиментов пляжа № 3. Таким образом, стоки очистных сооружений влияют как на общее содержание эубактерий в донных отложениях, так и увеличивают процентное содержание псевдомонад в них (в том числе культивируемых мультирезистентных штаммов), изменяя, тем самым, состав микробного сообщества.

Сточные воды очистных сооружений, помимо влияния на состав микробных сообществ, могут являться источником антимикробных препаратов и микроорганизмов, устойчивых к антибиотикам. Образцы ДНК из проб воды и седиментов исследуемых участков реки Оки тестировали методом ПЦР на наличие генов, ассоциированных с интегронами I-го типа: гена интегразы, *intI1*, гена устойчивости к четвертичным аммонийным соединениям, *qacE/qacΔE1* (Кошелева и соавт., 2021), и R-плазмид группы несовместимости A/C (IncA/C) (Johnson et al., 2007). Считается, что интегронам класса I принадлежит ведущая роль в распространении множественной лекарственной устойчивости (Partridge et al., 2018). Плазмиды IncA/C преобладают среди патогенных штаммов *Enterobacteriaceae* и отвечают за распространение клинически значимых генов устойчивости: цефалоспорины, *blaCMY*, и карбапенемазы, *blaNDM*, а также несут детерминанты устойчивости к фторхинолонам, аминогликозидам и др. (Carattoli et al., 2012). Маркерные последовательности на наличие



интегронов I-го типа были обнаружены во всех исследованных образцах; причем методом количественной ПЦР в реальном времени не удалось выявить существенную разницу между “чистым” пляжем отеля Царьград и пляжем, испытывающим влияние очистных сооружений г. Пушкино. Напротив, ампликоны *repA* IncA/C плазмид были обнаружены только в пробах воды пляжа № 3, что свидетельствует в пользу вклада очистных сооружений в распространение плазмид резистентности этой группы в водной среде.

Таким образом, в работе продемонстрировано влияние очистных сооружений на микробное сообщество водного бассейна р. Ока, в том числе на культивируемую антибиотикоустойчивую часть микробного сообщества, а также на распространение IncA/C плазмид резистентности в водной среде.

### ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № FMRM-2022-0014).

### 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

Джамалов Р.Г., Никаноров А.М., Решетняк О.С., Сафронова Т.И. Воды бассейна Оки: химический состав и источники загрязнения // Вода и экология: проблемы и решения. 2017. Т. 71. № 3. С. 114–132.

Кошелева И.А., Измалкова Т.Ю., Сазонова О.И., Сиунова Т.В., Гафаров А.Б., Соколов С.Л., Боронин А.М. Антибиотикорезистентные микроорганизмы и детерминанты множественной лекарственной устойчивости

у бактерий рода *Pseudomonas* в очистных сооружениях г. Пушкино // Микробиология. 2021. Т. 90. С. 179–190.

Kosheleva I.A., Izmailkova T.Y., Sazonova O.I., Siunova T.V., Gafarov A.B., Sokolov S.L., Boronin A.M. Antibiotic-resistant microorganisms and multiple drug resistance determinants in *Pseudomonas* bacteria from the Pushchino wastewater treatment facilities // Microbiology (Moscow). 2021. V. 90. P. 187–197.

Barenboim G.M., Kozlova M.A. Pollution of sources of drinking water supply of large cities with pharmaceuticals (the example of Moscow, Russia) // Water Resources. 2018. V. 45. P. 941–952.

Bergmark L., Poulsen P.H.B., Abu Al-Soud W., Norman A., Hansen L.H., Sørensen S.J. Assessment of the specificity of *Burkholderia* and *Pseudomonas* qPCR assays for detection of these genera in soil using 454 pyrosequencing // FEMS Microbiol. Lett. 2012. V. 333. P. 77–84.

Carattoli A., Villa L., Poirel L., Bonnin R.A., Nordmann P. Evolution of IncA/C *bla*<sub>CMY-2</sub>-carrying plasmids by acquisition of the *bla*<sub>NDM-1</sub> carbapenemase gene // Antimicrob. Agents Chemother. 2012. V. 56. P. 783–786.

Carvalho I.T., Santos L. Antibiotics in the aquatic environment: a review of the European scenario // Environ. Int. 2016. V. 94. P. 736–757.

Fierer N., Jackson J.A., Vilgalys R., Jackson R.B. Assessment of soil microbial community structure by use of taxon-specific quantitative PCR assays // Appl. Environ. Microbiol. 2005. V. 71. P. 4117–4120.

Johnson T.J., Wannemuehler Y.M., Johnson S.J., Logue C.M., White D.G., Doetkott C., Nolan L.K. Plasmid replicon typing of commensal and pathogenic *Escherichia coli* isolates // Appl. Environ. Microbiol. 2007. V. 73. P. 1976–1983.

Leser T.D., Amenuvor J.Z., Jensen T.K., Lindecrona R.H., Boye M., Møller K. Culture-independent analysis of gut bacteria: the pig gastrointestinal tract microbiota revisited // Appl. Environ. Microbiol. 2002. V. 68. P. 673–690.

Partridge S.R., Kwong S.M., Firth N., Jensen S.O. Mobile genetic elements associated with antimicrobial resistance // Clin. Microbiol. Rev. 2018. V. 31. P. 1–61.

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2<sup>nd</sup> edn. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

## Effect of Treated Wastewater on the Distribution of Antibiotic-Resistant Microorganisms in the Aquatic Environment

T. Yu. Izmalkova<sup>1, \*</sup>, O. I. Sazonova<sup>1</sup>, and I. A. Kosheleva<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*G.K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Federal Research Center "Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences", Pushchino, 142290 Russia*

*\*e-mail: tatiz@pbcras.ru*

Received October 14, 2023; revised October 26, 2023; accepted November 1, 2023

**Abstract**—The effect of waste treatment plants in Pushchino, Russia on abundance of antibiotic-resistant microorganisms and determinants of multiple drug resistance in the Oka River water and sediments was investigated. Treated wastewater was found to contribute to contamination of the Oka surface water layer with aminoglycoside-resistant strains. The role of Pushchino waste treatment plants in the dissemination of multidrug-resistant strains and plasmids of the A/C incompatibility groups (IncA/C) was demonstrated. Waste treatment plants were shown to affect both the total abundance of eubacteria in sediments and to affect their composition, increasing the relative abundance of pseudomonads.

**Keywords:** antibiotics, waste treatment plants, multiple drug resistance, pseudomonads, integrons, plasmid incompatibility groups

УДК 579.63+579.222.2

## ВЛИЯНИЕ БИОАУГМЕНТАЦИИ *BACILLUS SUBTILIS*, *BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS*, *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ КОМПСТИРОВАНИЯ ПИЩЕВЫХ ОТХОДОВ

© 2024 г. В. В. Миронов<sup>а, \*</sup>, А. А. Щелушкина<sup>а</sup>, В. В. Острикова<sup>а</sup>, А. А. Клюкина<sup>а</sup>,  
А. В. Вантеева<sup>а</sup>, И. А. Мольдон<sup>а</sup>, В. Г. Жуков<sup>а</sup>, И. Б. Котова<sup>б</sup>, Ю. А. Николаев<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Институт микробиологии имени С.Н. Виноградского, Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071, Россия

<sup>б</sup>Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, 119991, Россия

\*e-mail: 7390530@gmail.com

Поступила в редакцию 27.10.2023 г.

После исправления 01.11.2023 г.

Принята к опубликованию 04.11.2023 г.

Применение инокулята, содержащего автохтонные компостные микроорганизмы *Bacillus subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *Pseudomonas aeruginosa*, позволило усилить биodeградацию пищевых отходов при компостировании. Выживаемость интродуцированных микроорганизмов была проверена классическими микробиологическими и молекулярно-биологическими методами. Интродукция позволила продлить высокотемпературную стадию на 4 сут, предотвратить закисление среды, увеличить деградацию органического вещества и испарение влаги, что привело к уменьшению массы отходов на 51% за две недели. Интродуцированные *P. aeruginosa*, по всей видимости, играли ключевую роль на начальной стадии и не были обнаружены после повышения температуры до 60°C.

**Ключевые слова:** пищевые отходы, биоаугментация, компостирование, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Pseudomonas aeruginosa*

DOI: 10.31857/S0026365624020209

Биоаугментация и введение питательных веществ и других дополнительных компонентов способствует повышению численности и биоразнообразия микробиоты (Tyagi et al., 2010), расширению спектра действующих ферментов (метаболических реакций), ускоренному разложению органических веществ, сокращению выбросов летучих соединений, стабилизации продуктов компостирования (Lei et al., 2000; Xi et al., 2005) и устранению патогенов (Zhong et al., 2021). На эффективность биоаугментации могут значительно влиять: изменение температуры, содержание влаги, pH, доступность питательных веществ (Nakasaki et al., 2013; Song et al., 2018; Niu, Li, 2022), так как разные микроорганизмы имеют различия в проявлении ферментативной активности в зависимости от набора физико-химических факторов (Sharma et al., 2018). Успех биоаугментации зависит от степени адаптации микроорганизмов инокулята к условиям процесса компостирования. Интродукция консорциумов микроорганизмов, включающих виды *Bacillus subtilis* и *B. amyloliquefaciens*, приводит к продлению высокотемпературной стадии, что положительно отражается на компостировании (Li et al.,

2019; Wan et al., 2020). Включение в состав инокулятов бактерий *Pseudomonas aeruginosa* (Awasthi et al., 2015), обладающих высокой способностью биodeградации большого количества соединений (Gibello et al., 2011), также перспективно.

Нестабильность состава и свойств пищевых отходов (ПО) является ограничивающим фактором при биоаугментации. Мы предположили, что использование микроорганизмов, имеющих различные адаптационные и метаболические способности, будет эффективным приемом ускорения компостирования ПО.

Целью нашей работы было оценить влияние внесения автохтонных, выделенных из компостируемых отходов, культур *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* и *P. aeruginosa* на основные параметры компостирования ПО и проверить их выживаемость.

В экспериментах использовались ПО, состоящие из просроченных продуктов типичного состава (мас. %): картофель — 18.0, капуста — 18.0, яблоки — 7.2, апельсины — 7.2, бананы — 7.2, фарш мясной — 3.6, рыба — 1.4, хлеб — 7.2, творог — 1.4, яйцо куриное — 0.6; упаковочные материалы из

полиэтилентерефталата — 5.2% и древесная щепа — 23.0%. Компоненты ПО были предварительно измельчены до размера 10–20 мм и тщательно перемешаны. Компостирование проводили в течение 28 сут на испытательном лабораторном стенде в исследовательской группе микробных процессов конверсии органических отходов (ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, РФ), описанном ранее (Mironov et al., 2021). Было задействовано 2 камеры с рабочим объемом 10 л ПО каждая: с контрольным субстратом (К) и биоаугментацией (Б). Масса каждого варианта субстрата составляла  $4516 \pm 295$  г (масса сухого органического вещества (ОВ)  $1594 \pm 104$  г). Динамику изменений pH субстрата оценивали в суспензии водной вытяжки на лабораторном pH-метре 780 pH Meter (“Metrohm AG”, Швейцария). Влажность (w, %) определяли термогравиметрическим методом в муфельной печи ПМ-16М-1200 (“ЭВС”, Россия). Потери влаги в ходе эксперимента восполнялись водопроводной водой до 60%. Для определения ОВ (%) сухую навеску сжигали в муфельной печи при температуре 550°C (Chang et al., 2023). Для инокулята были использованы бактериальные культуры, ранее выделенные нами из отходов на разных стадиях компостирования: *B. subtilis* (PRJNA979896), *B. amyloliquefaciens* (PRJNA979896) и *P. aeruginosa* (PRJNA979896). Культуры выращивали раздельно в 150 мл среды LB (Luria-Bertani, состав (г/л): триптон — 10.0, дрожжевой экстракт — 5.0, NaCl — 5.0; pH 5.9; стерилизация при 0.5 атм) при 28°C с непрерывным перемешиванием ( $130 \text{ об. мин}^{-1}$ ) в течение 1 сут, а затем смешивали в равном количестве (об./об.). В субстрат Б добавляли 300 мл этой смеси для получения итоговой концентрации клеток  $\sim 10^8$  КОЕ/г ПО. В контрольный вариант добавляли 300 мл стерильной среды LB. ПО равномерно перемешивали. Выживаемость интродуцированных микроорганизмов была проверена на 0 и 7 сут компостирования с помощью посевов на плотную питательную среду LB, значения общего микробного числа (ОМЧ) получали после 3 сут инкубирования чашек Петри при 28°C. Присутствие *P. aeruginosa* было установлено на среде LB, с помощью диагностических признаков — образование яркого сине-зеленого пигмента пиоцианина и появление характерного запаха. На примере *B. amyloliquefaciens* была подтверждена выживаемость интродуцированных микроорганизмов с помощью молекулярно-биологических методов. ПЦР в реальном времени провели с системой высокоспецифичных праймеров, разработанных для *B. amyloliquefaciens*, пригодных для детектирования данного штамма в присутствии родственных штаммов. Целевым геном для *B. amyloliquefaciens* являлся *holA*, кодирующий субъединицу дельта ДНК полимеразы III. Последовательности праймеров: *Vam-holA-F* 5'-САТААТССАТСАСТГСААГТ-3' и *Vam-holA-R* 5'-GCCAАССААТТССГАСТГ-3'. Препараты ДНК были выделены с использованием набора FastDNA™ SPIN Kit for Soil. Значение

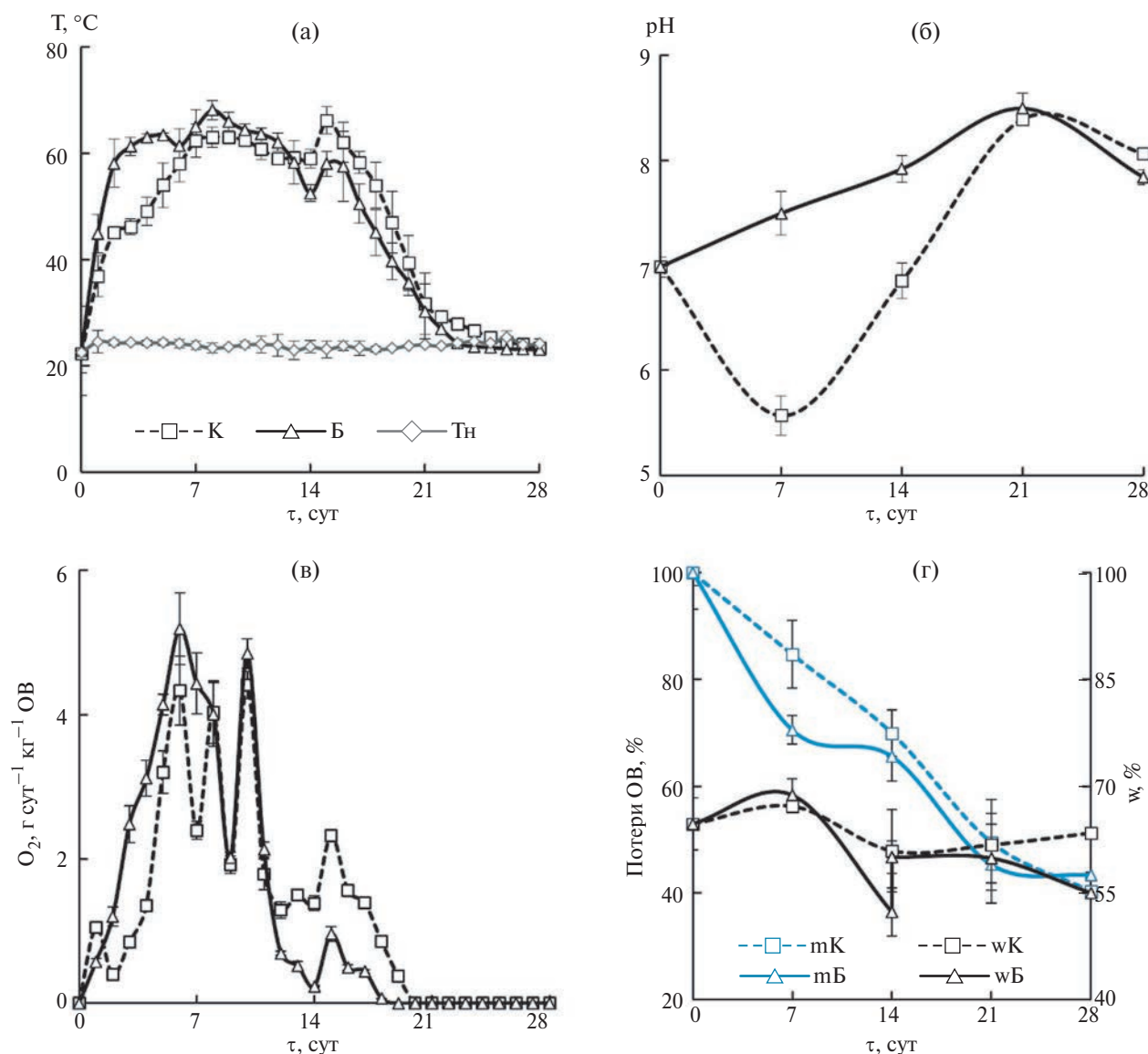
любого параметра измерялось не менее двух раз для всех видов исследований.

Динамика изменения параметров компостирования субстрата К и Б отличалась. Режим высоких температур (55–70°C) в субстрате Б был достигнут на 2-е сут за счет выделения теплоты в результате жизнедеятельности микроорганизмов, тогда как в субстрате К только на 6-е сут (рис. 1а).

Интродукция привела к сокращению времени достижения высокотемпературной стадии и увеличению ее продолжительности на 4 сут. Это опосредовано интродукцией *Bacillus* и *Pseudomonas* в субстрат Б, влияющих прямо, за счет гидролиза и последующего разложения легкодоступных субстратов, или косвенно, за счет развития активных микроорганизмов в высокотемпературной стадии, к примеру, некоторых видов *Bacillus*, *Lactobacillus* и *Streptomyces* (Chang et al., 2023). В случае субстрата К на 2 сут наблюдалось снижение потребления кислорода и сохранение температуры  $45.1 \pm 0.7^\circ\text{C}$  (рис. 1а, 1в). Схожие результаты были получены Grgić et al. (2019) при инокуляции автохтонных культур *B. subtilis* и *P. aeruginosa*. Различия в динамике процесса между субстратами в первые 7 сут связано с закислением среды в субстрате К, pH снизился с 6.87 до 5.57 (рис. 1б). В то же время pH субстрата Б повысился до 7.50, что не оказало негативного влияния на динамику процесса. Таким образом, биоаугментация предотвращала закисление среды, что способствовало более высокой микробной активности. Наши результаты подтверждают исследование Song et al. (2018), в котором внесение инокулята, включающего *Bacillus* и *Pseudomonas*, в ПО способствовало оптимизации уровня pH. ОМЧ в исходных ПО составило  $3.6 \times 10^{10}$  КОЕ/г для субстрата К и  $\sim 10^{11}$  КОЕ/г ПО для субстрата Б. *P. aeruginosa* была обнаружена только в субстрате Б в количестве  $4.0 \times 10^8$  КОЕ/г. На 7-е сут компостирования *P. aeruginosa* не выявлена в обоих субстратах. Данные бактерии не выжили вследствие высокой температуры  $> 60^\circ\text{C}$  в течение 6 сут. Это положительный показатель для безопасности получаемого продукта. Вероятно, *P. aeruginosa* внесла вклад в биодеградацию на начальной стадии, в первые сутки компостирования при температуре 22–45°C, учитывая способность данных бактерий продуцировать широкий спектр ферментов и их высокую гидролитическую активность (Gibello et al., 2011). Подобный эффект описывался ранее: инокуляция дрожжей рода *Pichia* позволила оптимизировать значения pH и ускорить достижение высокой температуры, что, в свою очередь, привело к их гибели (Nakasaki et al., 2013).

Рост температуры привел к общему снижению численности микроорганизмов на 7-е сут в обоих вариантах примерно на 1 порядок. ОМЧ составило  $2 \times 10^9$  КОЕ/г для субстрата К и  $> 10^9$  КОЕ/г для субстрата Б. С помощью молекулярно-биологических





**Рис. 1.** Динамика изменений условий компостирования субстрата с биоаугментацией (Б) и контрольного субстрата (К): а — температура субстратов (Т), температура окружающей среды (Тн); б — pH; в — расход кислорода (O<sub>2</sub>); г — потери сухого ОВ (mK, mБ) и влажность (wK, wБ) (планки погрешностей представляют собой среднее значение ± стандартное отклонение).

методов подтверждено выживание бактерий рода *Bacillus* на примере *B. amyloliquefaciens*. В исходном субстрате Б количество копий гена *holA* на мг субстрата было  $7414.0 \pm 3469.4$ , на 7-е сут значение уменьшилось в среднем в 3.7 раза, до  $1993.4 \pm 56.7$  копий гена *holA* мг<sup>-1</sup>. Широко известно о термотолерантности бактерий рода *Bacillus* (Mogeno et al., 2021), включая виды, выделенные при компостировании (Nakasaki et al., 2013; Chang et al., 2023), что косвенно подтверждает полученные результаты. Автохтонные компостные бактерии рода *Bacillus* обладают мощным ферментативным аппаратом и способны к активной продукции внеклеточных ферментов с широким температурным оптимумом (Bhattacharya, Pletschke, 2014). Вероятно,

добавление бактериального инокулята вместе с культуральной жидкостью, содержащей экзоферменты и другие метаболиты, также могло способствовать усилению биodeградации ПО. При этом условия повышенной температуры и нейтральный pH в субстрате Б могли поддерживать эффективность работы добавленных метаболитов.

Процессы дыхания, снижения органического вещества и увеличения влажности субстрата Б в первые 7 сут были интенсивнее, чем в контроле, и обусловлены влиянием инокулята. Так, максимум потребления кислорода при инокуляции составил  $5.58 \text{ г O}_2 \text{ сут}^{-1} \text{ кг}^{-1} \text{ ОВ}$ , тогда как в субстрате К —  $4.64 \text{ г O}_2 \text{ сут}^{-1} \text{ кг}^{-1} \text{ ОВ}$  на 6-е сут (рис. 1в). Ballard et al. (2017) также показывают увеличение

дыхательной активности от внесения бактериального инокулята. Значительное различие наблюдалось в скорости потерь сухой массы ОВ (рис. 1г). Потери ОВ инокулированного субстрата за первые 7 сут были на 14% больше контрольного. В этот же период влажность субстратов увеличилась с 65 до 67% (К) и 69% (Б). Такой эффект связан с активными гидролитическими процессами и дальнейшим окислением, в ходе чего ОВ метаболизировалось, и происходило интенсивное образование воды, а баланс между образованием и потерей за счет испарения смешался. В следующий период наблюдения с 7-х по 14-е сут в субстрате Б, наоборот, происходила значительная потеря влаги с 68 до 52% за счет испарения. Вероятно, в результате дальнейшего роста температуры (до максимума  $68.2 \pm 1.8^\circ\text{C}$ ) произошло замедление микробной активности, что обусловило снижение дыхания на 8–9-е сут до локального минимума  $2.02 \text{ г О}_2 \text{ сут}^{-1} \text{ кг}^{-1}$  ОВ и интенсивности разложения ОВ — масса оставалась неизменной. После выравнивания влажности субстрата Б до 60% на 14-е сут (рис. 1г), была возобновлена микробная активность, что подтверждалось увеличением дыхания и потерей ОВ с 14 по 21 сут. В контрольном субстрате количество испарившейся и образовавшейся влаги находилось в балансе за счет менее интенсивного саморазогрева, поэтому ОВ потреблялось равномерно. За 14 сут масса субстратов К и Б уменьшилась на 37 и 51%, соответственно. После 21-х сут микробное дыхание в обоих субстратах снижалось до минимума. В итоге на 28 сут компостирования различия между вариантами отсутствовали. Потери ОВ в обоих вариантах составили 57–60% от начальной массы субстратов.

Таким образом, биоаугментация автохтонными компостными микроорганизмами *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* и *P. aeruginosa* позволила интенсифицировать компостирование ПО на начальной стадии, что привело к сокращению массы отходов на 51% за 14 сут. Эффект обусловлен увеличением периода высокой температуры на 4 сут и усилением разложения ОВ без закисления среды. Это может быть полезным инструментом для повышения производительности внутрикамерных систем компостирования за счет быстрого сокращения объема отходов.

## 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

- Awasthi M.K., Pandey A.K., Bundela P.S., Khan J.* Composting of organic fraction of municipal solid waste mixed with different bulking waste: characterization of physicochemical parameters and microbial enzymatic dynamic // *Bioresour. Technol.* 2015. V. 182. P. 200–207.
- Ballardo C., Barrena R., Artola A., Sánchez A.* A novel strategy for producing compost with enhanced biopesticide properties through solid-state fermentation of bio-waste and inoculation with *Bacillus thuringiensis* // *Waste Manage.* 2017. V. 70. P. 53–58.
- Bhattacharya A., Pletschke B.* Thermophilic *Bacilli* and their enzymes in composting // *Composting for sustainable agriculture.* 2014. V. 3. P. 103–124.
- Chang Y., Zhou K., Yang T., Zhao X., Li R., Li J., Xu S., Feng Z., Ding X., Zhang L., Shi X., Su J., Li J., Wei Y.* *Bacillus licheniformis* inoculation promoted humification process for kitchen waste composting: Organic components transformation and bacterial metabolic mechanism // *Environmental Research.* 2023. V. 237. № 2. P. 15.
- Gibello A., Vela A.I., Martín M., Mengs G., Alonso P.Z., Garbi C., Fernández-Garayzábal J.F.* *Pseudomonas composti* sp. nov., isolated from compost samples // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2011. V. 61. P. 2962–2966.
- Grgić D.K., Domanovac M.V., Domanovac T. et al.* Influence of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* BSW and clinoptilolite addition on the biowaste composting process // *Arab. J. Sci. Eng.* 2019. V. 44. P. 5399–5409.
- Lei F., Gheynst J.S.V.* The effect of microbial inoculation and pH on microbial community structure changes during composting // *Process Biochem.* 2000. V. 35. P. 923–929.
- Li C., Li H., Yao T., Su M., Ran F., Han B., Li J.* Microbial inoculation influences bacterial community succession and physicochemical characteristics during pig manure composting with corn straw // *Bioresour. Technol.* 2019. V. 289. Art. 121653.
- Mironov V., Vanteeva A., Merkel A.* Microbiological activity during co-composting of food and agricultural waste for soil amendment // *Agronomy.* 2021. V. 11. Art. 928.
- Moreno J., López-González J.A., Arcos-Nievas M.A., Suárez-Estrella F., Jurado M.M., Estrella-González M.J., López M.J.* Revisiting the succession of microbial populations throughout composting: a matter of thermotolerance // *Sci. Total Environ.* 2021. V. 773. Art. 145587.
- Nakasaki K., Araya S., Mimoto H.* Inoculation of *Pichia kudriavzevii* RB1 degrades the organic acids present in raw compost material and accelerates composting // *Bioresour. Technol.* 2013. V. 144. P. 521–528.
- Niu J., Li X.* Effects of microbial inoculation with different indigenous *Bacillus* species on physicochemical characteristics and bacterial succession during short-term composting // *Fermentation.* 2022. V. 8. Art. 152.
- Sharma P., Melkania U.* Effect of bioaugmentation on hydrogen production from organic fraction of municipal solid waste // *Int. J. Hydrogen Energy.* 2018. V. 43. P. 7290–7298.

- Song C., Li M., Qi H., Zhang Y., Liu D., Xia X., Pan H., Xi B. Impact of anti-acidification microbial consortium on carbohydrate metabolism of key microbes during food waste composting // *Bioresour. Technol.* 2018. V. 259. P. 1–9.
- Tyagi M., da Fonseca M.M.R., de Carvalho C.C.C.R. Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes // *Biodegradation.* 2010. V. 22. P. 231–241.
- Wan L., Wang X., Cong C., Li J., Xu Y., Li X., Hou F. Effect of inoculating microorganisms in chicken manure composting with maize straw // *Bioresour. Technol.* 2020. V. 301. Art. 122730.
- Xi B., Zhang G., Liu H. Process kinetics of inoculation composting of municipal solid waste // *J. Hazard. Mater.* 2005. V. 124. P. 165–172.
- Zhong B., An X., An W., Xiao X., Li H., Xia X., Zhang Q. Effect of bioaugmentation on lignocellulose degradation and antibiotic resistance genes removal during biogas residues composting // *Bioresour. Technol.* 2021. V. 340. Art. 125742.

---



---

SHORT COMMUNICATIONS

---



---

### Influence of Bioaugmentation of *Bacillus subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *Pseudomonas aeruginosa* on the Efficiency of Food Waste Composting

V. V. Mironov<sup>1, \*</sup>, A. A. Shchelushkina<sup>1</sup>, V. V. Ostrikova<sup>1</sup>, A. A. Klyukina<sup>1</sup>,  
A. V. Vanteeva<sup>1</sup>, I. A. Moldon<sup>1</sup>, V. G. Zhukov<sup>1</sup>, I. B. Kotova<sup>2</sup>, and Yu. A. Nikolaev<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Winogradsky Institute of Microbiology, Research Center of Biotechnology,  
Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

<sup>2</sup>Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

\*e-mail: 7390530@gmail.com

Received October 27, 2023; revised November 3, 2023; accepted November 4, 2023

**Abstract**—The use of inoculum containing autochthonous compost microorganisms *Bacillus subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *Pseudomonas aeruginosa* allowed to enhance biodegradation of food waste during composting. The survival of the introduced microorganisms was verified by classical microbiological and molecular biological methods. The introduction extended the high-temperature stage by 4 days, prevented acidification of the medium, increased organic matter degradation and moisture evaporation, resulting in a 51% reduction in waste weight in two weeks. Introduced *P. aeruginosa* appeared to play a key role in the initial stage and was not detected after increasing the temperature to 60°C.

**Keywords:** food waste, bioaugmentation, composting, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Pseudomonas aeruginosa*

## Т4-ПОДОБНЫЕ ЦИАНОФАГИ ОЗ. БАЙКАЛ: ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ И БИОГЕОГРАФИЯ

© 2024 г. С. А. Потапов<sup>а</sup>, \*, И. В. Тихонова<sup>а</sup>, Е. Л. Кречетова<sup>б</sup>, О. И. Белых<sup>а</sup>

<sup>а</sup>ФГБУН Лимнологический институт СО РАН, Иркутск, 664033, Россия

<sup>б</sup>ФГБОУ ВО Педагогический институт “Иркутский государственный университет”, Иркутск, 664011, Россия

\*e-mail: poet1988@list.ru

Поступила в редакцию 13.10.2023 г.

После доработки 02.11.2023 г.

Принята к публикации 02.11.2023 г.

На основе анализа маркерного гена изучено разнообразие и биогеография Т4-подобных цианофагов из мелководного залива Посольский сор оз. Байкал. Выявлено высокое разнообразие нуклеотидных последовательностей фрагмента гена *g20*, установлена их уникальность. Наибольшее сходство последовательностей вирусов отмечено с таковыми из оз. Байкал, полученными ранее, и пресноводных озер, таких как олиготрофные Грин, Раунд, олигомезотрофное Анси и мезотрофное Бурже. С точки зрения биогеографии, определено, что последовательности фагов из разных экотопов оз. Байкал более сходны между собой, чем с соответствующими последовательностями из других экосистем.

**Ключевые слова:** цианофаги, генетическое разнообразие, биогеография, ген *g20*, оз. Байкал

DOI: 10.31857/S0026365624020216

Вирусы — самые многочисленные биологические объекты в водных экосистемах. Являясь облигатными внутриклеточными паразитами, они состоят из одноцепочечной или двухцепочечной молекулы РНК или ДНК, заключенной в белковый капсид, некоторые вирусы имеют дополнительную мембранную оболочку (суперкапсид). Бактериофаги (цианофаги) — вирусы, поражающие бактерии (цианобактерии), влияют на генетическое разнообразие и контролируют их численность, в значительной мере определяя биоразнообразие, структуру, продуктивность и функционирование водных экосистем (Suttle, 2007).

Исследование разнообразия вирусов в природных популяциях представляет сложную задачу, поскольку универсальных генетических маркеров для всех таксонов вирусов нет. Фаги содержат кодовые гены, т.е. гены, имеющиеся только у данной группы вирусов, капсидные и некоторые другие структурные гены. Ген *g20* Т4-подобных вирусов кодирует порталный белок, который принимает участие в инициации сборки капсида, последующей упаковке ДНК; он является также маркерным геном и успешно применяется для идентификации цианофагов семейства *Cyanoviridae* (ранее входившие в состав сем. *Myoviridae*) в природных образцах (Fuller et al., 1998; Zhong et al., 2002; Wang et al., 2004; Wilhelm et al., 2006; Zhong, Jacquet, 2013). Разнообразие и оценка с точки зрения биогеографии

гена *g20* позволяет выявить пул цианофагов, приуроченных к определенному местообитанию (эндемизм) или присутствующих в разных экосистемах (космополитность).

В 2012 году в пелагиали оз. Байкал выявлено высокое генетическое разнообразие цианофагов на основе анализа гена *g20*. Полученные результаты свидетельствуют о циркуляции в озере уникальных цианофагов. Также были показаны отличия в составе цианофагов из разных котловин озера (Бутина и соавт., 2012). В 2015 году на основе фрагментов гена *g20* проведен молекулярно-генетический анализ цианофагов в составе ассоциированного сообщества эндемичной байкальской губки *Lubomirskia baicalensis* (Бутина и соавт., 2015).

В настоящее время литоральная зона озера Байкал и ее мелководные заливы с высокой рекреационной нагрузкой испытывают значительное антропогенное воздействие (Shtykova et al., 2019). В этой связи очень важно проводить исследования в период изменения состояния качества вод Байкала, в частности, наблюдать изменения в составе цианофагов.

Цель настоящей работы заключается в выявлении генетического разнообразия Т4-подобных цианофагов по маркерному гену *g20* в мелководном заливе оз. Байкал и анализе полученных данных с точки зрения биогеографии.



Пробы воды отбирали в летнее время (август) в мелководном заливе Посольский сор в стерильные флаконы (2018 г.; 51.96556° с.ш.; 106.17181° в.д.) на глубине 0.5 м. Для получения цианофагов, ассоциированных с их хозяевами (бактериальная фракция, более 0.2 мкм), образцы воды фильтровали через стерильные поликарбонатные фильтры ("Millipore", США) с диаметром пор 0.2 мкм. Выделение ДНК проводили фенол-хлороформным методом.

ПЦР выполняли с использованием праймеров к гену *g20*: CPS1 и CPS4 (Fuller et al., 1998; Zhong et al., 2002). Ампликоны очищали на магнитных шариках CleanMag DNA ("Евроген", Россия) по методике, описанной в протоколе. Подготовка библиотеки и секвенирование на Illumina MiSeq (2\*300) выполнены в ЦКП "Геномика" (Новосибирск, Россия).

Контроль качества полученных прочтений осуществляли с помощью программы FastQC v. 1.11.4 (Andrews, 2010), затем данные были отсортированы по качеству с помощью Trimmomatic v. 0.36 (Bolger et al., 2014). В программе USEARCH v. 11.0.667 (Edgar, 2010) объединяли левые и правые риды, удаляли праймеры. Идентичные последовательности исключали из последующего анализа путем кластеризации на 100% (алгоритм Unoise3), на этом же этапе удаляли химеры.

Полученные нуклеотидные последовательности транслировали в белки с помощью программы BioEdit v. 7.2.6.1 (Hall, 1999). Ближайших родственников определяли с помощью BLASTp анализа (параметр  $e\text{-value } 10^{-3}$ ), используя базы данных NCBI. Выравнивание аминокислотных последовательностей проводили в программе MEGA7 (Kumar et al., 2016), алгоритм Clustal W. Деревья строили в программе Mr. Bayes v. 3.2.7 (Huelsenbeck, Ronquist, 2001). Для визуализации дерева использовали программу FigTree v. 1.4.4 (Rambaut, 2010).

Для оценки  $\alpha$ - и  $\beta$ -разнообразия использовали нуклеотидные последовательности, доступные в NCBI. Оценку  $\alpha$ -разнообразия осуществляли с помощью программы DNASP v. 6.12 (Rozas et al., 2017). Для оценки  $\beta$ -разнообразия на основе аминокислотных последовательностей гена *g20* из различных водоемов получали матрицу дистанций метрикой UniFrac, с последующим использованием иерархического кластерного анализа Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA). Дендрограммы получали на основе сравнения байкальских фрагментов гена *g20* с 17 пулами фрагментов из различных источников (озера, рисовые поля, моря), доступные в базе данных NCBI.

Обработанные нуклеотидные последовательности данного исследования депонированы в международную базу данных GenBank (NCBI) под номерами ON089135—ON089292.

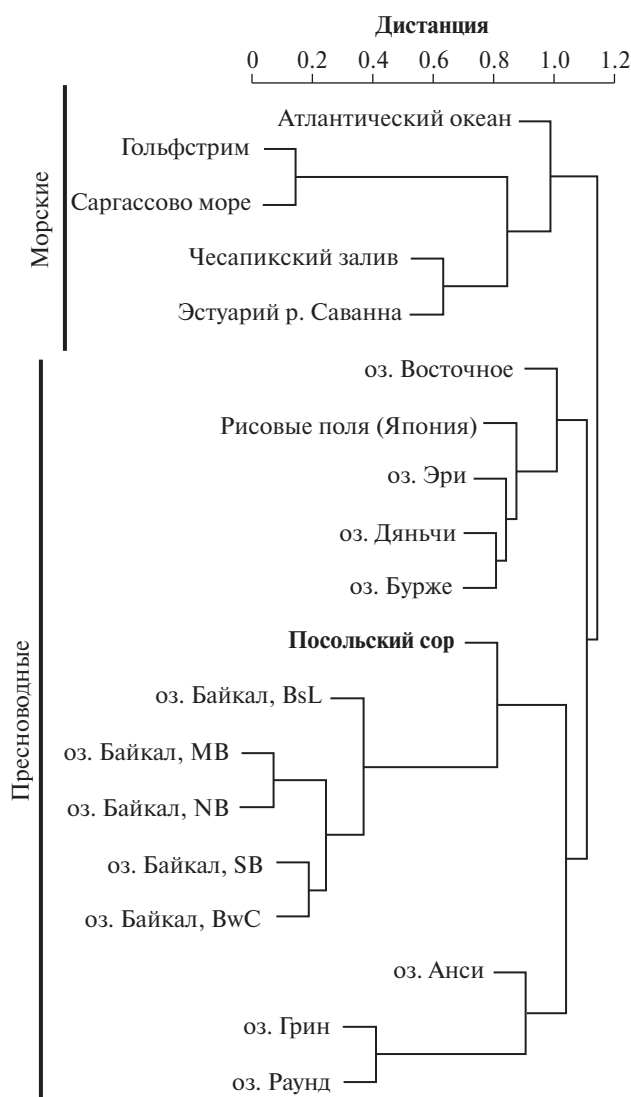
В результате обработки первичных данных секвенирования фрагмента гена *g20* получено 158 последовательностей Zotu (zero-radius OTU). Анализ BLASTp (база данных NCBI NR) показал, что наибольшее количество последовательностей (32.3%) сходно с последовательностями из оз. Байкал, полученных в предыдущих исследованиях. Следует отметить, что только 1.9% последовательностей из планктона Посольского сора близкородственно с вирусами из байкальской губки (*Lubomirskia baicalensis*), вероятно, из-за уникального как микробного, так и вирусного сообщества губки. Среди других экосистем большее количество сходных последовательностей было с субальпийскими озерами Анси и Бурже (Франция) — 15.8%, возможно, из-за значительного сходства гидрофизических и гидрохимических параметров (общий фосфор, общий азот, нитраты, pH), а также сходного состава бактериопланктона.

BLASTp анализ фрагмента гена с последовательностями, принадлежащими культивированным фагам, показал наибольшее сходство с цианофагами из Саргассова моря *Synechococcus* phage S-SSM7 (сходство 88.5%), хозяином которого является *Synechococcus* sp. WH8109 и *Prochlorococcus* phage Syn33 (сходство 72.7%), изолированного из Атлантического океана, хозяин *Synechococcus* sp. WH7803. Среди культивированных ближайших родственников не было последовательностей со 100% идентичностью.

Для оценки  $\alpha$ -разнообразия проведен сравнительный анализ последовательностей на основе нуклеотидов ( $\pi$ ). Последовательности из Посольского сора имели значение нуклеотидного разнообразия 0.30. Среди байкальских, последовательности из Посольского сора отличаются наибольшим нуклеотидным разнообразием по гену *g20*. Такое же значение характерно для последовательностей, полученных из Чесапикского залива и оз. Бурже.

Филогенетический анализ аминокислотных последовательностей *g20* с последовательностями культивированных и некультивированных фагов из различных природных источников показал высокое генетическое разнообразие вирусов в оз. Байкал. Последовательности из залива Посольский сор распределились по всему дереву, формируя как отдельные ветви, так и несколько монофилетических групп, что говорит об уникальности этих генотипов.

Методом UPGMA продемонстрировано, что распределение вирусов связано со средой обитания. Морские и пресноводные вирусы обычно не являются генетически близкими и группируются в обособленные филогенетические кластеры, как и следует из выполненного нами анализа. Последовательности из планктона залива Посольский сор сформировали общий кластер вместе с последовательностями, ранее полученными из различных



**Рис. 1.** Дендрограмма UPGMA, построенная с использованием последовательности гена *g20* (аминокислотный уровень). BsL — *Lubomirskia baicalensis*; WwC — вода, южная котловина; SB — вода, южная котловина; MB — вода, средняя котловина; NB — вода, северная котловина. Образец из этого исследования выделен жирным шрифтом.

эктопов оз. Байкал, включая эндемичные губки. Последовательности из оз. Байкал вошли в со-вместный кластер с таковыми из оз. Грин (США), Раунд (США) и Анси (Франция). Последовательности из озер Восточное (Китай), Дяньчи (Китай), Бурже (Франция) и Эри (США), вместе с последовательностями из рисовых полей (Япония), образовали отдельный кластер. Также, показано, что все байкальские последовательности группируются в общий кластер (рис. 1).

Таким образом, анализ последовательностей *g20* выявил высокое разнообразие и уникальность цианофагов оз. Байкал. Наибольшее количество идентичных последовательностей наблюдается с генами

*g20* некультивированных цианофагов из оз. Байкал и озер Бурже и Анси. Филогенетическая близость значительной доли генов *g20* из оз. Байкал с генами фагов, инфицирующих виды рода *Synechococcus*, согласуется с фактом большого видового разнообразия и массового развития пикоцианобактерий этого рода в озере (Belykh et al., 2006). Поскольку последовательности, полученные из Посольского сора, на филогенетическом древе кластеризуются с последовательностями некультивированных фагов из пресных водоемов, определить круг хозяев этих вирусов очень сложно; вероятно, что они поражают пресноводные виды цианобактерий и филогенетически далеки от морских цианофагов. Анализ с точки зрения биогеографии показал, что последовательности из залива Посольский сор формируют группу с байкальскими последовательностями, несмотря на отдаленные точки отбора, сезон, различный трофический статус пелагиали и литорали оз. Байкал, глубину и фракцию отбора. Такую же картину мы наблюдали при анализе *g23* гена бактериофагов из фракции более 0.2 мкм (Potapov et al., 2022).

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках темы госзадания ЛИН СО РАН № 0279-2021-0015 “Исследования вирусных и бактериальных сообществ как основы стабильного функционирования пресноводных экосистем и эффективного ответа в условиях антропогенного воздействия”.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бутина Т.В., Потанов С.А., Белых О.И., Дамдинсурэн Н., Чойдаш Б. Генетическое разнообразие цианофагов семейства *Myoviridae* в озере Байкал // Известия ИГУ. Сер. Биология. Экология. 2012. Т. 5. № 3. С. 17–22.
- Бутина Т.В., Потанов С.А., Белых О.И., Беликов С.И. Генетическое разнообразие цианофагов семейства *Myoviridae* в составе сообщества байкальской губки *Lubomirskia baicalensis* // Генетика. 2015. Т. 51. С. 384–388.
- Butina T.V., Potapov S.A., Belykh O.I., Belikov S.I. Genetic diversity of the family *Myoviridae* cyanophages in the community of the Baikal sponge *Lubomirskia baicalensis* // Genetics. 2015. V. 51. P. 313–317.
- Andrews S. FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data // 2010. [Online]. Available online at:

<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>.

Belykh O.I., Sorokovikova E.G., Saphonova A., Tikhonova I.V. Autotrophic picoplankton of Lake Baikal: composition, abundance, and structure // *Hydrobiologia*. 2006. V. 568S. P. 9–17.

Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data // *Bioinformatics*. 2014. V. 30. P. 2114–2120.

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

Fuller N.J., Wilson W.H., Joint I.R., Mann N.H. Occurrence of a sequence in marine cyanophages similar to that of T4 *g20* and its application to PCR-based detection and quantification techniques // *Appl. Environ. Microbiol.* 1998. V. 64. P. 2051–2060.

Hall T. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT // *Nucleic Acids Symp. Ser.* 1999. V. 41. P. 95–98.

Huelsenbeck J.P., Ronquist F. MRBAYES: bayesian inference of phylogenetic trees // *Bioinformatics*. 2001. V. 17. P. 754–755.

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.

Potapov S.A., Tikhonova I.V., Krasnopeev A.Y., Suslova M.Y., Zhuchenko N.A., Drucker V.V., Belykh O.I. Communities of T4-like bacteriophages associated with bacteria in Lake Baikal: diversity and biogeography // *Peer J*. 2022. V. 10. Art. e12748.

Rambaut A. 2010. FigTree v1.3.1. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh, Edinburgh. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/> (дата обращения 15.01.2023).

Rozas J., Ferrer-Mata A., Sánchez-DelBarrio J.C., Guirao-Rico S., Librado P., Ramos-Onsins S.E., Sánchez-Gracia A. DnaSP 6: dNA sequence polymorphism analysis of large data sets // *Mol. Biol. Evol.* 2017. V. 34. P. 3299–3302.

Shlykova Yu.R., Suslova M. Yu., Drucker V.V., Belykh O.I. Modern approach to the assessment of the sanitary-bacteriological condition of Lake Baikal // *Limnol. Freshwater Biol.* 2019. V. 2. P. 210–217.

Suttle C.A. Marine viruses — major players in the global ecosystem // *Nature Revs. Microbiol.* 2007. V. 5. P. 801–812.

Wang K., Chen F. Genetic diversity and population dynamics of cyanophage communities in the Chesapeake Bay // *Aquat. Microb. Ecol.* 2004. V. 34. P. 105–116.

Wilhelm S.W., Carberry M.J., Eldridge M.L., Poorvin L., Saxton M.A., Doblin M.A. Marine and freshwater cyanophages in a Laurentian Great Lake: evidence from infectivity assays and molecular analyses of *g20* genes // *Appl. Environ. Microbiol.* 2006. V. 72. P. 4957–4963.

Zhong Y., Chen F., Wilhelm S.W., Poorvin L., Hodson R.E. Phylogenetic diversity of marine cyanophage isolates and natural virus communities as revealed by sequences of viral capsid assembly protein gene *g20* // *Society*. 2002. V. 68. P. 1576–1584.

Zhong X., Jacquet S. Prevalence of viral photosynthetic and capsid protein genes from cyanophages in two large and deep perialpine lakes // *Appl. Environ. Microbiol.* 2013. V. 79. P. 7169–7178.

---



---

## SHORT COMMUNICATIONS

---



---

### T4-Like Cyanophages of Lake Baikal: Genetic Diversity and Biogeography

S. A. Potapov<sup>1, \*</sup>, I. V. Tikhonova<sup>1</sup>, E. L. Krechetova<sup>2</sup>, and O. I. Belykh<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Limnological Institute, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Irkutsk, 664033 Russia*

<sup>2</sup>*Irkutsk State University Pedagogical Institute, Irkutsk, 664011 Russia*

\*e-mail: poet1988@list.ru

Received October 13, 2023; revised November 2, 2023; accepted November 2, 2023

**Abstract**—The work deals with investigation of genetic diversity and biogeography of T4-like cyanophages from the shallow bay of the Posolsk Sor (Lake Baikal), based on analysis of the *g20* marker gene. High diversity of *g20* gene fragments and their uniqueness were revealed. The greatest similarity was noted with the previously obtained sequences from Lake Baikal and with those from freshwater ecosystems: oligotrophic Lake Green, Lake Round, oligomesotrophic Lake Ancy, and mesotrophic Lake Bourget. From the point of view of biogeography, it was determined that the phage sequences were similar to the previously obtained ones from different Lake Baikal ecotopes than to those from other ecosystems.

**Keywords:** cyanophages, genetic diversity, biogeography, gene *g20*, Lake Baikal



УДК 579.62+579.262

## ФЕКАЛЬНАЯ МИКРОБИОТА ЗАБАЙКАЛЬСКИХ ВЕРБЛЮДОВ (*CAMELUS BACTRIANUS*) ПРИ РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЯХ СОДЕРЖАНИЯ

© 2024 г. Е. В. Лаврентьева<sup>a, b, \*</sup>, Т. Г. Банзаракцаева<sup>a</sup>, Д. Д. Цыренова<sup>a</sup>, В. Б. Дамбаев<sup>a</sup>,  
Ш. А. Бегматов<sup>c</sup>, А. В. Марданов<sup>c</sup>, Д. Д. Бархутова<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН, Улан-Удэ, 660047, Россия

<sup>b</sup>Бурятский государственный университет имени Доржи Банзарова, Улан-Удэ, 670000, Россия

<sup>c</sup>ФИЦ “Фундаментальные основы биотехнологии” РАН, Москва, 119071, Россия

\*e-mail: lena\_l@mail.ru

Поступила в редакцию 16.10.2023 г.

После доработки 10.11.2023 г.

Принята к публикации 10.11.2023 г.

Выявлено микробное разнообразие в образцах фекалий двугорбых верблюдов Забайкалья при различных условиях содержания (свободный выпас, смешанное и стойловое содержание) с помощью высокопроизводительного секвенирования V3–V4 переменных участков гена 16S рРНК. Показано, что прокариотное сообщество в фекальной микробиоте является разнообразным, и зависит от условий содержания верблюдов. Наиболее распространенными филумами фекальной микробиоты верблюдов были *Bacillota* и *Bacteroidota*. Филум *Verrucomicrobiota* являлся кодоминантом в фекальной микробиоте I и II группы животных, *Actinomycetota* — в микробном сообществе фекалий верблюдов III группы. Изменения в структуре фекальной микробиоты и таксономическом составе происходят в зависимости от условий содержания. Различия в сообществах фекальной микробиоты между самками и самцами верблюдов заключались в обилии таксонов, а не в их присутствии или отсутствии. Полученные результаты вносят вклад в современное понимание фекальной микробиоты верблюдов при различных условиях содержания и предоставляют свидетельства о влиянии питания на микробиоту фекалий при различных условиях содержания. Наши результаты могут быть полезны для решения вопросов воспроизводства и сохранения забайкальского верблюда (*Camelus bactrianus*).

**Ключевые слова:** фекальная микробиота, высокопроизводительное секвенирование переменных участков гена 16S рРНК, забайкальский верблюд, *Camelus bactrianus*, кутикулярно-копрологический метод, условия выпаса

DOI: 10.31857/S0026365624020224

Домашние двугорбые верблюды (*Camelus bactrianus*) распространены в Центральной (Казахстан, Иран) и Восточной (Россия, Монголия, Китай) Азии. Эти животные естественным образом адаптировались к суровым условиям окружающей среды: от скалистых гор до сухих степей и холодных (полу)пустынь (Mohandesan et al., 2017). Если микробиом двугорбых верблюдов Китая, Индии и Монголии изучается в течение последнего десятилетия (Ming et al., 2017; He et al., 2018; Gharechahi et al., 2022), то исследования микробиома двугорбых верблюдов России начаты Карначук О.В. и др., в 2021 г. (Karnachuk et al., 2023).

Цель настоящего исследования — изучить микробное разнообразие в образцах фекалий двугорбых верблюдов Забайкалья при различных условиях содержания (свободный выпас, смешанное содержание, стойловое содержание) с помощью

высокопроизводительного секвенирования ампликонов гена 16S рРНК.

В Забайкалье обитает популяция двугорбых верблюдов (*C. bactrianus*) — забайкальский верблюд, который имеет монгольское происхождение. В XXI веке верблюды забайкальской популяции практически исчезли, так, по данным Росстата на 01.08.2021 г., насчитывалось 256 голов, которые в основном находились на свободном пастбищном выпасе. Содержание в стойловом или пастбищно-стойловом содержании в животноводческих хозяйствах не распространено. В настоящее время остро стоит вопрос о восстановлении и сохранении популяции забайкальских верблюдов. Исследование микробиома внесет вклад в решение данного вопроса, т.к. состав микробиома животного тесно связан с окружающей средой и образом жизни.

Образцы фекалий у 6 двугорбых верблюдов забайкальской популяции были отобраны на



территории Забайкальского края и республики Бурятия весной 2022 года. Нами определены три группы животных в зависимости от содержания: I группа — 7-летняя самка и 4-летний самец, находящиеся круглый год на свободном пастбищном выпасе (Забайкальский край); II группа — 7-летняя самка и 10-летний самец, находящиеся на смешанном (пастбищно-стойловом) выпасе, на огороженной территории Агинского дацана в Забайкальском крае; III группа — 6-летняя самка и 6-летний самец, находящиеся на стойловом содержании на территории этнозоопарка в Республике Бурятия.

Свежие образцы фекалий собирали сразу после дефекации в пластиковые герметично закрывающиеся пакеты. Транспортировка в лабораторию осуществлялась в сухом льду в течение 12 ч. Тотальную геномную ДНК из фекалий экстрагировали с использованием набора для выделения ДНК Power Soil (“MO BIO Laboratories, Inc.”, Карлсбад, Калифорния, США) и хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$ . ПЦР-амплификацию фрагментов гена 16S рРНК, включающих вариабельные регионы V3–V4, проводили с использованием универсальных прокариотических праймеров PRK 341F (5'-CCTAYG GGDVGCWSCAG) и 806R (5'-GGA CTA CNVGGG THTCTAAT) (Frey et al., 2016).

Библиотеки были проиндексированы с использованием Nextera XT Index Kit v.2 (“Illumina”, США) и секвенированы на платформе MiSeq в формате парного чтения ( $2 \times 300$ ). Парные чтения были объединены с помощью FLASH v.1.2.11 (Magoc et al., 2011). Последовательности гена 16S

рРНК были кластеризованы в операционные таксономические единицы (ОТЕ) с 97% идентичностью с использованием программы USEARCH v. 11 (Edgar, 2010). Считывания низкого качества, химерные последовательности и одиночные элементы были удалены алгоритмом USEARCH. Для расчета распространенности ОТЕ все полученные чтения были сопоставлены с последовательностями ОТЕ с порогом идентичности 97% с помощью USEARCH. Таксономическое присвоение OTU осуществляли путем поиска в базе данных последовательностей рРНК SILVA v.138 с использованием алгоритма VSEARCH v. 2.14.1 (Rognes et al., 2016). Последовательности фрагментов гена 16S рРНК депонированы в базе NCBI Sequence Read Archive (SRA) и доступны через BioProject PRJNA785979.

Для определения качественного и количественного состава кормов в образцах фекалий использовали метод микроскопического кутикулярно-копрологического анализа растений (Holechek et al., 1982). Корреляционный анализ Пирсона (порог значимости  $p < 0.05$ ) между фекальной микробиотой и рационом верблюдов был проведен с использованием программного обеспечения Statistica12 (“StatSoft”, США).

В общей сложности в 6 образцах фекалий было получено 52871 достоверных нуклеотидных последовательностей. Наблюдаемое богатство и филогенетическое разнообразие были использованы для оценки разнообразия микробных сообществ.

**Таблица 1.** Разнообразие и таксономическая структура и фекальной микробиоты верблюдов

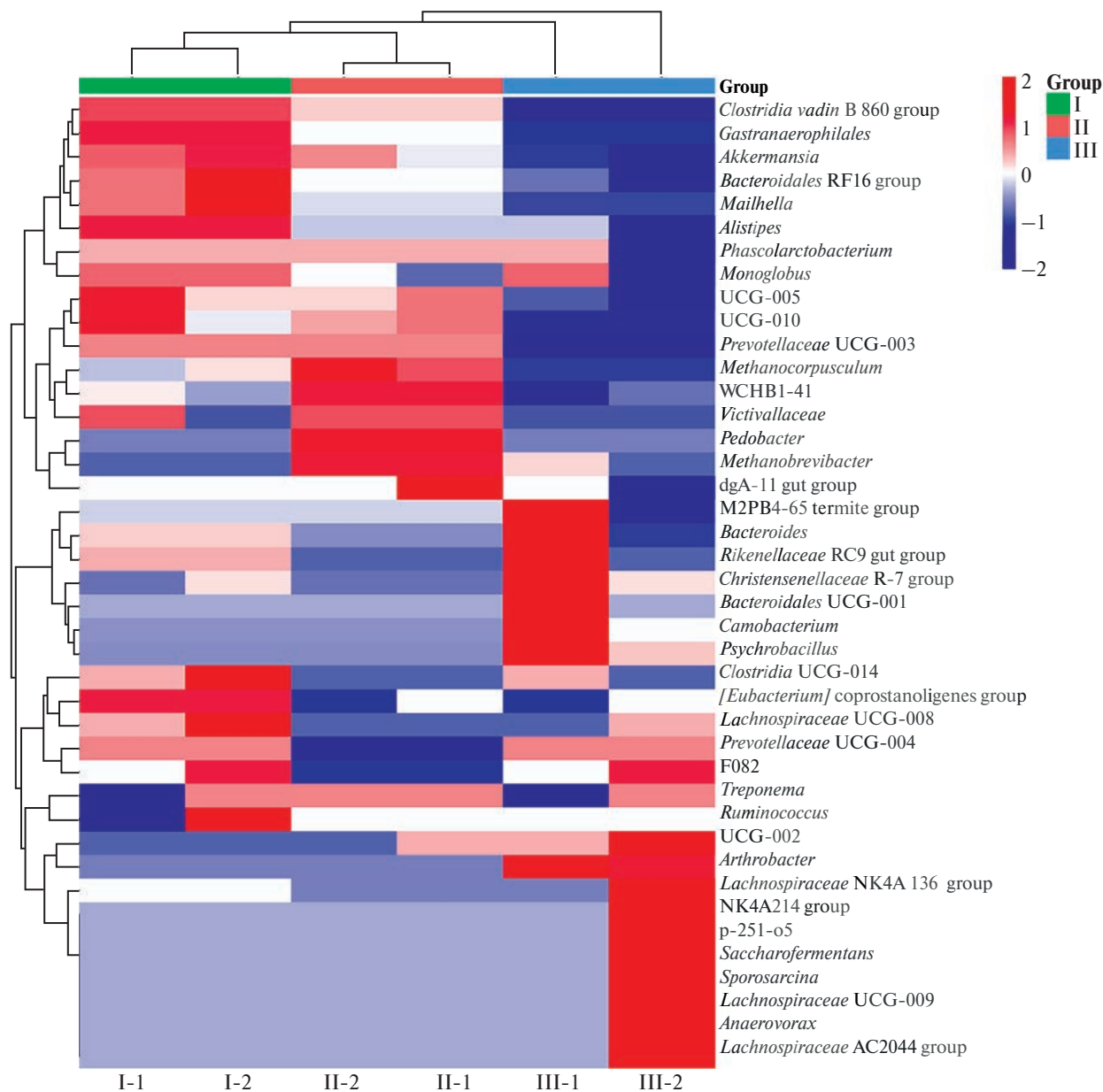
Группа	I		II		III	
	Самка	Самец	Самка	Самец	Самка	Самец
Пол						
Возраст	7	4	7	10	6	6
Количество последовательностей	11711	9393	7557	8111	9969	6130
ОТЕ	1079	1018	760	733	788	716
Индексы $\alpha$ -разнообразия						
Shannon	5.8	5.7	5.3	5.2	5.0	5.3
Chao-1	1470	1459	1012	932.8	967.3	725
ACE	1429	1417	1057	950.8	994.4	742.2
Таксономическая структура (%)						
<i>Bacillota</i>	49.7	46.1	48.0	43.3	49.8	67.4
<i>Bacteroidota</i>	25.6	28.1	20.9	21.4	32.7	14.6
<i>Actinomycetota</i>	0.1	0.1	2.0	2.0	12.6	12.0
<i>Verrucomicrobiota</i>	14.9	14.5	16.9	19.6	1.3	2.2
<i>Euryarchaeota</i>	0.5	0.4	1.9	2.0	1.6	0.2
<i>Halobacterota</i>	2.4	2.6	4.8	5.7	0.1	0.5
Другие	6.8	8.2	5.5	6	1.9	3.1

Количество ОТЕ и показатели  $\alpha$ -разнообразия различались между группами животных (табл. 1). Индекс разнообразия Шеннона и значения  $Chao1$  и ACE, основанные на оценке охвата, были значительно выше в I группе животных.

В фекальной микробиоте верблюдов забайкальской популяции доминировали бактериальные филумы *Bacillota* и *Bacteroidota* независимо от условий содержания, возраста и пола верблюдов. Считается, что обилие этих двух основных филумов в значительной степени соответствует зрелому микробиому верблюдов (Gharechahi et al., 2015). Филум *Verrucomicrobiota* являлся кодоминантом

в фекальной микробиоте I и II групп животных, *Actinomycetota* – в микробном сообществе фекалий верблюдов III группы, находящихся на стойловом содержании. Другие бактериальные последовательности (>1% всех последовательностей гена 16S рРНК) были отнесены к следующим филумам: *Cyanobacteriota*, *Pseudomonadota*, *Spirochaetota* и *Thermodesulfobacterota*. Археи были представлены филумами *Halobacterota* и *Euryarchaeota* и наибольшее количество обнаружены во II группе животных, при смешанном выпасе.

На родовом уровне в фекальной микробиоте I группы наиболее распространенными представителями



**Рис. 1.** Тепловая карта, показывающая иерархическую кластеризацию состава фекальной микробиоты среди трех групп (I, II, III) животных на основе высокопроизводительного секвенирования ампликонов гена 16S рРНК (I-1, II-1, III-1 самки; I-2, II-2, III-2 самцы).

микроорганизмов являлись *Akkermansia*, *Bacteroides*, *Monoglobus*, *Alistipes*, *Methanocorpusculum*, *Mailhella* и некультивируемые *UCG-010*, *Clostridia vadinBB60 group*, *Rikenellaceae RC9 gut group*, *WCHB1-41*. Доминантные таксоны на уровне рода *Akkermansia*, *Methanobrevibacter*, *Methanocorpusculum* и некультивируемые *UCG-010*, *UCG-005*, *WCHB1-41*, *Rikenellaceae RC9 gut group*, [*Eubacterium*] *coprostanoligenes group*, *Prevotellaceae UCG-003* были обнаружены во II группе животных, находящихся на смешанном выпасе. Другие рода, такие как *Arthrobacter*, *Psychrobacillus*, *Carnobacterium* и *Christensenellaceae R-7 group*, *Bacteroides*, *F082, p-251-o5*, *Lachnospiraceae NK4A136 group*, *Lachnospiraceae UCG-009*, *Bacteroidales UCG-001* были доминирующими в III группе животных (рис. 1).

Бактерии филума *Bacillota* и *Bacteroidota* были наиболее распространенными представителями в фекальной микробиоте верблюдов, что согласуется с предыдущими исследованиями (Samsudin et al., 2011, Rabee et al., 2020; Karnachuk et al., 2023). Представители *Bacillota* и *Bacteroidota* с функциональной точки тесно связаны с метаболизмом углеводов, белков и клетчатки и, вероятно, играют главную роль в переваривании корма у верблюдов (Huo et al., 2014). Высокая доля *Ruminococcaceae* и *Lachnospiraceae*, *Rikenellaceae* и *Christensenellaceae* подтверждает это предположение. Кроме того, *Ruminococcaceae* и *Christensenellaceae* рассматриваются как потенциально полезные бактерии, поскольку они участвуют в положительной регуляции кишечной среды и связаны с иммуномодуляцией и здоровым гомеостазом (He et al., 2019).

Филум *Verrucomicrobiota* в I и II группе животных в основном представлен бактериями рода *Akkermansia*, которые играют важную роль в биологии двугорбых верблюдов. Было отмечено, что бактерии рода *Akkermansia* способствуют снижению уровня глюкозы в крови и предоставляют возможность переносить высокое потребление соли с пищей (He et al., 2018). В отличие от I и II групп животных, в III группе выявлено содоминирование бактерий рода *Arthrobacter* филума *Actinomycetota*. По данным EzBioCloud все флотипы, полученные в данном исследовании, были близкородственными к культивируемым видам *Arthrobacter gengyunqii* и *Arthrobacter sunyamini*, которые были выделены из фекалий и содержимого кишечника гималайского сурка на уровне 99% сходства (Zhang et al., 2022; Liu et al., 2023).

Мы предполагаем, что распространение *Arthrobacter* в фекальной микробиоте у III группы животных связано с питанием. Питание верблюдов в этнозоопарке состоит на 80% из сена, 15% из кормового концентрата (зерносмесь ячменя, пшеницы, отрубей пшеничных; ГОСТ 51899-2002) и 5% из корнеплодов. Высокая относительная численность *Arthrobacter* в фекалиях верблюдов, находящихся на стойловом содержании, требует

дальнейших исследований, т.к. в настоящее время имеется значительный недостаток информации о роли *Actinobacteriota* в биологии и экологии микробиома кишечника животных.

Микростологический анализ фекалий верблюдов выявил фрагменты 35 видов растений. Основу рациона у животных групп I и III составляло разнотравье (82 и 87.6%). В образцах фекалий верблюдов группы I наиболее встречаемыми видами являлись *Lappula myosotis* (26%), *Carex pediformis* (16%), *Aster alpinus* и *Saussurea salicifolia* (по 10%). У верблюдов группы III в фекалиях преимущественно были обнаружены *Artemisia sieversiana* и *Lappula myosotis* (по 16%), *Carex pediformis* (15%), *Thermopsis lanceolata* и *Goniolimon speciosum* (по 9%). В фекалиях верблюдов группы II основу рациона составляли злаковые с доминированием *Agropyron cristatum* (51%). Вероятно, преобладание в питании верблюдов II группы одного вида растения связано с ограниченной территорией выпаса.

Корреляционный анализ по Пирсону (порог значимости  $p < 0.05$ ) между фекальной микробиотой и рационом показал, что 36 доминирующих родов бактерий были в значительной степени связаны с 15 видами растений. *Bacteroides*, *Mailhella*, *Ruminococcus*, *Methanocorpusculum*, некультивируемые *UCG-014*, *Rikenellaceae RC9 gut group* и *WCHB1-41*, доминирующие в фекальной микробиоте I и II групп верблюдов, положительно коррелировали с растениями видов *Lappula myosotis*, *Koeleria cristata*, *Schizonepeta multifida*, *Potentilla acaulis*, *Agropyron cristatum* ( $r = 0.8-0.9$ ). Доминирующие рода бактерий I и II групп животных имели отрицательные коэффициенты корреляции ( $r = -0.8$  и  $-0.9$ ) с видами растений *Goniolimon speciosum*, *Artemisia sieversiana* и *Thermopsis lanceolata*. Доминанты фекальной микробиоты III группы *NK4A214 group*, *Arthrobacter*, *Bacteroidales UCG-001*, *Psychrobacillus* показали положительную взаимосвязь ( $r = 0.9$ ) с *Goniolimon speciosum*, *Artemisia sieversiana*, *Thermopsis lanceolata*, *Artemisia dracuncul*, *Achnatherum splendens*. Следует отметить, что доминанты фекальной микробиоты III группы верблюдов, в отличие от фекальной микробиоты I и II групп, имели наибольшее количество положительных корреляций с растениями, что, вероятно, обусловлено более разнообразным питанием.

Результаты этого исследования ясно продемонстрировали, что изменения в структуре фекальной микробиоты и таксономическом составе происходят при различных условиях содержания верблюдов и их питания. Кроме того, у самок и самцов были обнаружены разные доминанты на уровне рода. Так, например, в III группе животных было показано доминирование у самок представителей *Bacteroides*, *Monoglobus*, *Prevotellaceae UCG-003*, *Phascolarctobacterium*, *Bacteroidales UCG-001*,



*Psychrobacillus* и *Carnobacterium*, тогда как у самцов доминировали *WCHB1-41*, *Clostridia\_UCG-014*, *F082*, *p-251-o5*, *Lachnospiraceae\_NK4A136\_group* и *Anaerovorax*. В целом, необходимо отметить, что различия в сообществах фекальной микробиоты между самками и самцами верблюдов заключаются в обилии таксонов, а не в их присутствии или отсутствии. Считается, что наибольшее разнообразие у самок верблюдов связано с физиологией, т.к. им требуется больше энергии в процессе лактации и размножения (Bhatt et al., 2013).

Таким образом, пилотное исследование показало, что прокарриотное сообщество в фекальной микробиоте является разнообразным и зависит от условий содержания верблюдов. Отмечено, что свободный выпас верблюдов обусловил обилие бактерий, разлагающих клетчатку (*Ruminococcaceae* и *Rikenellaceae*), в то время как кормление на стойловом содержании увеличивало количество бактерий, разлагающих белки и углеводы (*Caryophanaceae*). Полученные результаты вносят вклад в современное понимание фекальной микробиоты верблюдов при различных условиях содержания и предоставляют свидетельства о влиянии питания на микробиоту фекалий при различных условиях содержания.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий на 2019–2027 годы (Соглашение № 075-15-2021-1401 от 3 ноября 2021 г.).

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Aricha H., Simujide H., Wang C., Zhang J., Lv W., Jimisi X., Liu B., Chen H., Zhang C., He L., Cui Y., Gao R., Aorigele C. Comparative analysis of fecal microbiota of grazing mongolian cattle from different regions in Inner Mongolia, China // *Animals (Basel)*. 2021. V. 11. Art. 1938.  
Bhatt V.D., Dande S.S., Patil N.V., Joshi C.G. Molecular analysis of the bacterial microbiome in the forestomach fluid from the dromedary camel (*Camelus dromedarius*) // *Mol. Biol. Rep.* 2013. V. 40. P. 3363–3371.

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.

Gharechahi J., Sarikhan S., Han J.L., Ding X. Zh., Salekdeh G.H. Functional and phylogenetic analyses of camel rumen microbiota associated with different lignocellulosic substrates // *NPJ Biofilms Microbiomes*. 2022. V. 8. Art. 46.

Gharechahi J., Zahiri H.S., Noghabi K.A., Salekdeh G.H. In-depth diversity analysis of the bacterial community resident in the camel rumen // *Syst. Appl. Microbiol.* 2015. V. 38. P. 67–76.

Holechek J.L., Vavra M., Pieper R.D. Botanical composition determination of range herbivore diets: a review // *J. Range Manage.* 1982. V. 35. P. 309–315.

He J., Yi L., Hai L. Ming L., Gao W., Ji R. Characterizing the bacterial microbiota in different gastrointestinal tract segments of the Bactrian camel // *Sci. Rep.* 2018. V. 8. Art. 654.

He J., Hai L., Orgoldol K., Yi L., Ming L., Guo F., Li G., Ji R. High-throughput sequencing reveals the gut microbiome of the Bactrian camel in different ages // *Curr. Microbiol.* 2019. V. 76. P. 810–817.

Henderson G., Cox F., Ganesh S., Jonker A., Young W. Global Rumen Census Collaborators & Janssen, P.H. Rumen microbial community composition varies with diet and host, but a core microbiome is found across a wide geographical range // *Sci. Rep.* 2015. V. 5. Art. 14567.

Huo W., Zhu W., Mao S. Impact of subacute ruminal acidosis on the diversity of liquid and 446 solid-associated bacteria in the rumen of goats // *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2014. V. 30. P. 669–680.

Rabee A.E., Forster R., Elekwachi C., Sabra E., Lamera M. Comparative analysis of the metabolically active microbial communities in the rumen of dromedary camels under different feeding systems using total rRNA sequencing // *Peer J.* 2020. V. 8. Art. e10184.

Rognes T., Flouri T., Nichols B., Quince C., Mahé F. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics // *Peer J.* 2016. V. 4. Art. e2584.

Karnachuk O.V., Panova I.A., Panov V.L., Ikkert O.P., Kadnikov V.V., Rusanov I.I., Avakyan M.R., Glukhova L.B., Lukina A.P., Rakitin A.V., Begmatov S, Beletsky A.V., Pimenov N.V., Ravin N.V. Active sulfate-reducing bacterial community in the camel gut // *Microorganisms*. 2023. V. 11. Art. 401.

Liu Y., Zhang G., Yang J., Cheng Y., Ye L., Lai X.H., Yang C., Ma C., Tao Y., Jin D., Lu S., Liu L., Xu J. *Arthrobacter caoxuetaonis* sp. nov., *Arthrobacter zhangbolii* sp. nov. and *Arthrobacter gengyunqii* sp. nov., isolated from Marmota himalayana faeces from Qinghai-Tibet Plateau // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2023. V. 73. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005742>



- Magoc T., Salzberg S.* FLASH: Fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies // *Bioinformatics*. 2011. V. 27. P. 2957–2963.
- Ming L., Yi L., Siriguleng., Hasi S., He J., Hai L., Wang Z., Guo F., Qiao X., Jirimutu.* Comparative analysis of fecal microbial communities in cattle and Bactrian camels // *PLoS One*. 2017. V. 12. Art. e0173062.
- Mohandesan E., Fitak R.R., Corander J., Yadamsuren A., Chuluumbat B., Abdelhadi O., Raziq A., Nagy P., Stalder G., Walzer C.* Mitogenome sequencing in the genus *Camelus* reveals evidence for purifying selection and long-term divergence between wild and domestic Bactrian camels // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. Art. 9970.
- Samsudin A.A., Evans P.N., Wright A.D., Aj Jassim R.* Molecular diversity of the foregut bacteria community in the dromedary camel (*Camelus dromedarius*) // *Environ. Microbiol.* 2011. V. 13. P. 3024–3035.
- Zhang G., Yang J., Jin D., Lai X.H., Lu S., Ren Z., Qin T., Liu L., Pu J., Liu Y., Ye L., Zhou J., Lv X., Tao Y., Xu J.* *Arthrobacter sunyaminii* sp. nov. and *Arthrobacter jiangjiafuii* sp. nov., new members in the genus *Arthrobacter* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2022. V. 72. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005181>

---



---

## SHORT COMMUNICATIONS

---



---

### Fecal Microbiota of Transbaikal Camels (*Camelus bactrianus*) under Different Systems of Grazing Management

**E. V. Lavrentyeva<sup>1, 2, \*</sup>, T. G. Banzaraktsaeva<sup>1</sup>, D. D. Tsyrenova<sup>1</sup>, V. B. Dambaev<sup>1</sup>,  
Sh. A. Begmatov<sup>3</sup>, A. V. Mardanov<sup>3</sup>, and D. D. Barkhutova<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Institute of General and Experimental Biology, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Ulan-Ude, 660047 Russia*

<sup>2</sup>*Buryat State University named after D. Banzarov, Ulan-Ude, 670000 Russia*

<sup>3</sup>*Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

\*e-mail: [lava@mail.ru](mailto:lava@mail.ru)

Received October 16, 2023; revised November 10, 2023; accepted November 10, 2023

**Abstract**—Microbial diversity in the fecal samples of Bactrian camels in Transbaikalia under various grazing management (free grazing (group I), mixed (group II) and stall housing (group III)) was revealed using high-throughput sequencing of the 16S rRNA gene variable regions. The microbial community of the fecal microbiota was found to be diverse and to depend on the camel grazing management. The most common phyla of the camel fecal microbiota were *Bacillota* and *Bacteroidota*. The phylum *Verrucomicrobiota* was a codominant in the fecal microbiota of groups I and II of animals, and *Actinomycetota*, in the feces of camels of group III. Changes in the fecal microbiota structure and taxonomic diversity occurred as camel grazing management and feeding conditions changed. Free grazing resulted in high diversity of the prokaryotic community in the fecal microbiota. In addition, differences in taxonomic composition depending on sex were found, which were in the abundance of taxa rather than in their presence or absence. The results contribute to the current understanding of the fecal microbiota of camels under different management conditions and provide evidence of the influence of nutrition on the fecal microbiota under different management conditions. Our results may be useful for addressing the issues of reproduction and conservation of the Transbaikal camel (*Camelus bactrianus*).

**Keywords:** fecal microbiota, high-throughput sequencing of 16S rRNA gene variable region, Transbaikal camels, *Camelus bactrianus*, cuticular-coprolological method, grazing management

## АКТИВНОСТЬ ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ И ФОСФАТАЗА-АКТИВНЫЕ БАКТЕРИИ В ВОДНОЙ ТОЛЩЕ ОЗ. БАЙКАЛ И ЕГО ОСНОВНЫХ ПРИТОКАХ

© 2024 г. М. Ю. Суслова<sup>а</sup>, \*, Г. В. Подлесная<sup>а</sup>, И. В. Томберг<sup>а</sup>, М. В. Сакирко<sup>а</sup>, О. И. Белых<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Лимнологический институт Сибирского отделения РАН, Иркутск, 664033, Россия

\*e-mail: suslova@lin.irk.ru

Поступила в редакцию 16.10.2023 г.

После доработки 24.10.2023 г.

Принята к публикации 01.11.2023 г.

Фосфор — один из важнейших биогенных элементов, поступление которого способствует процессу эвтрофикации вод озера. Основная часть его запасов в водных экосистемах находится в органической форме. Способность водных микроорганизмов усваивать фосфор из фосфорорганических соединений обусловлена действием щелочных фосфатаз, активность которых дает возможность судить о состоянии экосистемы, нагрузке фосфатами и качестве воды. В настоящей работе исследованы активность щелочной фосфатазы (АЩФ) и численность фосфатаза-активных бактерий (ФАБ) в пелагиали озера Байкал и в приустьевых участках основных притоков. Выявлено, что в пелагической части значения АЩФ и численности ФАБ с глубиной снижаются, что говорит об основных процессах генерации фосфатов в трофическом слое озера. Показано, что в основных притоках озера значение АЩФ и численности ФАБ значительно выше, чем в пелагиали. Полученные данные свидетельствуют о том, что в приустьевых участках рек проходят активные биохимические процессы трансформации органических соединений фосфора. Процессы деструкции обеспечивают регенерацию фосфатов, которые полностью вовлекаются в биологический круговорот, тем самым обеспечивая развитие фитопланктона.

**Ключевые слова:** озеро Байкал, фосфор, активность щелочной фосфатазы, фосфатаза-активные бактерии (ФАБ), фосфатаза продуцирующие бактерии

DOI: 10.31857/S0026365624020235

Круговорот фосфора имеет огромное значение для продуктивности водоемов. Фосфор в водоемах присутствует в виде неорганических и органических соединений. Основная часть запасов его в водной экосистеме находится в органической форме. В воде озера Байкал органический фосфор присутствует в небольших количествах, в среднем от 3.6 до 11 мкг/л (Eletskaia, Tomberg, 2020; Domysheva et al., 2023); в реках его концентрация выше: от 0.143 мг/л в Баргузине (Сороковикова и соавт., 2022) и, в среднем, от 16 до 80 мкг/л в Селенге (Сороковикова и соавт., 2018). Главным источником органического фосфора в водах Байкала является фито- и зоопланктон. Микроорганизмы высвобождают его из отмерших организмов, и он вновь включается в биологический круговорот. Микроорганизмы способны производить целый ряд видоизменений в состоянии отдельных форм фосфора. Микробиальные процессы имеют большое значение в круговороте фосфора, так как ни одна из реакций преобразования фосфат-содержащих веществ не идет самопроизвольно.

Способность водных микроорганизмов усваивать фосфор из фосфорорганических соединений обусловлена действием щелочных фосфатаз, которые катализируют гидролиз эфиров и ангидридов фосфорной кислоты (Хупер, 1977). АЩФ обнаружена как в фитопланктоне, так и в бактериопланктоне (Chrost, Overbeck, 1987; Martinez, Azam, 1993). АЩФ рассматривают как информативный показатель обеспеченности гидробионтов фосфором и минерализации органических веществ (Boavida, Heath, 1988). Так же АЩФ дает возможность судить о состоянии экосистемы, нагрузке фосфатами и качестве воды (Miettinen et al., 1997). Ранее в экосистеме Байкала исследования АЩФ проводили в районе дельты р. Селенги, где было показано, что начиная с июня, развитие фитопланктона обеспечивается регенерацией фосфатов, основная роль в которой принадлежит АЩФ (Максименко и соавт., 2008).

Цель исследования — определить значения активности щелочной фосфатазы и численность

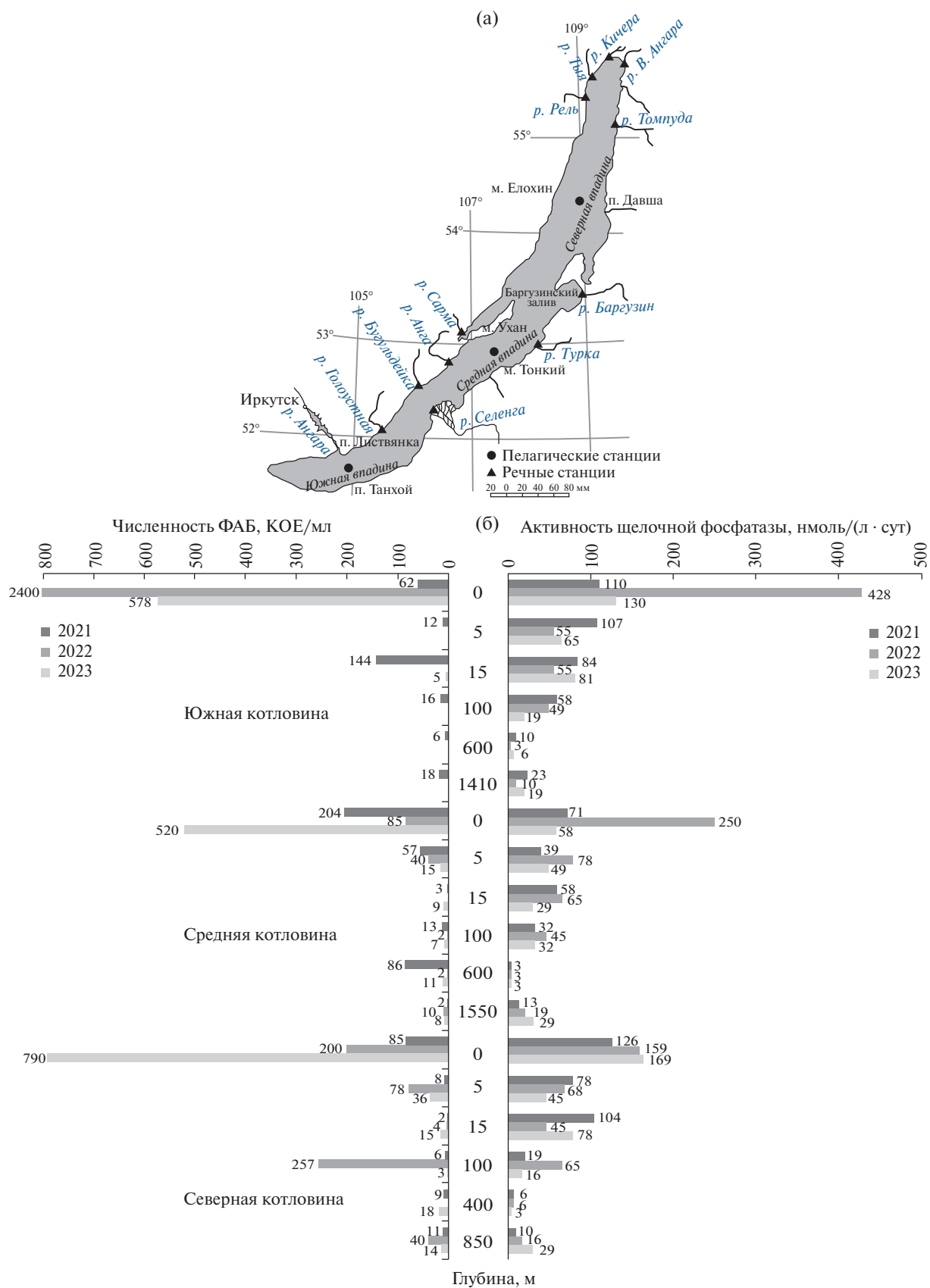


Рис. 1. Карта станций отбора проб (а); Численность ФАБ и АЩФ в водной толще южной, средней и северной котловин оз. Байкал в июне 2021–2023 гг. (б).

фосфатаза-активных бактерий в водах озера Байкал и его основных притоках.

Пробы воды для исследования отбирали в июне 2021–2023 гг. на центральных станциях южной котловины оз. Байкал — Листвянка–Танхой (Л–Т), средней — Ухан–Тонкий (У–Т) и северной — Елохин–Давша (Е–Д) с глубин 0, 5, 15, 100, 400, 600 м, придонного слоя (1400, 1550 и 850 м) и в приустьевых участках рек Голоустная, Селенга, Бугульдейка, Анга, Сарма, Турка, Баргузин, Томпуда, Рель, Тья, Кичера и Верхняя Ангара (рис. 1а).

Активность щелочной фосфатазы определяли с помощью набора Щелочная фосфатаза–Витал В09.02 (АО “Витал Девелопмент Корпорэйшн”, Россия). Пробу в двух повторностях фильтровали через аналитическую трековую мембрану АТМ-0-0-0-25 с диаметром пор 0.2 мкм (ООО “РЕ-АТРЕК-Фильтр”, Россия). Затем один фильтр помещали в стерильный стеклянный сосуд (объемом 13–15 мл) с 1 мл раствора *n*-нитрофенилфосфата, второй хранили в морозильной камере при –18°С. В качестве контроля параллельно подготавливали стерильный стеклянный сосуд с этим же раствором. Стеклянные сосуды экспонировали в течение 1 сут в темноте при 20–22°С, после чего в контрольный помещали фильтр из морозильной камеры. Для остановки реакции добавляли по 10 мл NaOH (20 ммоль/л), оптическую плотность определяли при длине волны 405 нм в кювете 1 см напротив контроля на спектрофотометре ПЭТ 5400ВН. Показатель фосфатазной активности выражали в нмоль/(л сут), рассчитывая по калибровочной кривой.

Численность фосфатаза-активных бактерий определяли на рыбо-пептонном агаре, разбавленном в 10 раз (РПА:10). После прорастания колоний в чашку заливали 10 мл среды с фенолфталеинфосфатом натрия и оставляли на 2–3 ч, — под воздействием фосфатазы реактив расщепляется на свободный фенолфталеин и фосфор. Затем добавляли 0.5 мл раствора аммиака и проводили учет ярко-розовых колоний, т.к. аммиак с освободившимся фенолфталеином дает указанное окрашивание (Родина, 1965).

Исследования показали, что АЩФ в пелагиали озера в среднем составила 60 нмоль/(л сут), в приустьевых участках рек — 1021 нмоль/(л сут), численность ФАБ — 109 и 887 КОЕ/мл, соответственно.

В пелагиали АЩФ колебалась от 3 до 428 нмоль/(л·сут), численность ФАБ от 60 до 2400 КОЕ/мл. Максимальные значения АЩФ и ФАБ выявили в поверхностном слое, которые составляли в среднем 167 нмоль/(л·сут) и 545 КОЕ/мл; на глубинах 5 и 15 м значения составили в среднем 66 нмоль/(л·сут) и 24 КОЕ/мл, а на глубине 100 м — 34 нмоль/(л·сут) и 6 КОЕ/мл. Минимальные значения АЩФ выявлены на глубинах 400, 600 м и в придонных слоях — в среднем 12 нмоль/

(л·сут), а численность ФАБ — 13 КОЕ/мл (рис. 1б). В трофическом слое водной толщи, где наблюдали высокие показатели АЩФ и низкую численность ФАБ, очевидно, фосфатаза-активные цианобактерии и фитопланктон играют основополагающую роль в высвобождении фосфатов из органического фосфора (Belykh, Sorokovikova, 2003; Cabello-Yeves et al., 2022). Также, вероятно, высокие показатели АЩФ в поверхностном слое связаны с тем, что, в отличие от кислой и нейтральной фосфатаз, более чувствительных к интенсивности света, ее активность возрастает в поверхностном, более освещенном, слое воды. Для внеклеточных и кислых фосфатаз характерна обратная зависимость от освещения (Wynne, Bergstein Ben-Dan, 1995).

Высокие значения АЩФ в поверхностном слое наблюдали в 2022 г. в южной и средней котловинах — 428 и 250 нмоль/(л·сут), в то время, когда максимальные значения численности ФАБ детектировали только в южной котловине — 2400 КОЕ/мл (рис. 1б). В сравнении с полученным ранее данными за 2018 и 2019 годы (Suslova et al., 2020), численность ФАБ возросла от 200 и 700 КОЕ/мл до 2400 КОЕ/мл в 2022 г.

Значимую корреляцию между АЩФ и численностью ФАБ детектировали в поверхностных слоях ( $r = 0.8$ ;  $p \leq 0.05$ ).

В притоках значения АЩФ колебались от 182 (р. Голоустная, 2022 г.) до 2517 нмоль/(л·сут) (р. Селенга, 2022 г.), численность ФАБ от 60 (р. Сарма, 2022 г.) до 4800 КОЕ/мл (р. Рель, 2023 г.) (рис. 2).

Стабильно высокие значения наблюдали все три года на р. Кичера, где АЩФ составила 2212, 2374 и 2166 нмоль/(л·сут), соответственно, и стабильно низкие значения в р. Бугульдейка и р. Сарма — в среднем 408 нмоль/(л·сут) (рис. 2). Также выявили значимую корреляционную связь значений АЩФ с содержанием органического фосфора ( $r = 0.8$ ;  $p \leq 0.05$ ), концентрация которого в среднем составила 0.019 мкг/л, с минимальными

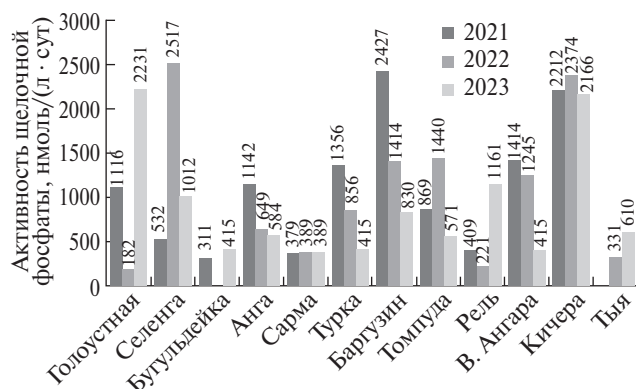


Рис. 2. АЩФ в приустьевых участках основных притоков оз. Байкал в июне 2021–2023 гг.



значениями в р. Сарма (0.004–0.005 мкг/л) и максимальными в р. Баргузин (0.72 мкг/л).

Ранее полученные данные АЩФ в приустьевом участке р. Селенга в июне 2003 г. (Максименко и соавт., 2008) были сопоставимы с нашими результатами в 2021 г. — 580 и 532 нмоль/(л·сут), соответственно, (рис. 2). Подобные исследования проведены в эстуариях рек Олн и Элорн во Франции, где АЩФ варьировала от 50 до 506 нмоль/(л·сут), несмотря на очень ограниченное содержание фосфора (Labry et al., 2016).

В пелагической части значения АЩФ с глубиной понижаются от 167 до 12 нмоль/(л·сут), численность ФАБ — от 545 до 6 КОЕ/мл, соответственно, что говорит об основных процессах генерации фосфатов в трофическом слое озера за счет АЩФ. В основных притоках озера значение АЩФ выше, чем в пелагиали на порядок, а численность ФАБ в 8 раз. Полученные данные свидетельствуют о том, что в приустьевых участках рек проходят активные биохимические процессы трансформации органических соединений фосфора, тем самым обеспечивая доступность фосфора биоте. Притоки озера Байкал играют доминирующую роль в приходной части гидрологического и химического баланса веществ в озере. Исходя из этого, можно утверждать, что в Байкале протекает процесс обогащения озерных вод соединениями фосфора за счет речного стока, что, вероятно, может быть одной из причин последующей эвтрофикации водоема.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках темы госзадания № 0279-2021-0005 (121032300224-8) и № 0279-2021-0015 (121032300269-9).

## 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

Максименко С.Ю., Парфенова В.В., Томберг И.В., Синюкович В.Н., Сороковикова Л.М., Поповская Г.И. Активность щелочной фосфатазы и динамика фосфора в дельте реки Селенга // Биология внутренних вод. 2007. № 4. С. 9–14

Родина А.Г. Методы водной микробиологии. М.: Наука, 1968. 362 с.

Сороковикова Л.М., Синюкович В.Н., Иванов В.Г., Елецкая Е.В., Моложникова Е.В., Башенхаева Н.В., Томберг И.В. Появление биогенных элементов с водами реки Баргузин и их роль в эвтрофировании Баргузинского залива (озеро Байкал) // Метеорология и гидрология. 2022. № 2. С. 75–86.

Sorokovikova L.M., Sinyukovich V.N., Ivanov V.G., Eletskaia E.V., Molozhnikova E.V., Bashenkhaeva N.V., Tomberg I.V. Inflow of biogenic elements with the Barguzin River water and their role in eutrophication of the Barguzin Bay (Lake Baikal) // Russ. Meteorol. Hydrol. 2022. V. 47. P. 123–132.

Сороковикова Л.М., Томберг И.В., Синюкович В.Н., Моложникова Е.В., Елецкая Е.В. Фосфор в воде р. Селенги и его вынос в оз. Байкал в условиях низкой водности // География и природные ресурсы. 2018. Т. 39. № 4. С. 88–94.

Sorokovikova L.M., Tomberg I.V., Sinyukovich V.N., Molozhnikov E.V., Eletskaia E.V. Phosphorus in the Selenga River water and its input to Lake Baikal in conditions of low hydraulicity // Geogr. Nat. Resour. 2018. T. 39. P. 343–348.

Хунер Ф. Происхождение и судьба органических соединений фосфора в водных системах // Фосфор в окружающей среде / Под ред. Федоровой М.М.: Мир, 1977. С. 204–231.

Belykh O.I., Sorokovikova E.G. Autotrophic picoplankton in Lake Baikal: Abundance, dynamics, and distribution // Aquat. Ecosyst. Health. Manage. 2003. V. 6. P. 251–261.

Boavida M., Heath R. Is alkaline phosphatase always important in phosphate regeneration? // Arch. Hydrobiol. 1988. V. 111. P. 507–518.

Cabello-Yeves P.J., Callieri C., Picazo A., Schallenberg L., Huber P., Roda-Garcia J.J., Bartosiewicz M., Belykh O.I., Tikhonova I.V., Torcello-Requena A., De Prado P.M., Puxty R.J., Millard A.D., Camacho A., Rodriguez-Valera F., Scanlan D.J. Elucidating the picocyanobacteria salinity divide through ecogenomics of new freshwater isolates // BMC Biology. 2022. V. 20. P. 1–24.

Chrost R.J., Overbeck J. Kinetics of alkaline phosphatase activity and phosphorus availability for phytoplankton and bacterioplankton in Lake Plubsee (North German eutrophic lake) // Microb. Ecol. 1987. V. 13. P. 229–248.

Domysheva V., Vorobyeva S., Golobokova L., Netsvetaeva O., Onischuk N., Sakirko M., Khuriganova O., Fedotov A. Assessment of the current trophic status of the Southern Baikal littoral zone // Water. 2023. V. 15. Art. 1139.

Eletskaia E.V., Tomberg I.V. The concentration of mineral and total phosphorus in the coastal water of southeast coast of Lake Baikal // Limnol. Freshwater Biol. 2020. № 4. P. 896–898.

Labry C., Delmas D., Youenou A., Quere J., Leynaert A., Fraisse S., Raimonet M., Ragueneau O. High alkaline phosphatase activity in phosphate replete waters: the case of two macrotidal estuaries // Limnol. Oceanogr. 2016. V. 61. P. 1513–1529.

- Martinez J., Azam F.* Periplasmic aminopeptidase and alkaline phosphatase activities in a marine bacterium: implications for substrate processing in the sea // *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 1993. V. 92. P. 89–97.
- Miettinen I.T., Vartiainen T., Martikainen P.J.* Phosphorus and bacterial growth in drinking water // *Appl. Environ. Microbiol.* 1997. V. 63. P. 3242–3245.
- Suslova M.Yu., Sukhanova E.V., Shtykova Yu.R., Podlesnaya G.V., Galachyants A.D., Zimens E.A., Belykh O.I.* Distribution and number of cultured bacteria of the phosphorus cycle in the ecosystem of Lake Baikal // *Limnol. Freshwater Biol.* 2020. № 4. P. 1037–1039.
- Wynne D., Bergstein Ben-Dan T.* The effect of light and phosphate concentrations on phosphatase activities of the photosynthetic bacterium *Chlorobium* spp. // *Can. J. Microbiol.* 1995. V. 41. P. 278–283.

---

---

**SHORT COMMUNICATIONS**

---

---

## Alkaline Phosphatase Activity and Phosphatase-Active Bacteria in Lake Baikal Water Column and Major Tributaries

M. Yu. Suslova<sup>1</sup>, \*, G. V. Podlesnaya<sup>1</sup>, I. V. Tomberg<sup>1</sup>, M. V. Sakirko<sup>1</sup>, and O. I. Belykh<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Limnological Institute, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Irkutsk, 664033 Russia*  
*\*e-mail: suslova@lin.irk.ru*

Received October 16, 2023; revised October 24, 2023; accepted November 1, 2023

**Abstract**—Phosphorus is one of the major biogenic elements. Its inflow facilitates eutrophication of lake water. In aquatic ecosystems, phosphorus is present mostly in organic compounds. Ability of aquatic microorganisms to assimilate phosphorus from organophosphorous compounds results from activity of alkaline phosphatases; activity of these enzymes may be an indicator of the state of the ecosystem, phosphate load, and water quality. In the present work, alkaline phosphatase activity (APA) and abundance of phosphatase-active bacteria (PAB) in Lake Baikal pelagic zone and in the mouths of its major tributaries was studied. In the pelagic zone, APA and PAB abundance decreased with depth, indicating that the main processes of phosphate generation occurred in the trophic layer of the lake. In the main tributaries, both APA and PAB abundance were considerably higher than in the pelagic zone. These results indicate active biochemical processes of transformation of organophosphorous compounds occur in the estuarine zones of the rivers. The degradation processes result in regeneration of phosphates, which are completely incorporated in the biological turnover, providing for phytoplankton development.

**Keywords:** Lake Baikal, phosphorus, alkaline phosphatase activity, phosphatase-active bacteria, phosphatase-producing bacteria

УДК 577.15:579.61

## ДЕСТРУКЦИЯ БИОПЛЕНОК ГРАМПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ И ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ СЕРИНОВОЙ ПРОТЕАЗОЙ РАРС ИЗ *ASPERGILLUS OCHRACEUS*

© 2024 г. Д. Р. Байдамшина<sup>a, \*</sup>, А. Рафия Наср<sup>a</sup>, С. К. Комаревцев<sup>b</sup>, А. А. Осмоловский<sup>c</sup>, К. А. Мирошников<sup>b, c</sup>, А. Р. Каюмов<sup>a</sup>, Е. Ю. Тризна<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, 420008, Россия

<sup>b</sup>Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 117997, Россия

<sup>c</sup>Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, 119234, Россия

\*e-mail: dianabaidamshina@yandex.ru

Поступила в редакцию 14.10.2023 г.

После доработки 27.10.2023 г.

Принята к публикации 01.11.2023 г.

Инфекции, ассоциированные с образованием биопленок грамположительными и грамотрицательными микроорганизмами, характеризуются различными сложностями в терапии и переходом в хронические формы. Поэтому требуется использование подходов, способствующих деструкции матрикса биопленок. В данной работе показано, что рекомбинантная сериновая протеаза РАРС из *Aspergillus ochraceus* при концентрации 50 мкг/мл обеспечивает деструкцию зрелых биопленок целого ряда грамположительных и грамотрицательных бактерий на 15–20%, при концентрации 100 мкг/мл биомасса биопленок *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa* снижается на 50%. Таким образом, протеаза РАРС может служить перспективным агентом для удаления биопленок и повышения эффективности противомикробной терапии.

**Ключевые слова:** протеолитические ферменты, бактериальные биопленки, устойчивость к противомикробным препаратам, разрушение биопленок

DOI: 10.31857/S0026365624020247

Одной из наиболее убедительных гипотез, объясняющих трудности лечения рецидивирующих инфекций, является способность бактерий образовывать в инфицированных тканях биопленки. В зависимости от вида, который формирует биопленку, они могут быть прикрепленными к поверхности или свободноплавающими многоклеточными агрегатами, заключенными во внеклеточный матрикс (Sauer et al., 2022). Структура, химический состав и физиология биопленки также зависят от природы обитающих в ней бактерий и окружающей среды. Однако важной общностью биопленок является зависимость структурной целостности от внеклеточного матрикса, продуцируемого клетками самой биопленки. Внеклеточный матрикс вносит значительный вклад в организацию сообщества и состоит из белков, полисахаридов и нуклеиновых кислот в различном соотношении (Lahiri et al., 2021, Greer et al., 2021).

Формирование биопленок является фактором патогенности и толерантности бактерий к противомикробным препаратам (Usmani et al., 2021),

а также основной причиной инфекций, которые принято называть ассоциированными с образованием биопленок (biofilm-associated infections), таких как зубной кариес, периодонтит, средний отит, муковисцидоз, хронический синусит, хронические раневые инфекции, костно-мышечные инфекции, некротический фасциит, инфекции желчных путей, остеомиелит, бактериальный простатит, эндокардит, инфекции мочевыводящих путей. Внеклеточный матрикс биопленок способствует снижению или полной блокировке проникновения антибиотиков за счет диффузного барьера или способности макромолекул, входящих в состав матрикса, связывать антибиотики. Более того, измененная физиология бактериальных клеток в биопленках и ослабленная иммунная система организма-хозяина могут привести к трудностям в уничтожении биопленок (Melchior et al., 2006).

Использование ферментов для гидролиза матрикса биопленки (Khan et al., 2021), которое обеспечивает лучшее проникновение последующих используемых противомикробных агентов или

разрушает компоненты клеточной стенки патогенов, чтобы вызвать их лизис (Kaplan et al., 2018; Vuotto and Donelli, 2019), давно обсуждается в литературе. Разнообразные ферменты, такие как гликозидгидролазы, протеазы и ДНКазы способны повышать клеточную восприимчивость к противомикробным препаратам (Kaplan, 2010). Применение этих ферментов в комплексе с системными антибиотиками привело к значительным успехам в терапии бактериальных биопленок (Algburi et al., 2017).

Целью работы является оценка потенциала новой субтилизиновой протеазы РАРС из *Aspergillus ochraceus* ВКМ F-4104D для деструкции микробных биопленок.

В работе использовали штаммы *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Micrococcus luteus* (клинический изолят), *Enterococcus faecalis* (клинический изолят), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (клинический изолят). Клинические изоляты предоставлены Казанским научно-исследовательским институтом эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора Российской Федерации.

Культивирование бактерий проводили в питательной среде LB (Sambrook et al., 1989) состава (г/л): триптон — 10, дрожжевой экстракт — 5, NaCl — 5; рН 7.5. Для получения зрелых биопленок использовали питательную среду ВМ (Каутов et al., 2015) состава (г/л): пептон — 0.7, глюкоза — 0.5,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  — 0.2,  $CaCl_2$ —0.005.

РАРС является рекомбинантной фибринолитической протеазой-активатором протеина С плазмы крови из микромицета *Aspergillus ochraceus* ВКМ F-4104D (РАРС). Фермент был экспрессирован в *E. coli* BL21 (DE3), очищен металлохелатной хроматографией на смоле Ni-NTA, лиофилизирован и предоставлен для работы Мирошниковым К.А.

(Институт биоорганической химии РАН, Москва) (Komarevtsev et al., 2021).

Анализ образования биопленок проводили в 24-луночных пластиковых планшетах, как описано в работе (O'Toole, Kolter, 1998) с модификациями (Baidamshina et al., 2017). Бактерии выращивали 2 сут без качания при 37°C на среде ВМ (Basal Medium) в лунках с 1 мл культуры начальной плотностью  $3 \times 10^7$  КОЕ/мл. Через 48 ч культивирования из лунок опытного варианта удаляли культуральную жидкость и вносили среду с добавлением различных концентраций протеазы РАРС, после чего инкубировали в течение 24 ч. Затем из лунок удаляли культуральную жидкость, однократно промывали дистиллированной водой, просушивали при комнатной температуре в течение 20 мин, вносили 500 мкл 1% раствора кристаллического фиолетового ("Sigma-Aldrich", США) в 96% этаноле и инкубировали при комнатной температуре в течение 20 мин с закрытой крышкой. Далее снова промывали дистиллированной водой, добавляли 96% этиловый спирт (500 мкл на лунку) и измеряли поглощение при длине волны 570 нм на микропланшетном ридере Infinite 200 Pro ("Tecan", Швейцария). В качестве контроля использовали чистые лунки, в которых проводились все манипуляции процесса окрашивания без внесения биоматериала.

Количественную оценку белкового компонента внеклеточного матрикса после ферментативной обработки проводили по поглощению Конго красного. Для этого из опытных лунок удаляли культуральную жидкость и вносили LB (Lysogeny broth), содержащий Конго красный ("Sigma-Aldrich", США; 40 мкг/мл). Затем механическим путем разрушали биопленку, как описано ранее (Baidamshina et al., 2017) и инкубировали 90 мин при 37°C, после

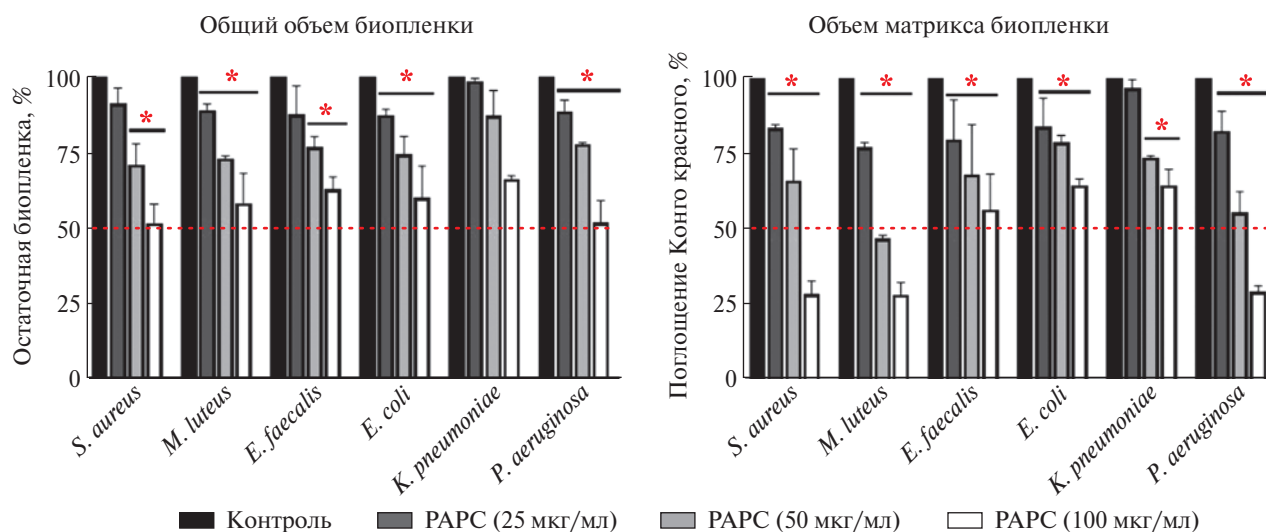


Рис. 1. Оценка разрушения общего объема биопленок и объема матрикса биопленок бактерий протеазой РАРС. Окраска кристаллическим фиолетовым и Конго красным.



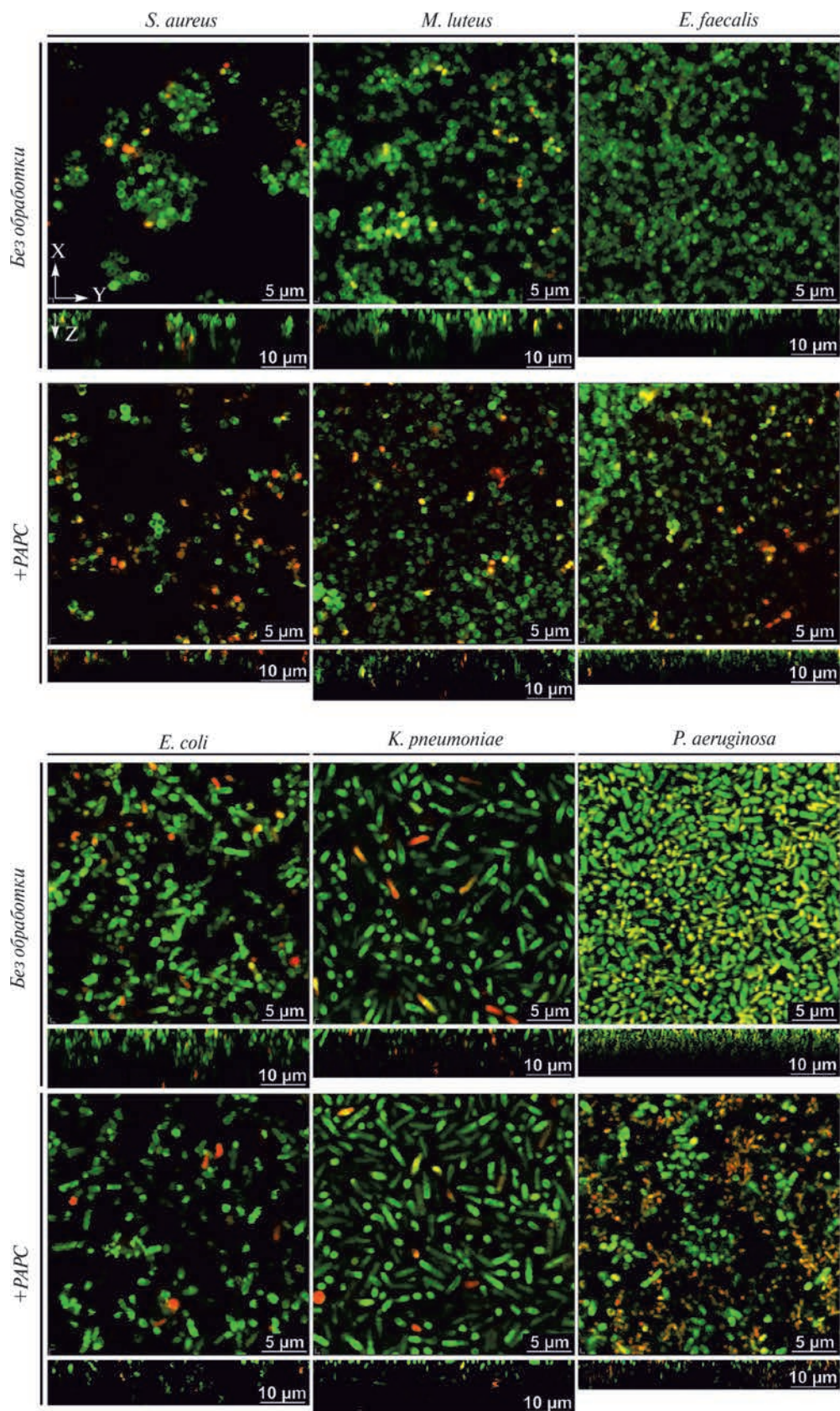


Рис. 2. Влияние PARC (100 мкг/мл) на целостность биопленки и эффективность против клеток *S. aureus*, *M. luteus*, *E. faecalis*, *E. coli*, *K. pneumoniae* и *P. aeruginosa* в составе сформированной биопленки. На микрофотографиях масштабная метка соответствует 5 мкм, на Z-срезах — 10 мкм.

чего центрифугировали планшет 20 мин при 3485 g. Переносили надосадочную жидкость в 96-луночные планшеты и измеряли концентрацию несвязавшегося красителя на микропланшетном ридере Infinite 200 Pro (“Tecan”, Швейцария) при длине волны 490 нм. В качестве контроля использовали исходный раствор красителя, который вносили в лунки, не содержащие биопленок. За показатель биомассы принимали разницу между поглощением в нативных биопленках и обработанных протеиназой РАРС.

Разрушение бактериальных биопленок оценивали с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии. Для этого бактерии выращивали в среде ВМ в 8-луночных адгезивных слайдах (“Ibidi”, Германия) в статических условиях. После 24 ч инкубации добавляли свежий бульон с добавлением фермента с конечной концентрацией 100 мкг/мл. После 24 ч инкубации биопленки окрашивали в течение 15 мин йодидом 3,3'-дигексильноксокарбоцианина (“Sigma-Aldrich”, США) в конечной концентрации 0.02 мкг/мл (зеленая флуоресценция) и пропидия йодидом (“Sigma-Aldrich”, США) в конечной концентрации 3 мкг/мл (красная флуоресценция) для дифференциации живых и нежизнеспособных клеток. Микроскопию выполняли с использованием инвертированного микроскопа Olympus IX83, дополненного платформой сверхширокого разрешения STEDYCON (Германия).

Формировали 48-часовые биопленки *S. aureus*, *M. luteus*, *E. faecalis*, *E. coli*, *K. pneumoniae* и *P. aeruginosa* в 24-луночных планшетах при 37°C на среде ВМ, удаляли культуральную жидкость, вносили свежую среду и протеазу РАРС до конечных концентраций 25, 50, 100 мкг/мл, после чего продолжали инкубирование в течение 24 ч. Затем проводили окрашивание кристаллическим фиолетовым для оценки остаточной биопленки. В концентрации 50 мкг/мл протеаза РАРС разрушала биопленки всех тестируемых штаммов на 15–25%. Наиболее эффективно разрушались биопленки бактерий *S. aureus* и *P. aeruginosa*, при этом остаточная биопленка составила 50% после воздействия 100 мкг/мл РАРС (рис. 1).

Известно, что для существующих коммерческих ферментных препаратов для ранозаживления рекомендована концентрация свыше 1 мг/мл. Ранее было показано, что растительная протеаза Фицин способна гидролизовать биопленки золотистого стафилококка также при концентрации 1 мг/мл (Baidamshina et al., 2017). Таким образом, можно предположить, что более высокая протеолитическая активность исследуемого фермента будет способствовать более быстрому разрушению бактериальных биопленок, а, следовательно, с меньшей вероятностью проводить к побочным эффектам.

Большинство биопленок продуцируют внеклеточный матрикс, включающий белки в амилоидной форме, который способствует поддержанию

стабильности биопленки (Taglialegna et al., 2016). Чтобы проанализировать гидролиз амилоидов матрикса биопленки протеазой РАРС, мы проводили окрашивание нативных и обработанных ферментом биопленок Конго красным. После обработки протеазой РАРС содержание амилоидных компонентов матрикса биопленок всех шести штаммов было ниже, чем в необработанных пробах. Наибольшее снижение содержания амилоидов после обработки протеазой РАРС в концентрации 100 мкг/мл (остаточное содержание менее 30%) наблюдалось в биопленках бактерий *S. aureus*, *M. luteus* и *P. aeruginosa* (рис. 1).

Чтобы подтвердить способность протеазы РАРС разрушать зрелые биопленки грамположительных и грамотрицательных бактерий, проводили конфокальную лазерную сканирующую микроскопию (рис. 2).

На микрофотографиях конфокальной микроскопии по оси Z (z-стеки) видно, что внесение протеазы РАРС приводит к снижению толщины слоя клеток, а значит и к снижению толщины биопленки всех исследуемых бактерий, при этом фермент не влияет на жизнеспособность бактерий в ее составе (Рис. 2). Тем не менее, наибольший эффект наблюдался в отношении биопленок *S. aureus* и *P. aeruginosa*, что подтверждает данные, полученные при окрашивании кристаллическим фиолетовым и Конго красным.

Таким образом, сериновая протеаза РАРС из микромицета *Aspergillus ochraceus* способна частично разрушать зрелые биопленки грамположительных и грамотрицательных бактерий, при этом максимальная концентрация фермента (100 мкг/мл) приводит к снижению общей биомассы биопленок *S. aureus* и *P. aeruginosa* до 50%. Показанные в ходе исследования данные являются теоретической основой для создания комплексных препаратов и принципов лечения для терапии наружных инфекций, ассоциированных с образованием биопленок.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности (проект № FZSM-2022-0017).

## 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

Диана Рафисовна Байдамшина, Елена Юрьевна Тризна, Сергей Константинович Комаревцев, Ая Рафия Наср, Александр Андреевич Осмоловский — экспериментальные процедуры. Константин Анатольевич Мирошников, Айрат Рашитович Каюмов, Елена Юрьевна Тризна — руководство работой; все авторы участвовали в написании и утверждении рукописи.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Algburi A., Comito N., Kashtanov D., Dicks L.M., Chikindas M.L.* Control of biofilm formation: antibiotics and beyond // *Appl. Environ. Microbiol.* 2017. V. 83. Art. e02508-16.
- Baidamshina D.R., Trizna E.Y., Holyavka M.G., Bogachev M.I., Artyukhov V.G., Akhatova F.S., Rozhina E.V., Fakhrullin R.F., Kayumov A.R.* Targeting microbial biofilms using Ficin, a nonspecific plant protease // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. Art. 46068.
- Greer H.M., Overton K., Ferguson M.A., Spain E.M., Darling L.E., Núñez M.E., Volle C.B.* Extracellular polymeric substance protects some cells in an *Escherichia coli* biofilm from the biomechanical consequences of treatment with magainin 2 // *Microorganisms.* 2021. V. 9. Art. 976.
- Kaplan J.B.* Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses // *J. Dental Res.* 2010. V. 89. P. 205–218.
- Kaplan J.B., Mlynek K.D., Hettiarachchi H., Alamneh Y.A., Biggemann L., Zurawski D.V., Black C.C., Bane C.E., Kim R.K., Granick M.S.* Extracellular polymeric substance (EPS)-degrading enzymes reduce staphylococcal surface attachment and biocide resistance on pig skin *in vivo* // *PLoS One.* 2018. V. 13. Art. e0205526.
- Khan J., Tarar S.M., Gul I., Nawaz U., Arshad M.* Challenges of antibiotic resistance biofilms and potential combating strategies: a review // *3 Biotech.* 2021. V. 11. Art. 169.  
<https://doi.org/10.1007/s13205-021-02707-w>
- Khoramian B., Emaneini M., Bolourchi M., Niasari-Naslaji A., Gorganzadeh A., Abani S., Hovareshti P.* Therapeutic effects of a combined antibiotic-enzyme treatment on sub-clinical mastitis in lactating dairy cows // *Vet. Med. (Praha).* 2016. V. 61. P. 237–242.
- Komarevtsev S.K., Evseev P.V., Shneider M.M., Popova E.A., Tupikin A.E., Stepanenko V.N., Kabilov M.R., Shabunin S.V., Osmolovskiy A.A., Miroshnikov K.A.* Gene analysis, cloning, and heterologous expression of protease from a micromycete *Aspergillus ochraceus* capable of activating protein C of blood plasma // *Microorganisms.* 2021. V. 9. Art. 1936.
- Lahiri D., Nag M., Banerjee R., Mukherjee D., Garai S., Sarkar T., Dey A., Sheikh H.I., Pathak S.K., Edinur H.A., Pati S., Ray R.R.* Amylases: biofilm inducer or biofilm inhibitor? // *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2021. V. 11. Art. 660048.
- Melchior M.B., Vaarkamp H., Fink-Gremmels J.* Biofilms: a role in recurrent mastitis infections? // *Veterinary J.* 2006. V. 171. P. 398–407.
- O'Toole G.A., Kolter R.* Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis // *Mol. Microbiol.* 1998. V. 28. P. 449–461.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T.* Molecular cloning: a laboratory manual // Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989. V. 49. № 2. P. 411.
- Sauer K., Stoodley P., Goeres D.M., Hall-Stoodley L., Burmolle M., Stewart P.S., Bjarnsholt T.* The biofilm life cycle: expanding the conceptual model of biofilm formation // *Nature Revs. Microbiol.* 2022. V. 20. P. 608–620.
- Schwartz S.H.* An overview of the Schwartz theory of basic values // *Online readings in Psychology and Culture.* 2012. V. 2. № 1. Art. 11.
- Taglialegna A., Lasa I., Valle J.* Amyloid structures as biofilm matrix scaffolds // *J. Bacteriol.* 2016. V. 198. P. 2579–2588.
- Usmani Y., Ahmed A., Faizi S., Versiani M.A., Shamshad S., Khan S., Simjee S.U.* Antimicrobial and biofilm inhibiting potential of an amide derivative [N-(2', 4'-dinitrophenyl)-3β-hydroxyurs-12-en-28-carbonamide] of ursolic acid by modulating membrane potential and quorum sensing against colistin resistant *Acinetobacter baumannii* // *Microb. Pathog.* 2021. V. 157. Art. 104997.
- Vuotto C., Donelli G.* Novel treatment strategies for biofilm-based infections // *Drugs.* 2019. V. 79. P. 1635–1655.

## Degradation of the Biofilms of Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria by the PAPC Serine protease from *Aspergillus ochraceus*

D. R. Baidamshina<sup>1, \*</sup>, A. Rafia Nasr<sup>1</sup>, S. K. Komarevtsev<sup>2</sup>, A. A. Osmolovskii<sup>3</sup>,  
K. A. Miroshnikov<sup>2, 3</sup>, A. R. Kayumov<sup>1</sup>, and E. Yu. Trizna<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, 420008 Russia

<sup>2</sup>Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117997 Russia

<sup>3</sup>Biological Faculty, Moscow State University, Moscow, 119234 Russia

\*e-mail: dianabaidamshina@yandex.ru

Received October 14, 2023; revised October 27, 2023; accepted November 1, 2023

**Abstract**—Infections associated with biofilm formation by gram-positive and gram-negative microorganisms cause difficulty in therapy and are prone to transition into chronic forms. Approaches to degradation of the biofilm matrix are therefore in demand. In the present work, recombinant recombinant PAPC serine protease from *Aspergillus ochraceus* caused the degradation of mature biofilms formed by a number of gram-positive and gram-negative bacteria by 15–20% at 50 µg/mL. At 100 µg/mL, the biomass of *S. aureus* and *P. aeruginosa* biofilms decreased by 50%. Thus, the PAPC may be a promising agent for biofilm removal and enhance the efficiency of antimicrobial therapy.

**Keywords:** proteolytic enzymes, bacterial biofilms, resistance to antimicrobial agents, biofilm degradation



УДК 577.19+57.042.2+579.22

## РОЛЬ ИОНОВ МЕДИ В ПОВЫШЕНИИ ГРИБОСТОЙКОСТИ СОВРЕМЕННЫХ ПОЛИМЕРНЫХ КОМПОЗИЦИОННЫХ МАТЕРИАЛОВ

© 2024 г. Г. Ю. Яковлева<sup>а, \*</sup>, Е. А. Кацюруба<sup>а</sup>, Е. С. Фуфыгина<sup>а</sup>,  
М. П. Данилаев<sup>б</sup>, О. Н. Ильинская<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, 420008 Россия

<sup>б</sup>Казанский национальный исследовательский Технический университет им. Туполева-КАИ, Казань, 420011 Россия

\*e-mail: yakovleva\_galina@mail.ru

Поступила в редакцию 13.10.2023 г.

После исправления 03.11.2023 г.

Принята к опубликованию 04.11.2023 г.

Устойчивость полимерных композиционных материалов к биоповреждениям является на сегодня одной из актуальных задач. Включение оксида меди в полимерный композит на основе эпоксидной смолы ЭД-20 улучшает его биоцидные свойства. Установлено, что в условиях минерального и органического загрязнения площадь поражения образцов полимерных композитов микромицетами уменьшалась с увеличением концентрации дисперсных частиц  $\text{Cu}_2\text{O}$  в композите. Площадь поражения образцов, наполненных капсулированными полилактидом частицами, была в 1.5 раза меньше, чем у композитов, наполненных некапсулированными частицами.  $\text{Cu}_2\text{O}$  оказывал токсическое действие на доминирующий штамм *Aspergillus niger*, снижая среднюю радиальную скорость роста на агаризованной среде Чапека-Докса и концентрацию биомассы при росте микромицета в жидкой среде по сравнению с вариантом без  $\text{Cu}_2\text{O}$ .

**Ключевые слова:** биодegradация, полимерный композит, капсулированные частицы, оксид меди, *Aspergillus niger*

DOI: 10.31857/S0026365624020254

Использование изделий из полимерных композиционных материалов (ПКМ) в экстремальных условиях повышенной температуры, влажности, наличия солей в атмосфере резко снижает эксплуатационные характеристики композитов (Omazic et al., 2019; Wu et al., 2020). Микроорганизмы-деструкторы вносят значительный вклад в этот процесс за счет разрастания по поверхности материала (механический путь), а также выделения агрессивных метаболитов (диссимиляционный путь) (Gu, 2007; Sanchez-Silva, Rosowsky, 2008). Продуцируемые микроорганизмами органические кислоты могут приводить к изменению структурных и функциональных характеристик материалов (Stroganov et al., 2009; Wei et al., 2018; Yakovleva et al., 2018).

Несмотря на то, что биокоррозия полимерных материалов достаточно хорошо изучена, проблема обеспечения биоцидного эффекта и одновременного повышения прочностных характеристик ПКМ, в частности, эпоксидных и полиэфирных смол, остается открытой. Одним из способов повышения стойкости полимерных композитов является использование токсичных для микроорганизмов дисперсных, в том числе субмикронных

частиц наполнителя (например, частиц серебра, нитрата серебра, оксида меди, хромата ртути и др.) (Terer et al., 2020; Kausar, 2020). Обеспечить адгезию дисперсных частиц к матричному полимеру помогает формирование на их поверхности промежуточной оболочки из биодegradируемых полимеров, что приводит к повышению механических характеристик ПКМ за счет выбора материала и толщины оболочки (Çetkin et al., 2023; Ergün et al., 2022). Снижение подвижности макромолекул матричного полимера повышает модуль упругости, твердость и предел прочности ПКМ (Vogomolova et al., 2017; Akhmadeev et al., 2020). Полилактид, как капсулирующий частицы материал, может не только улучшить механические характеристики ПКМ (Данилаев и соавт., 2023), но и служить источником питания для микроорганизмов. Синтезируемые микроорганизмами ферменты и органические кислоты в результате взаимодействия с материалом оболочки способствуют высвобождению дисперсных частиц оксида меди (I) с образованием токсичных ионов меди (Kadamattil et al., 2018; Naz et al., 2023). Этот процесс происходит локально в местах поражения ПКМ микроорганизмами и приводит к гибели последних.

Целью настоящей работы является сравнительная оценка действия некапсулированных и капсулированных полилактидом частиц оксида меди на грибостойкость полимерных композитных материалов.

В работе использовали образцы полимерного материала (эпоксидный полимер ЭД-20) цилиндрической формы диаметром  $9 \pm 1$  мм и высотой  $50 \pm 2$  мм. В эпоксидный полимер вводили частицы  $\text{Cu}_2\text{O}$  с концентрацией  $0.05 \pm 0.01$ ,  $0.16 \pm 0.02$ ,  $0.33 \pm 0.03$ ,  $0.50 \pm 0.05$ ,  $0.67 \pm 0.07$ ,  $0.83 \pm 0.09$  и  $1.10 \pm 0.10\%$  от массы матричного полимера, как в некапсулированной, так и капсулированной полилактидом формах. В качестве контроля использовали эпоксидный полимер, не содержащий частиц  $\text{Cu}_2\text{O}$ . Образцы выдерживали в течение 6 мес. на микологических стендах на станциях Хоа Лак и Дам Бау (база Российско-Вьетнамского Тропического научно-исследовательского и технологического центров). Оценку грибостойкости образцов проводили в условиях, имитирующих минеральное и органическое загрязнение. Для этого полученные образцы опрыскивали стерильной средой Чапека–Докса следующего состава (г/л):  $\text{NaNO}_3 - 2.0$ ;  $\text{KH}_2\text{PO}_4 - 1.0$ ;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0.5$ ;  $\text{KCl} - 0.5$ ;  $\text{FeSO}_4 - 0.01$ ; сахароза — 30.0; агар-агар — 20.0. Испытание проводили в стерильных контейнерах при температуре  $30^\circ\text{C}$  и относительной влажности воздуха более 90%. Продолжительность испытаний составляла 28 сут с промежуточным регулярным осмотром. Для притока воздуха каждые 7 сут крышку камеры приоткрывали на 3–5 мин. Площадь поражения образцов микромицетами рассчитывали по фотографиям с использованием программы ImageJ версия 1.53 и выражали в процентах от общей площади поверхности образца.

Оценку действия различных концентраций  $\text{Cu}_2\text{O}$  на рост *A. niger*, выделенного с образцов полимерных композитов, проводили как в жидкой, так и в агаризованной среде Чапека–Докса. Оксид меди в некапсулированной и капсулированной полилактидом форме вносили в среды в конечной концентрации 2.0, 5.5 и 9.0 г/л, что соответствовало массовой концентрации 0.16, 0.55 и 0.83%  $\text{Cu}_2\text{O}$  в образцах полимерных композитов. В качестве контроля использовали среду, не содержащую оксид меди. Для оценки роста микромицета на плотную питательную среду в центр чашки Петри вносили по 0.01 мл водной суспензии спор *A. niger* (титр  $10^5 - 10^6$  спор/мл). Инкубирование проводили при температуре  $30^\circ\text{C}$  в течение 14 сут. О росте микромицетов судили по увеличению диаметра колонии, измеренному в восьми взаимно перпендикулярных направлениях. Радиальную скорость роста рассчитывали по формуле:  $k_r = (r_{n+1} - r_n) / (t_{n+1} - t_n)$ , где  $k_r$  — радиальная скорость роста, мм/ч;  $r_n$  — радиус колоний в момент времени  $t_n$ ;  $r_{n+1}$  — радиус колоний в момент времени  $t_{n+1}$ . Среднюю

радиальную скорость роста ( $K_r$ ) рассчитывали как среднее значение величин радиальной скорости роста за все время культивирования. Для оценки роста в жидкой среде *A. niger* в 20 мл среды вносили 0.2 мл водной суспензии спор микромицета (титр  $10^5 - 10^6$  спор/мл) и культивировали 7 сут при  $30^\circ\text{C}$  с принудительной аэрацией на шейкере-инкубаторе BS-3011 при 200 об./мин. Концентрацию биомассы определяли по сырому весу. Математическую обработку данных проводили в стандартной компьютерной программе Excel 7.0.

При оценке влияния  $\text{Cu}_2\text{O}$  на грибостойкость образцов полимерных композитов уже на 3 сут инкубирования отмечали наличие мицелия и конидиеносцев как на поверхности контрольного (без частиц  $\text{Cu}_2\text{O}$ ) образца, так и на образцах с концентрацией  $\text{Cu}_2\text{O}$  0.05 и 0.16%. Площадь обрастания образцов с капсулированными частицами была визуально меньше. По культуральным и морфологическим признакам, выросшие на поверхности образцов микромицеты были отнесены к *A. niger*. На образцах с концентрацией  $\text{Cu}_2\text{O}$  0.05–0.33% на 7 сут инкубирования, вне зависимости от вариантов

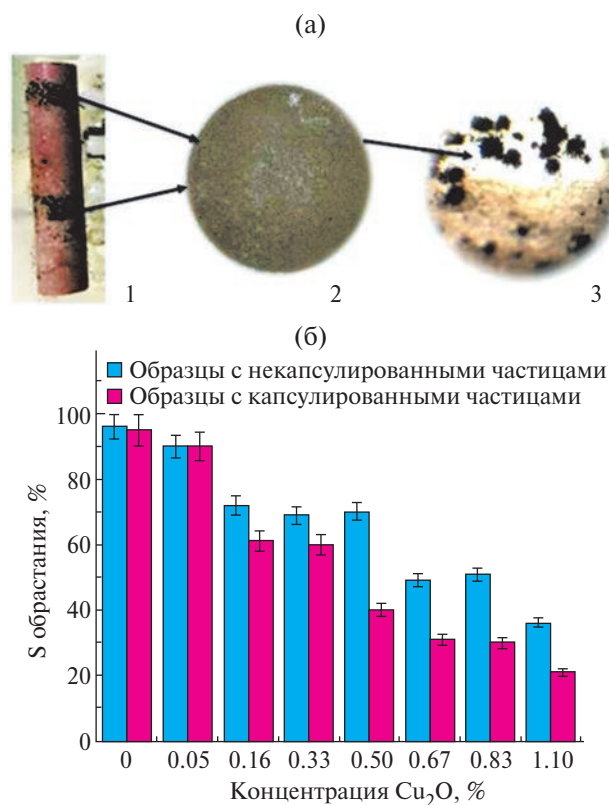


Рис. 1. Влияние некапсулированных и капсулированных частиц  $\text{Cu}_2\text{O}$  на рост микромицетов на поверхности образцов полимерных композитов: а — *A. niger*, выделенный с поверхности композита с некапсулированными частицами в концентрации 1.10% (1 — рост на поверхности композита; 2 — рост на поверхности агаризованной среды Чапека–Докса; 3 — микроскопия,  $\times 64$ ); б — площадь обрастания поверхности на 28 сут инкубирования.

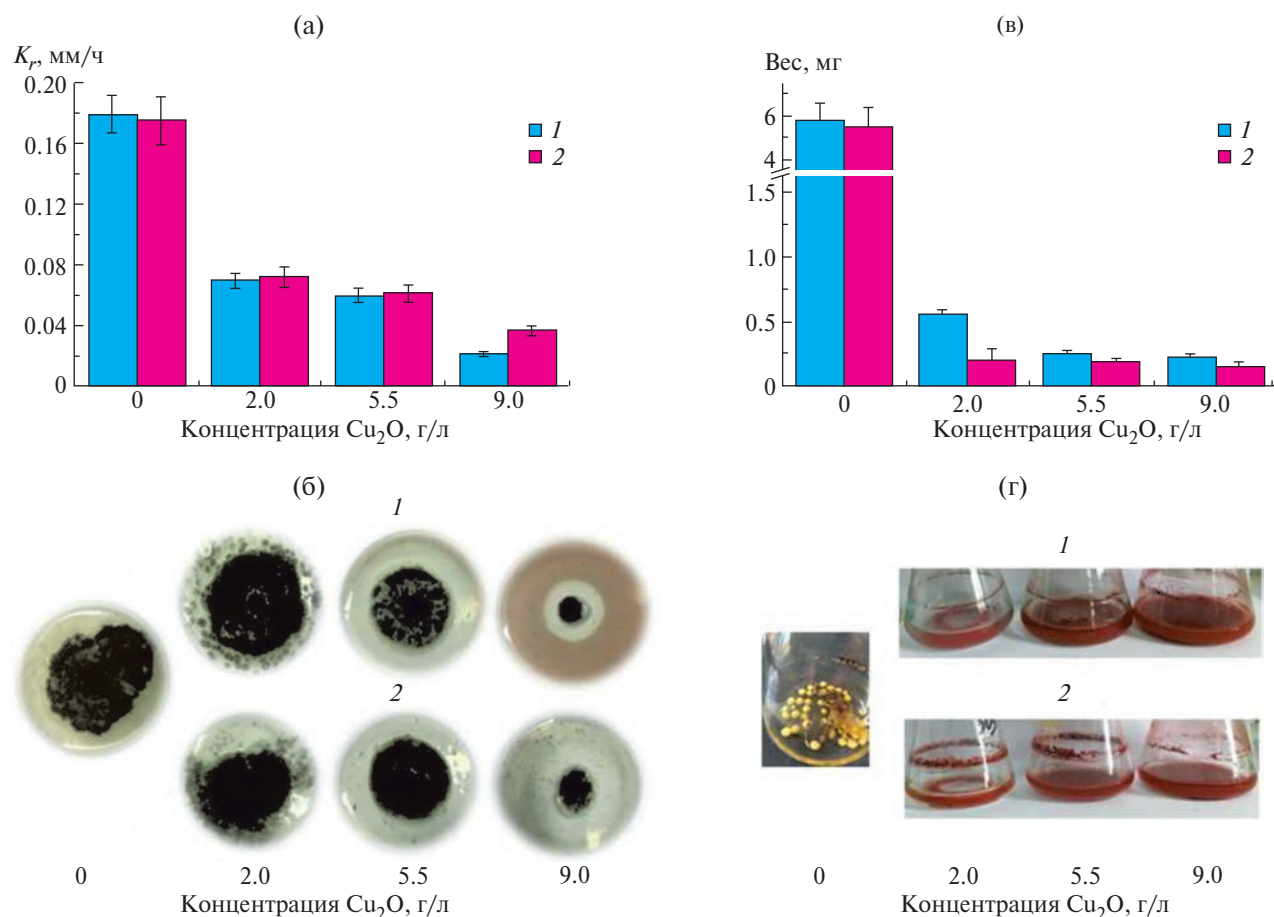
внесения частиц, наряду с *A. niger* был отмечен рост других микромицетов родов *Aspergillus* и *Penicillium*. Однако при дальнейшем инкубировании рост последних был полностью подавлен *A. niger*, что, вероятно, связано с его меньшей чувствительностью к  $\text{Cu}_2\text{O}$  (рис. 1а). На 28 сут инкубирования фиксировали обрастание всех исследуемых образцов. При этом площадь обрастания образцов с концентрацией  $\text{Cu}_2\text{O}$  0.05% как капсулированными полилактидом, так и некапсулированными, достоверно не отличалась от контрольного образца (рис. 1б).

Внесение оксида меди в концентрации 0.16 и 0.33% привело к уменьшению площади обрастания в 1.4 раза для не заключенного в капсулу  $\text{Cu}_2\text{O}$  и в 1.6 раза для капсулированного  $\text{Cu}_2\text{O}$  по сравнению с контрольным вариантом. При концентрации  $\text{Cu}_2\text{O}$  1.10% площадь обрастания образцов с некапсулированным  $\text{Cu}_2\text{O}$  была в 2.8 раза, а с капсулированным  $\text{Cu}_2\text{O}$  – в 4.7 раза меньше контроля. Таким образом, площадь поражения образцов микромицетами уменьшалась с увеличением концентрации дисперсных частиц. При этом для образцов,

наполненных капсулированными частицами, такое уменьшение было более значительным.

Внесение оксида меди не привело к изменению морфологии колоний и не повлияло на процесс спороношения *A. niger*, а лишь замедлило рост микромицета на поверхности питательной среды. Добавление  $\text{Cu}_2\text{O}$  в концентрации 2.0 и 5.5 г/л вне зависимости от формы привело к заметному снижению средней радиальной скорости роста *A. niger*, выделенного с образцов полимерных композиций. Так при концентрации  $\text{Cu}_2\text{O}$  2.0 г/л скорость роста снизилась в среднем в  $2.6 \pm 0.1$  раза, при концентрации 5.5 г/л — в  $2.9 \pm 0.1$  раза по сравнению с вариантом без  $\text{Cu}_2\text{O}$  (рис. 2а).

Оксид в некапсулированной форме в концентрации 9.0 г/л привел к снижению средней скорости роста в  $8.5 \pm 0.1$  раза, в капсулированной — в  $4.8 \pm 0.3$  раза. При росте колоний *A. niger* на среде с добавлением  $\text{Cu}_2\text{O}$  отмечали изменение цвета среды с красноватого на бледно-голубой (рис. 2б), что, вероятно, связано с синтезом органических кислот в процессе роста *A. niger* (Yakovleva et al.,



**Рис. 2.** Токсическое действие некапсулированных (1) и капсулированных (2) частиц  $\text{Cu}_2\text{O}$  в отношении *A. niger*: а — средняя радиальная скорость роста на агаризованной среде Чапека–Докса; б — рост *A. niger* на агаризованной среде Чапека–Докса с различными концентрациями  $\text{Cu}_2\text{O}$ ; в — величина биомассы при росте микромицета в жидкой среде Чапека–Докса; г — рост *A. niger* в жидкой среде Чапека–Докса с различными концентрациями  $\text{Cu}_2\text{O}$ .



2018), под действием которых оксид меди переходит в гидроксид.

Внесение  $\text{Cu}_2\text{O}$  в жидкую среду Чапека–Докса в концентрации 2.0, 5.5 и 9.0 г/л в некапсулированной полилактидом форме привело к уменьшению выхода биомассы *A. niger* в 10, 23 и 25 раз, в капсулированной форме — в 27, 31 и 37 раз, соответственно, по сравнению с контрольным вариантом (рис. 2в). Следует отметить, что при отсутствии оксида меди уже на 5 сут культивирования в среде начинали образовываться стромы, характерные для роста *A. niger* в жидкой среде, и небольшое количество конидиеносцев (рис. 2г). В средах даже с низкими концентрациями  $\text{Cu}_2\text{O}$  ни стромы, ни конидиеносцы не были зафиксированы на протяжении 7 сут культивирования, хотя при концентрации оксида меди 2.0 г/л, особенно при его внесении его в некапсулированной форме, наблюдали незначительное помутнение среды. При культивировании *A. niger* на среде Чапека–Докса без  $\text{Cu}_2\text{O}$  pH среды снизился с 7.0 до 3.0, в то время как внесение оксида меди в концентрации 2.0 г/л снизило pH до 4.5, а более высокие концентрации — до 5.5. Это незначительное снижение pH среды отчасти также свидетельствует об угнетении роста *A. niger*.

Следовательно, частицы  $\text{Cu}_2\text{O}$ , независимо от форм их внесения в питательную среду, оказывают токсическое действие на *A. niger*, проявляющееся в замедлении роста микромицета и, возможно, ингибировании синтеза органических кислот.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена в рамках Программы стратегического академического лидерства КФУ (Приоритет-2030)

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследования проведены при финансовой поддержке РФФИ, грант № 23-29-00160.

## 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

Данилаев М.П., Дробышев С.В. Карандашов С.А., Клабуков М.А., Куклин В.А. Капсулирование дисперсных частиц оксида меди (I) полилактидом //

Конденсированные среды и межфазные границы. 2023. Т. 25. № 1. С. 27–36.

Danilaev M.P., Dorogov N.V., Drobyshev S.V., Karandashov S.A., Klabukov M.A., Kuklin V.A. Dispersed copper (I) oxide particles encapsulated by polylactide // Condensed Matter and Interphases. 2023. V. 25. P. 27–36.

Akhmadeev A.A., Bogoslov E.A., Danilaev M.P., Klabukov M.A., Kuklin V.A. Influence of the thickness of a polymer shell applied to surfaces of submicron filler particles on the properties of polymer compositions // Mech. Compos. Mater. 2020. V. 56. P. 241–248.

Bogomolova O.Yu., Biktagirova I.R., Danilaev M.P., Klabukov M.A., Polsky Yu.E., Pillai S., Tsentssevitsky A.A. Effect of adhesion between submicron filler particles and a polymeric matrix on the structure and mechanical properties of epoxy-resin-based compositions // Mech. Compos. Mater. 2017. V. 53. P. 117–122.

Çetkin E., Demir M.E., Ergün R.K. The effect of different fillers, loads, and sliding distance on adhesive wear in woven e-glass fabric composites // Proc. IME E J. Process Mech. Eng. 2023. V. 237. P. 418–429.

Ergün R.K., Adin H. Investigation of effect of nanoparticle reinforcement woven composite materials on fatigue behaviors // Iran J. Sci. Technol. Trans. Mech. Eng. 2022. V. 47. P. 729–740.

Gu J.-D. Microbial colonization of polymeric materials for space applications and mechanisms of biodeterioration: a review // Int. Biodeterior. Biodegrad. 2007. V. 59. P. 170–179.

Kadammatil A.V., Sajankila S.P., Prabhu S., Rao B.N., Rao B.S.S. Systemic toxicity and teratogenicity of copper oxide nanoparticles and copper sulfate // J. Nanosci. Nanotechnol. 2018. V. 18. P. 2394–2404.

Kausar A. A review of high performance polymer nanocomposites for packaging applications in electronics and food industries // J. Plast. Film Sheeting. 2020. V. 36. P. 94–112.

Naz S., Gul A., Zia M., Javed R. Synthesis, biomedical applications, and toxicity of CuO nanoparticles // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2023. V. 107. P. 1039–1061.

Omazic A., Oreski G., Halwachs M., Eder G.C., Hirschl C., Neumaier L., Pinter G., Erceg M. Relation between degradation of polymeric components in crystalline silicon PV module and climatic conditions: a literature review // Sol. Energy Mater. Sol. Cell. 2019. V. 192. P. 123–133.

Sanchez-Silva M., Rosowsky D.V. Biodeterioration of construction materials: State of the art and future challenges // J. Mater. Civil Engin. 2008. V. 20. P. 352–365.

Stroganov V.F., Kukoleva D.A., Akhmetshin A.S., Stroganov I.V. Biodeterioration of polymers and polymer composite materials // Polym. Sci. Ser. D. 2009. V. 2. P. 164–166.

Teper P., Sotirova A., Mitova V., Oleszko-Torbus N., Utrata-Wesołek A., Koseva N., Kowalczyk A., Mendrek B. Antimicrobial activity of hybrid nanomaterials based on star and linear polymers of N, N'-dimethylaminoethyl



- methacrylate with *in situ* produced silver nanoparticles // Materials. 2020. V. 13. Art. 3037.
- Wei S., Jiang Z., Liu H., Zhou D., Sanchez-Silva M. Microbiologically induced deterioration of concrete: a review // Braz. J. Microbiol. 2013. V. 44. P. 1001–1007.
- Wu D., Zhang D., Liu S., Jin Z., Chowwanonthapunya T., Gao J., Li X. Prediction of polycarbonate degradation in natural atmospheric environment of China based on BP-ANN model with screened environmental factors // Chem. Eng. J. 2020. V. 399. Art. 125878.
- Yakovleva G., Sagadeev E., Stroganov V., Kozlova O., Okunev R., Ilinskaya O. Metabolic activity of micromycetes affecting urban concrete constructions // Sci. World J. 2018. V. 2018. Art. 8360287.

---



---

SHORT COMMUNICATIONS

---



---

## Role of Copper Ions in Resistance of Modern Polymer Composite Materials to Fungal Damage

G. Yu. Yakovleva<sup>1, \*</sup>, E. A. Katsyuruba<sup>1</sup>, E. S. Fufygina<sup>1</sup>, M. P. Danilaev<sup>2</sup>, and O. N. Ilyinskaya<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, 420008 Russia

<sup>2</sup>Tupolev Kazan National Technical Research University, Kazan, 420011 Russia

\*e-mail: yakovleva\_galina@mail.ru

Received October 13, 2023; revised November 3, 2023; accepted November 4, 2023

**Abstract**—Resistance of polymer composite materials to biodamage is one of the pressing problems of our time. Incorporation of Cu<sub>2</sub>O (I) in the composition of a polymer composite based on the ED-20 epoxy resin increases its biocidal properties. Under conditions of mineral and organic contamination, the area of the samples affected by micromycetes was found to decrease with increasing concentration of dispersed particles in the composite. The affected area of the samples filled with the particles encapsulated in polylactide was 1.5 times smaller than that of the composites filled with non-encapsulated particles. Copper oxide had a toxic effect on the *Aspergillus niger* strain dominant on the surface of the samples, causing a decrease in the average radial growth rate on the Czapek-Dox agar medium and in the biomass weight concentration during the growth of micromycetes in a liquid medium compared to the variant without Cu<sub>2</sub>O.

**Keywords:** biodegradation, polymer composite, encapsulated particles, copper oxide, *Aspergillus niger*

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОФЛУОРИМЕТРИИ ДЛЯ ОЦЕНКИ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ МУТАНТОВ ПО ФАКТОРАМ ТЕРМИНАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

© 2024 г. Е. П. Ефремова<sup>a</sup>, О. М. Землянко<sup>a, b</sup>, Г. А. Журавлева<sup>a, b, \*</sup>

<sup>a</sup>Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, 199034, Россия

<sup>b</sup>Лаборатория амилоидов СПбГУ, Санкт-Петербург, 199034, Россия

\*e-mail: g.zhuravleva@spbu.ru

Поступила в редакцию 09.10.2023 г.

После доработки 08.11.2023 г.

Принята к публикации 09.11.2023 г.

Нонсенс-мутации в жизненно важных генах *SUP45* и *SUP35*, кодирующих факторы терминации трансляции, влияют на жизнеспособность клеток *Saccharomyces cerevisiae*. С помощью метода проточной цитофлуориметрии мы показали, что жизнеспособность мутантов по сравнению со штаммами дикого типа снижается в 3.5–4 раза. Кроме того, мы обнаружили повышенную чувствительность мутантных клеток к ультразвуковому воздействию.

**Ключевые слова:** *SUP45*, *SUP35*, нонсенс-мутации, проточная цитофлуориметрия, жизнеспособность, *Saccharomyces cerevisiae*

DOI: 10.31857/S0026365624020268

Процесс терминации трансляции в клетках эукариот обеспечивается совместной работой факторов терминации трансляции eRF1 и eRF3 (Zhuravleva et al., 1995) при участии ряда других белков (Журавлева и соавт., 2022). Белок eRF1 отвечает за распознавание стоп-кодона, а фактор eRF3 является ГТФазой, активирующей работу eRF1. У дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* белки eRF1 и eRF3 кодируются жизненно важными генами *SUP45* и *SUP35*, соответственно (Inge-Vechtomov et al., 2003). Однако ранее удалось получить коллекцию нелетальных нонсенс-мутантов по этим генам (Moskalenko et al., 2003; Chabelskaya et al., 2004). Мутации в генах *SUP45* и *SUP35* не только снижают точность терминации трансляции, но и приводят к плейотропным эффектам. Такие мутанты характеризуются пониженной жизнеспособностью, чувствительностью к повышенной или пониженной температуре, чувствительностью к аминогликозидным антибиотикам и повышенному осмотическому давлению, а также снижением функциональной активности митохондрий, нарушением клеточного цикла и морфологии клеток (Inge-Vechtomov et al., 2003). Несмотря на подробное описание коллекции мутантов, количественная оценка жизнеспособности нонсенс-мутантов *sup45* и *sup35* еще не проводилась. Традиционно методы

оценки жизнеспособности микроорганизмов подразделяются на две группы. К первой группе относятся методы “чашечного подсчета”, основанные на способности клеток расти и размножаться в определенных контролируемых условиях. Одним из наиболее часто используемых методов данной группы является определение количества колониеобразующих единиц (КОЕ) в образце. Однако, несмотря на простоту использования и низкую стоимость, существенными недостатками этих методов являются трудоемкость и длительное время получения результата. Ко второй группе относятся методы микроскопии с использованием колориметрических или флуоресцентных красителей. Выделяют ДНК-связывающие флуоресцентные красители — пропидий йодид (PI) или этидий бромид; а также колориметрические — трипановый синий или эритрозин В. Красители данного класса не способны проникать через неповрежденную мембрану живых клеток и окрашивают только мертвые или поврежденные клетки. Кроме того, есть группа красителей, способных проникать как в живые, так и в мертвые клетки. Механизм действия данных красителей основан на свойствах клеточной мембраны. Живые клетки способны выкачивать краситель в окружающую среду (флуоресцентный краситель — флоксин В) или восстанавливать его до

бесцветного состояния под действием ферментов (колориметрический краситель — метиленовый синий). Таким образом, живые клетки остаются бесцветными, тогда как мертвые — окрашиваются в красный (флоксин В) или синий (метиленовый синий) цвет (Kwolek-Mirek, Zadrag-Tecza, 2014). Однако детекция окрашенных клеток с помощью микроскопии — это трудоемкий и длительный процесс, который заключается в визуальной и, порой, субъективной оценке жизнеспособных и мертвых клеток (Davey, Guyot, 2020; Alexandrov et al., 2021).

Альтернативным подходом для определения жизнеспособности клеток является современный и высокочувствительный метод проточной цитофлуориметрии, который получил широкое распространение, как в клинической диагностике, в промышленности, так и в научных исследованиях (Davey, Guyot, 2020). Данный метод основан на детекции параметров светорассеяния и флуоресценции отдельной клетки, когда она проходит сквозь луч лазера в проточном цитофлуориметре. Современные проточные цитофлуориметры, наряду с огромным разнообразием флуоресцентных красителей и антител, позволяют быстро и с высокой эффективностью анализировать различные характеристики клеток внутри гетерогенной популяции (морфология клеток, количество ДНК, клеточные маркеры, количество жизнеспособных и мертвых клеток). Традиционно для оценки жизнеспособности клеточной популяции суспензию клеток окрашивают ДНК-специфичными флуоресцентными красителями (например, PI) и проводят детекцию на проточном цитофлуориметре.

В настоящем исследовании мы впервые провели количественную оценку жизнеспособности мутантов по генам *SUP45* и *SUP35* по сравнению со штаммами дикого типа с помощью метода проточной цитофлуориметрии.

В работе использовали штаммы дрожжей *S. cerevisiae* U-1A-D1628 (*MAT $\alpha$  ade1-14 trp1-289 his3 lys2 ura3-52 leu2-3,112 SUP45::HIS3MX [pRS315-SUP45]*) (Moskalenko et al., 2003) и U14-D1690 (*MAT $\alpha$  ade1-14 trp1-289 his3 lys2 ura3-52 leu2-3,112 SUP35::HIS3MX [pRSU2-SUP35]*) (Maksiutenko et al., 2021). Оба штамма являются производными штамма 1A-D1628, показано, что штамм U-1A-D1628 содержит транслокации, затрагивающие гены *FLO*, и не способен к инвазивному росту (Varbitoff et al., 2021). Для получения штаммов, несущих мутантные аллели, использовали центромерные плазмиды серии pRS315 с *SUP45* или *sup45-105* (Moskalenko et al., 2003), а также серию плазмид pRSU1, несущих аллель *SUP35* (Volkov et al., 2002) или *sup35-218* (Chabelskaya et al., 2004). Штаммы выращивали при температуре 26°C с использованием стандартных сред (Kaiser et al., 1994). Трансформацию дрожжей проводили согласно методике (Gietz, 1995).

Выделение плазмид проводили с использованием штамма *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (*supE44  $\Delta$ lacU169 ( $\phi$ 80 lacZ $\Delta$ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*) по стандартной методике (Sambrook et al., 1989).

Окрашивание клеток дрожжей PI проводили по следующей методике: штаммы выращивали в жидкой полной (YEPD) среде до OD = 0.2; промывали клетки буфером PBS (“Sigma”, Германия), ресуспендировали в PBS с добавлением PI (“Sigma”, Германия) и РНКазы А (“Merck”, Германия) до конечной концентрации 4 и 10 мкг/мл, соответственно; инкубировали в течение 30 мин при 26°C в темноте при перемешивании; промывали и ресуспендировали в PBS буфере; обработку клеточной суспензии ультразвуком проводили во льду на соникаторе Sonopuls HD2070 (“Bandelin”, Германия) при мощности 40%.

Измерение флуоресценции проводили на проточном цитофлуориметре CytoFlex S (“Beckman Coulter”, США) на канале детекции FL3 (610/20 нм), анализировали по 50 тыс. клеток. Обработку данных выполняли в программе FlowJo10 (“BD Biosciences”, США). Для статистической обработки данных использовали Rstudio (RStudio Team, 2020).

Нонсенс-мутации в генах *SUP45* и *SUP35* приводят к снижению жизнеспособности. Для количественной оценки влияния мутаций на жизнеспособность мы сравнили интенсивность флуоресценции клеток дикого типа с мутантными клетками с помощью проточной цитофлуориметрии. В связи с тем, что используемые нами штаммы характеризуются повышенным уровнем “слипания” клеток, была проведена серия экспериментов с различными режимами соникации для оптимизации условий пробоподготовки. Так, двукратная обработка клеток ультразвуком в течение 10 с позволила получить максимальную популяцию одиночных клеток. В результате экспериментов по подбору оптимальных условий соникации мы выявили повышенную чувствительность мутантных клеток к ультразвуковой обработке по сравнению со штаммами дикого типа. Оказалось, что даже при подобранном нами щадящем режиме обработки ультразвуком, не менее 40% популяции мутантных клеток по параметрам прямого и бокового светорассеяния попадали в область клеточного дебриса, т.е. в область, близкую к нулевым значениям (левая нижняя область на графике прямого и бокового светорассеяния). Одновременно мутантные клетки характеризовались большим количеством дуплетов и кластеров клеток, которые также исключались из анализа. В связи с этим для дальнейшей оценки и статистической обработки данных были взяты только 56–58% одиночных клеток из всех популяций мутантов, в то время как у дикого типа этот показатель составил 81–83% (табл. 1).

**Таблица 1.** Сравнение размера популяций одиночных и PI-позитивных клеток у дикого типа и у мутантов по генам *SUP45* и *SUP35*

Вариант	Популяция одиночных клеток, %	Популяция PI-позитивных клеток, %
<i>SUP45</i> (контроль)	81.37 ± 1.656	5.75 ± 0.597
<i>sup45-105</i>	56.03 ± 3.202	24.41 ± 3.289
<i>SUP35</i> (контроль)	83.86 ± 1.929	6.12 ± 1.019
<i>sup35-218</i>	56.4 ± 2.80	22.17 ± 0.665

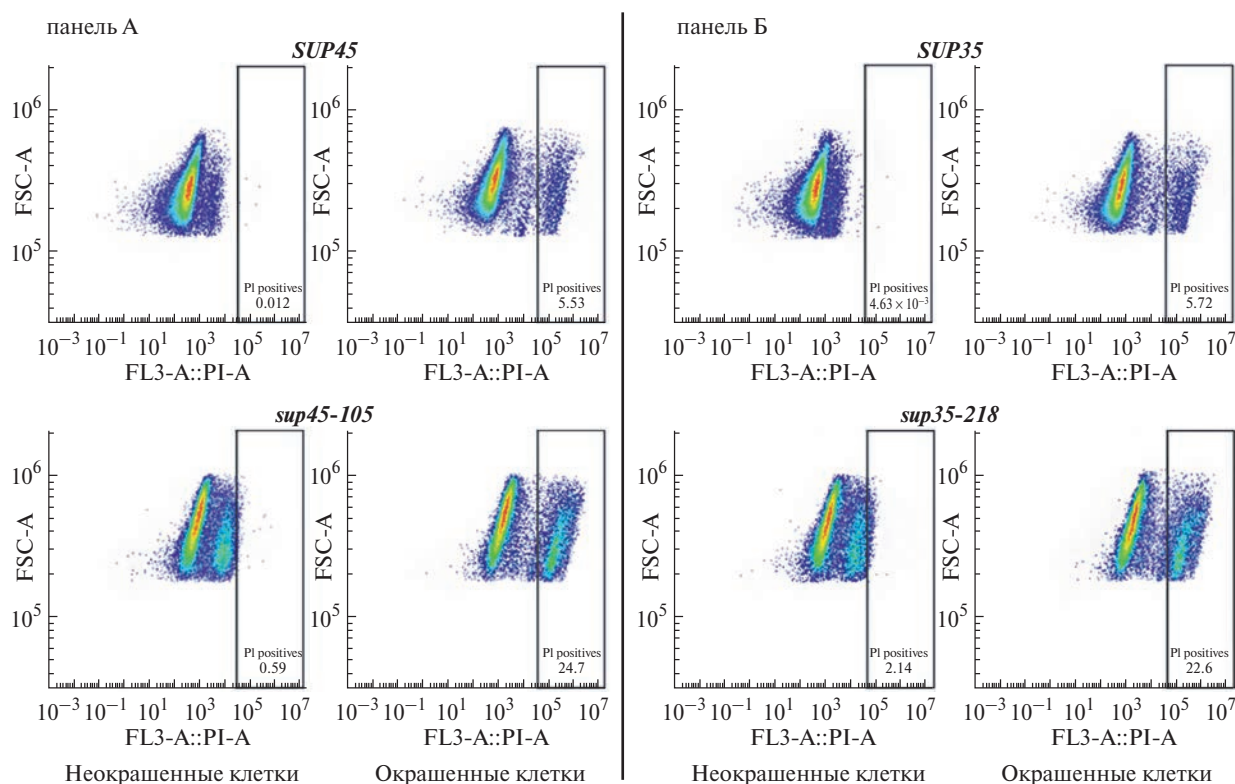
Примечание. Для каждого варианта представлены средние значения со стандартными отклонениями для 6 клонов. Данные соответствуют нормальному распределению (тест Шапиро-Уилка), сравнение средних значений двух независимых выборок проведено с помощью t-критерия Стьюдента; p-уровень значимости указан для доли PI-позитивных клеток: p-value =  $3.514 \times 10^{-6}$  и p-value =  $5.497 \times 10^{-12}$  для *SUP45* и *SUP35*, соответственно.

В результате настоящего исследования мы выявили значимые различия размеров субпопуляций окрашенных, т.е. мертвых, клеток у штаммов дикого типа по сравнению с мутантом *sup45* или *sup35*, соответственно (рис. 1).

На наш взгляд, чувствительность мутантов к воздействию ультразвука дополняет уже описанные многочисленными плеiotропные эффекты

у мутантов *sup45* и *sup35*: чувствительность к повышенной температуре, осмочувствительность, нарушение почкования, изменения цитоскелета и пр. (Valouev et al., 2002; Inge-Vechtomov et al., 2003; Moskalenko et al., 2003; Chabelskaya et al., 2004). Кроме того, описана измененная и специфическая морфология мутантных клеток (Merritt et al., 2010), что также неоднократно наблюдалось и в исследованиях нашей лаборатории. Вероятно, мутации в генах *SUP45* и *SUP35* оказывают влияние на цитоскелет, морфологию клеток и клеточную стенку, что и приводит к чувствительности мутантных клеток к ультразвуковому воздействию.

Таким образом, в настоящем исследовании мы провели количественную оценку жизнеспособности штаммов *S. cerevisiae*, несущих мутации по генам *SUP45* и *SUP35*. Метод проточной цитофлуориметрии позволяет эффективно разделить популяции живых и мертвых клеток дрожжей, а при использовании дополнительных красителей может помочь провести более детальные исследования для выявления различных субпопуляций клеток. Важно заметить, что, несмотря на широкое использование проточной цитофлуориметрии в разных областях, работ по применению данного метода для анализа дрожжей не так много. В ходе



**Рис. 1.** Мутации в генах *SUP45* и *SUP35* приводят к снижению жизнеспособности. Представлены данные проточной цитофлуориметрии (популяции одиночных клеток) для клонов, несущих аллели *SUP45* (панель А) или *SUP35* (панель Б). FSC-A — параметр прямого светорассеяния по площади. FL3-A::PI-A — флуоресцентный канал детекции (610/20 нм), регистрирующий интенсивность флуоресцентного сигнала (в данном случае — пропидий йодида) по площади.



настоящего исследования основная сложность заключалась в оптимизации условий пробоподготовки. На основании полученных нами данных, описанную методику можно адаптировать для работы с другими штаммами дрожжей.

### БЛАГОДАРНОСТИ

Данное исследование было выполнено на базе Ресурсного центра “Молекулярные и клеточные технологии” СПбГУ. Статья посвящается 300-летию СПбГУ.

### ФИНАНСИРОВАНИЕ

Проект выполнен при финансовой поддержке гранта РФФИ № 23-14-00063.

### 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

- Журавлева Г.А., Бондарев С.А., Земляно О.М., Москаленко С.Е.* Роль белков, взаимодействующих с факторами терминации трансляции eRF1 и eRF3, в регуляции трансляции и прионизации // Мол. биология. 2022. Т. 56. С. 206–226.  
<https://doi.org/10.31857/S002689842201013X>
- Alexandrov A., Grosfeld E., Mitkevich O., Bidyuk V., Nostaeva A., Kukhtevich I., Schneider R., et al.* Systematic identification of yeast mutants with increased rates of cell death reveals rapid stochastic necrosis associated with cell division // bioRxiv. 2021.  
<https://doi.org/10.1101/2021.10.20.465133>
- Barbitoff Y., Matveenko A., Matiiv A., Maksiutenko E., Moskalenko S., Drozdova P., Polev D., Beliavskaia A., Danilov L., Predeus A., Zhouravleva G.* Chromosome-level genome assembly and structural variant analysis of two laboratory yeast strains from the Peterhof Genetic Collection lineage // G3: Genes, Genomes, Genetics (Bethesda). 2021. V. 11.  
<https://doi.org/10.1093/g3journal/jkab029>
- Chabelskaya S., Kiktev D., Inge-Vechtomov S., Philippe M., Zhouravleva G.* Nonsense mutations in the essential gene *SUP35* of *Saccharomyces cerevisiae* are non-lethal // Mol. Genet. Genoms. 2004. V. 272. P. 297–307.  
<https://doi.org/10.1007/s00438-004-1053-1>

- Davey H., Guyot S.* Estimation of microbial viability using flow cytometry // Curr. Protoc. Cytom. 2020. V. 93. Art. e72.  
<https://doi.org/10.1002/cpsy.72>
- Gietz R., Schiestl R., Willems A., Woods R.* Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure // Yeast. 1995. V. 11. P. 355–360.  
<https://doi.org/10.1002/yea.320110408>
- Inge-Vechtomov S., Zhouravleva G., Philippe M.* Eukaryotic release factors (eRFs) history // Biol. Cell. 2003. V. 95. P. 195–209.  
[https://doi.org/10.1016/s0248-4900\(03\)00035-2](https://doi.org/10.1016/s0248-4900(03)00035-2)
- Kaiser C., Michaelis S., Mitchell A.* Spring Harbor laboratory course manual. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994. 234 p.
- Kwolek-Mirek M., Zadrag-Tecza R.* Comparison of methods used for assessing the viability and vitality of yeast cells // FEMS Yeast Res. 2014. V. 14. P. 1068–1079.  
<https://doi.org/10.1111/1567-1364.12202>
- Maksiutenko E., Barbitoff Y., Matveenko A., Moskalenko S., Zhouravleva G.* Gene amplification as a mechanism of yeast adaptation to nonsense mutations in release factor genes // Genes (Basel). 2021. V. 12. Art. 2019.  
<https://doi.org/10.3390/genes12122019>
- Merritt G., Naemi W., Mugnier P., Webb H., Tuite M., von der Haar T.* Decoding accuracy in eRF1 mutants and its correlation with pleiotropic quantitative traits in yeast // Nucl. Acids Res. 2010. V. 38. P. 5479–5492.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gkq338>
- Moskalenko S., Chabelskaya S., Philippe M., Inge-Vechtomov S., Zhouravleva G.* Viable nonsense mutants for the essential gene *SUP45* of *Saccharomyces cerevisiae* // BMC Mol. Biol. 2003. V. 4.  
<https://doi.org/10.1186/1471-2199-4-2>
- RStudio Team (2020). RStudio: Integrated Development for R. RStudio, PBC, Boston, MA.  
 URL: <http://www.rstudio.com/>
- Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T.* Molecular cloning: a laboratory manual // 2<sup>nd</sup> edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 1659 p.
- Valouev I., Kushnirov V., Ter-Avanesyan M.* Yeast polypeptide chain release factors eRF1 and eRF3 are involved in cytoskeleton organization and cell cycle regulation // Cell Motil. Cytoskeleton. 2002. V. 52. P. 161–173.  
<https://doi.org/10.1002/cm.10040>
- Volkov K., Aksenova A., Soom M., Osipov K., Svitin A., Kurischko C., Shkundina I., Ter-Avanesyan M., Inge-Vechtomov S., Mironova L.* Novel non-mendelian determinant involved in the control of translation accuracy in *Saccharomyces cerevisiae* // Genetics. 2002. V. 160. P. 25–36.  
<https://doi.org/10.1093/genetics/160.1.25>
- Zhouravleva G., Frolova L., Le Goff X., Le Guellec R., Inge-Vechtomov S., Kisselev L., Philippe M.* Termination of translation in eukaryotes is governed by two interacting polypeptide chain release factors, eRF1 and eRF3 // EMBO J. 1995. V. 14. P. 4065–4072.  
<https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1995.tb00078.x>

## Application of Flow Cytometry for Viability Assessment of Mutants for Translation Termination Factors in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*

E. P. Efremova<sup>1</sup>, O. M. Zemlyanko<sup>1,2</sup>, and G. A. Zhouravleva<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>*St. Petersburg State University, St Petersburg, 199034 Russia*

<sup>2</sup>*Laboratory of Amyloid Biology SPBU, St Petersburg, 199034, Russia*

\**e-mail: g.zhuravleva@spbu.ru*

Received October 9, 2023; revised November 8, 2023; accepted November 9, 2023

**Abstract**—Nonsense mutations in the essential *SUP45* and *SUP35* genes, encoding translation termination factors, affect the viability of *Saccharomyces cerevisiae* cells. Flow cytometry revealed that the viability of mutants was 3.5–4 times lower compared to the wild-type. Moreover, the mutants were found to have higher sensitivity to ultrasonic treatment.

**Keywords:** *SUP45*, *SUP35*, nonsense mutations, flow cytometry, viability, *Saccharomyces cerevisiae*

УДК 579.22+579.61

## ЛЕКАРСТВЕННАЯ УСТОЙЧИВОСТЬ РАЗЛИЧНЫХ ГЕНОТИПОВ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* В ОМСКОЙ ОБЛАСТИ РОССИИ

© 2024 г. А. А. Вязовая<sup>а, \*</sup>, И. В. Костюкова<sup>б</sup>, А. А. Герасимова<sup>а</sup>,  
Д. Р. Терентьева<sup>а</sup>, О. А. Пасечник<sup>с</sup>, И. В. Мокроусов<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера,  
Санкт-Петербург, 197101, Россия

<sup>б</sup>Клинический противотуберкулёзный диспансер, Омск, 644058, Россия

<sup>с</sup>Омский государственный медицинский университет, Омск, 644099, Россия

\*e-mail: elmtree2001@mail.ru

Поступила в редакцию 09.10.2023 г.

После доработки 09.11.2023 г.

Принята к публикации 10.11.2023 г.

Проведено генотипирование 397 штаммов *Mycobacterium tuberculosis*, выделенных от впервые выявленных больных туберкулезом легких в Омской области в 2019–2020 гг. Установлено превалирование штаммов генотипа Beijing (70.8%), в частности, двух кластеров современной сублинии — Central Asian/Russian (46.1%) и B0/W148 (19.1%). Штаммы древней сублинии генотипа Beijing были представлены кластерами 1071-32 и 14717-15, суммарно составляя 4.8%. В сравнении с другими генотипами, штаммы B0/W148-кластера и древней сублинии Beijing чаще характеризовались множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ): 93.4 и 94.7%, соответственно, ( $P < 0.0001$ ). Среди представителей других генетических семейств (LAM, Ural, T, Haarlem) преобладали лекарственно-чувствительные штаммы (75.0%). Циркуляция МЛУ-штаммов Beijing требует молекулярно-эпидемиологического надзора за их возможным более широким распространением.

**Ключевые слова:** *Mycobacterium tuberculosis*, множественная лекарственная устойчивость, генотип Beijing

DOI: 10.31857/S0026365624020275

Сибирский федеральный округ Российской Федерации характеризуется самым высоким уровнем заболеваемости населения туберкулезом (ТБ). В частности, в Омской области показатель общей заболеваемости туберкулезом в 2020 году составил 52.0 (32.4 в РФ) на 100 тыс. населения. Вырос уровень первичного туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя (МЛУ-ТБ) — с 19.2% в 2012 г. до 35.4% в 2020 г. (Kostyukova et al., 2023). Одной из причин роста МЛУ-ТБ является эпидемическое распространение на большинстве территорий России штаммов *Mycobacterium tuberculosis* генетического семейства Beijing, отличающихся ассоциацией с лекарственной устойчивостью в сравнении со штаммами других генотипов (Pasechnik et al., 2018; Zhdanova et al., 2022; Vyazovaya et al., 2023). Первые результаты молекулярно-эпидемиологических исследований в Омской области выявили преобладание штаммов Beijing (Pasechnik et al., 2018).

Целью работы была генетическая характеристика штаммов *M. tuberculosis*, выделенных от больных туберкулезом в Западной Сибири в 2019–2020 годах.

Было изучено 397 штаммов *M. tuberculosis*, выделенных в 2019–2020 гг. от впервые выявленных больных туберкулезом легких, проживающих в Омске и Омской области. Культивирование *M. tuberculosis* и определение лекарственной чувствительности (ЛЧ) изолятов к основным противотуберкулезным препаратам (ПТП) проводили методом абсолютных концентраций и методом пропорций в автоматизированной системе ВАСТЕС MGIT 960 в соответствии с инструкциями производителя. При наличии устойчивости к одному из ПТП штаммы *M. tuberculosis* считали монорезистентными, к двум препаратам — полирезистентными, одновременно устойчивые к рифампицину и изониазиду — с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ), МЛУ и дополнительно устойчивые к фторхинолонам (левофлоксацину и моксифлоксацину) — пре-широкой лекарственной устойчивостью (пре-ШЛУ) (Roelens et al.,

**Таблица 1.** Генотипы и лекарственная устойчивость штаммов *M. tuberculosis*

Лекарственная чувствительность штаммов	Современная сублиния Beijing			Древняя сублиния Beijing		non-Beijing
	B0/W148	Central Asian Russian	Beijing, другие	1071-32	14717-15	
Чувствительные		89	1			87
Моно/полирезистентные	5	27	1	1		15
МЛУ	41	49	1	14	3	11
Пре-ШЛУ	30	18		1		3
Всего	76	183	3	16	3	116

2021). Образцы ДНК выделяли из чистых культур *M. tuberculosis* по протоколу van Embden et al. (1993). Принадлежность штаммов *M. tuberculosis* к генетическому семейству (генотипу) Beijing и его субтипам B0/W148 и Central-Asian/Russian проводили, как описано ранее (Vyazovaya et al., 2023). Дифференциацию генотипа Beijing на современную, древнюю сублинии и кластеры 1071-32 и 14717-15 осуществляли ранее опубликованными методами (Mokrousov et al., 2021, 2023). Установление принадлежности штаммов non-Beijing к определенному сполиготипу, генетическому семейству проводили методом сполиготипирования (Kamerbeek et al., 1997) и согласно международной базе данных SITVIT2 ([http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT\\_ONLINE/](http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT_ONLINE/)). Статистическую обработку данных проводили с использованием ресурса [http://www.medcalc.org/calc/odds\\_ratio.php](http://www.medcalc.org/calc/odds_ratio.php).

В структуре популяции *M. tuberculosis* Омской области в 2019–2020 гг. преобладали штаммы генетического семейства Beijing 70.8% (281/397) и были преимущественно представлены двумя кластерами современной сублинии — B0/W148 (19.1%; 76/397) и Central Asian/Russian (46.1%; 183) (табл. 1).

Полученные результаты свидетельствуют о росте доли генотипа Beijing и его кластера B0/W148 в популяции возбудителя туберкулеза, поскольку, согласно ранее опубликованным в 2015–2016 гг. данным, эти значения составляли 62.3% (129/209) ( $P = 0.024$ ) и 13.4% (28/209) ( $P = 0.076$ ), соответственно (Pasechnik et al., 2018).

Выявлено 19 (4.8%) штаммов древней сублинии Beijing *M. tuberculosis*. При этом 16 из 19 штаммов относились к кластеру 1071–32 древней сублинии Beijing. Сполиготипирование 19 штаммов древней сублинии Beijing выявило два сполиго профиля — SIT1 и SIT269, согласно SITVIT\_WEB. К сполиготипу SIT1 был отнесен 16 штаммов кластера 1071-32, а к SIT269 — три штамма кластера 14717-15 древней ветви Beijing. Это соответствует результатам предыдущего исследования (Mokrousov et al., 2019) и подтверждает эндемичность штаммов 1071-32 в Омской области.

Сопоставление генотипа и фенотипической устойчивости к основным противотуберкулезным препаратам штаммов *M. tuberculosis* показало, что все штаммы кластеров B0/W148 и древней сублинии обладали лекарственной устойчивостью (к изониазиду и/или стрептомицину), а подавляющее большинство (93.4 и 94.7%, соответственно) из них были МЛУ/пре-ШЛУ. Доли МЛУ и пре-ШЛУ штаммов основных кластеров современной сублинии Beijing существенно различались и составили для B0/W148—53.9 и 39.5%, для Central Asian/Russian — 26.8 и 9.8%, соответственно ( $P < 0.0001$ ) (табл. 1).

Штаммы *M. tuberculosis* non-Beijing других генетических семейств (LAM, Ural, T, Haarlem) составили 29.2% и были представлены преимущественно (75.0%) лекарственно-чувствительными штаммами, 13% обладали МЛУ. При этом 7 из 14 МЛУ-штаммов non-Beijing имели сполиго профиль SIT262 и относились к генетическому семейству Ural.

Молекулярно-генетическое исследование популяции *M. tuberculosis* в Омской области выявило нарастание распространения среди ранее не проходивших лечения больных туберкулезом штаммов современной сублинии генотипа Beijing, в частности, кластера B0/W148 — значимо ассоциированного с множественной лекарственной устойчивостью.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РНФ № 19-14-00013.

## 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

- Kostyukova I., Pasechnik O., Mokrousov I.* Epidemiology and drug resistance patterns of *Mycobacterium tuberculosis* in High-Burden Area in Western Siberia, Russia // *Microorganisms*. 2023. V. 11. Art. 425. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11020425>
- Mokrousov I., Vyazovaya A., Pasechnik O., Gerasimova A., Dymova M., Chernyaeva E., Tatarintseva M., Stasenko V.* Early ancient sublineages of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype: unexpected clues from phylogenomics of the pathogen and human history // *Clin. Microbiol. Infect.* 2019. V. 25. Art. 1039.e1–1039.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.11.024>
- Mokrousov I., Vyazovaya A., Shitikov E., Badleeva M., Belopol'skaya O., Bespiatykh D., Gerasimova A., Ioannidis P., Jiao W., Khromova P., Masharsky A., Naizabayeva D., Papaventsis D., Pasechnik O., Perdigão J., Rastogi N., Shen A., Sinkov V., Skiba Y., Solovieva N., Tafaj S., Valcheva V., Kostyukova I., Zhdanova S., Zhuravlev V., Ogarkov O.* Insight into pathogenomics and phylogeography of hypervirulent and highly-lethal *Mycobacterium tuberculosis* strain cluster // *BMC Infect. Dis.* 2023. V. 23. Art. 426. <https://doi.org/10.1186/s12879-023-08413-7>
- Mokrousov I., Vyazovaya A., Sinkov V., Gerasimova A., Ioannidis P., Jiao W., Khromova P., Papaventsis D., Pasechnik O., Perdigão J., Rastogi N., Shen A., Skiba Y., Solovieva N., Suffys P., Tafaj S., Umpeleva T., Vakhrushcheva D., Yarusova I., Zhdanova S., Zhuravlev V., Ogarkov O.* Practical approach to detection and surveillance of emerging highly resistant *Mycobacterium tuberculosis* Beijing 1071-32-cluster // *Sci. Rep.* 2021. V. 11. Art. 21392. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-00890-7>
- Pasechnik O., Vyazovaya A., Vitriv S., Tatarintseva M., Blokh A., Stasenko V., Mokrousov I.* Major genotype families and epidemic clones of *Mycobacterium tuberculosis* in Omsk region, Western Siberia, Russia, marked by a high burden of tuberculosis-HIVcoinfection // *Tuberculosis (Edinb.)*. 2018. V. 108. P. 163–168. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2017.12.003>
- Roelens M., Battista Migliori G., Rozanova L., Estill J., Campbell J.R., Cegielski J.P., Tiberi S., Palmero D., Fox G.J., Guglielmetti L., Sotgiu G., Brust J.C.M., Bang D., Lienhardt C., Lange C., Menzies D., Keiser O., Raviglione M.* Evidence-based definition for extensively drug-resistant tuberculosis // *Am.J. Respir. Crit. Care Med.* 2021. V. 204. P. 713–722. <https://doi.org/10.1164/rccm.202009-3527OC>
- van Embden J., Cave M., Crawford J., Dale J.W., Eisenach K.D., Gicquel B., Hermans P., Martin C., McAdam R., Shinnick T.M.* Strain identification on *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology // *J. Clin. Microbiol.* 1993. V. 31. P. 406–409.
- Vyazovaya A., Gerasimova A., Mudarisova R., Terentieva D., Solovieva N., Zhuravlev V., Mokrousov I.* Genetic diversity and primary drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype strains in Northwestern Russia // *Microorganisms*. 2023. V. 11. Art. 255. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11020255>
- Zhdanova S., Mokrousov I., Orlova E., Sinkov V., Ogarkov O.* Transborder molecular analysis of drug-resistant tuberculosis in Mongolia and Eastern Siberia, Russia // *Transbound. Emerg. Dis.* 2022. V. 69. Art. e1800-e1814. <https://doi.org/10.1111/tbed.14515>

## SHORT COMMUNICATIONS

## Drug Resistance of Different *Mycobacterium tuberculosis* Genotypes in the Omsk Oblast, Russia

A. A. Vyazovaya<sup>1,\*</sup>, I. V. Kostyukova<sup>2</sup>, A. A. Gerasimova<sup>1</sup>, D. R. Terentieva<sup>1</sup>,  
O. A. Pasechnik<sup>3</sup>, and I. V. Mokrousov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, 197101, Russia

<sup>2</sup>Clinical Anti-tuberculosis Dispensary, Omsk, 644058, Russia

<sup>3</sup>Omsk State Medical University, Omsk, 644099, Russia

\*e-mail: [elmtree2001@mail.ru](mailto:elmtree2001@mail.ru)

Received October 9, 2023; revised November 9, 2023; accepted November 10, 2023

**Abstract**—A total of 397 *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from newly diagnosed patients with pulmonary tuberculosis in the Omsk region in 2019–2020 were genotyped. The prevalence of strains of the Beijing genotype (70.8%) was established, in particular of two clusters of the modern sublineage — Central Asian/Russian (46.1%) and B0/W148 (19.1%). Strains of the ancient sublineage of the Beijing genotype were represented by clusters 1071-32 and 14717-15, totaling 4.8%. Compared with other genotypes, B0/W148 cluster and the ancient Beijing sublineage were associated with multidrug resistance (MDR): 93.4% and 94.7%, respectively ( $P < 0.0001$ ). Among representatives of other genetic families (LAM, Ural, T, Haarlem), drug-sensitive strains predominated (75.0%). The circulation of MDR Beijing strains requires molecular epidemiological surveillance in view of their possible wider spread.

**Keywords:** *Mycobacterium tuberculosis*, multi-drug resistance, Beijing genotype