

СОДЕРЖАНИЕ

Том 88, номер 1, 2019

ОБЗОРЫ

Методы количественного анализа единичных клеток микроорганизмов <i>Е. О. Пучков</i>	3
Гексадекан и бактерии-деструкторы: механизмы взаимодействия <i>И. П. Соляникова, Л. А. Головлёва</i>	19

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Использование данных морфологии и молекулярной систематики для идентификации зеленых микроводорослей рода <i>Chlorococcum</i> и некоторых близкородственных таксонов <i>А. Д. Темралева, С. В. Москаленко</i>	32
Филогенетическое происхождение α -глюкозидаз MAL и IMA международной генетической линии <i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288C <i>Г. И. Наумов, А. Н. Боровкова, А. В. Шнырева, Е. С. Наумова</i>	45
Характеристика и особенности C_1 -метаболизма нового грамположительного факультативного метилотрофа <i>Rhodococcus wratislaviensis</i> <i>Е. Н. Капаруллина, Ю. А. Троценко, Н. В. Доронина</i>	53
Влияние конститутивной экспрессии гена <i>gapA1</i> на образование бактериальных биопленок и ростостимулирующую активность ризобий <i>З. Р. Вершинина, Л. Р. Хакимова, А. М. Лавина, Л. Р. Каримова, Э. Р. Сербаяева, В. И. Сафронова, А. И. Шапошников, Ан. Х. Баймиев, Ал. Х. Баймиев</i>	62
Подавление “кворум сенсинга” <i>Chromobacterium violaceum</i> при воздействии комбинаций амикацина с активированным углем или малыми молекулами растительного происхождения (пирогаллолом и кумарином) <i>К. С. Инчагова, Г. К. Дускаев, Д. Г. Дерябин</i>	72
Действие низкочастотного импульсного магнитного поля и низкоинтенсивного лазерного излучения на активность оксидоредуктаз и рост микромицетов – активных деструкторов полимерных материалов <i>И. О. Макаров, Д. А. Ключев, В. Ф. Смирнов, О. Н. Смирнова, Н. А. Аникина, Н. В. Дикарева</i>	83
Защита БХл850 от действия синглетного кислорода в мембранах серной фотосинтезирующей бактерии <i>Allochrocatium vinosum</i> с помощью тушителей <i>З. К. Махнева, А. А. Ашхмин, М. А. Большаков, А. А. Москаленко</i>	91
Сезонные изменения структуры сообщества аноксигенных фототрофных бактерий мезоиктического озера Трехцветное (Кандалакшский залив Белого моря) <i>О. Н. Лунина, А. С. Саввичев, В. В. Бабенко, Д. И. Болдырева, Б. Б. Кузнецов, Т. В. Колганова, Е. Д. Крайнова, Н. М. Кокрятская, Е. Ф. Веслополова, Д. А. Воронов, Н. А. Демиденко, М. А. Летарова, А. В. Летаров, В. М. Горленко</i>	100

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

Новый штамм <i>Ensifer adhaerens</i> M1 способен к трансформации перфторкарбоновых кислот <i>С. П. Четвериков, О. Н. Логинов</i>	116
Влияние триепороидов на липогенез T (–) штамма мицелиального гриба <i>Blakeslea trispora</i> <i>О. А. Дятлова, В. М. Терёшина</i>	120
Сероокисляющие бактерии доминируют в воде затопленной угольной шахты в Кузбассе <i>В. В. Кадников, А. В. Марданов, А. В. Белецкий, Д. В. Анциферов, А. А. Ковалева, О. В. Карначук, Н. В. Равин</i>	123

Contents

Vol. 88, No. 1, 2019

Reviews

- Quantitative Methods for Single-cell Analysis of Microorganisms
E. O. Puchkov 3
- Hexadecane and Hexadecane-Degrading Bacteria: Mechanisms of Interaction
I. P. Solyanikova and L. A. Golovleva 19

Experimental Articles

- Application of Morphological and Molecular Systematics for Identification of Green Microalgae of the Genus *Chlorococcum* and Some Closely Related Taxa
A. D. Temraleeva and S. V. Moslalenko 32
- Phylogenetic Origin of the MAL and IMA α -Glucosidases MAL of the International Genetic Line of *Saccharomyces cerevisiae* S288C
G. I. Naumov, A. N. Borovkova, A. V. Shnyreva, and E. S. Naumova 45
- Characterization of *Rhodococcus wratislaviensis*, a New Gram-Positive Facultative Methylophilic, and Properties of Its C₁ Metabolism
E. N. Kaparullina, Yu. A. Trotsenko, and N. V. Doronina 53
- Effect of Constitutive Expression of the *rapA1* Gene on Formation of Bacterial Biofilms and Growth-Stimulating Activity of Rhizobia
Z. R. Vershinina, L. R. Khakimova, A. M. Lavina, L. R. Karmova, E. R. Serbaeva, V. I. Safronova, A. I. Shaposhnikov, An. Kh. Baimiev, and Al. Kh. Baimiev 62
- Effect of Low-Frequency Pulsed Magnetic Field and of Low-Intensity Laser Radiation on Fungal Growth and Oxidoreductase Activity in Micromycetes Actively Degrading Polymer Materials
I. O. Makarov, L. A. Klyuev, V. F. Smirnov, O. N. Smirnova, N. A. Anikina, and N. V. Dikareva 72
- Quenchers Protect BChl850 from Action of Singlet Oxygen in the Membranes of a Sulfur Photosynthetic Bacterium *Allochromatium vinosum* Strain MSU
Z. K. Makhneva, A. A. Ashikhmin, M. A. Bolshakov, and A. A. Moskalenko 91
- Seasonal Variations in Community Structure of Anoxygenic Phototrophic Bacteria from the Meromictic Lake Trekhtsetnoe (Kandalaksha Bay, White Sea)
O. N. Lunina, A. S. Savvichev, V. V. Babenko, D. I. Boldyreva, B. B. Kuznetsov, T. V. Kolganova, E. D. Krasnova, N. M. Kokryzitskaya, E. F. Veslopolova, D. A. Voronov, N. A. Demidenko, M. A. Letarova, A. V. Letarov, and V. M. Gorlenko 100

Short Communications

- A New *Ensifer adhaerens* Strain M1 is Capable of Transformation of Perfluorocarbonic Acids
S. P. Chetverikov and O. N. Loginov 116
- Effect of Trisporoids on Lipogenesis of the T (-) Strain of a Mycelial Fungus *Blakeslea trispora*
O. A. Danilova and V. M. Tereshina 120
- Sulfur-Oxidizing Bacteria Dominate in the Water from a Flooded Coal Mine Shaft in Kuzbass
V. V. Kadnikov, A. V. Mardanov, A. V. Beletsky, D. V. Antsiferov, A. A. Kovalyova, O. V. Kamachuk, and N. V. Ravin 123

МЕТОДЫ КОЛИЧЕСТВЕННОГО АНАЛИЗА ЕДИНИЧНЫХ КЛЕТОК МИКРООРГАНИЗМОВ

© 2019 г. Е. О. Пучков*

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН, Пущино, 142290, Россия

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

Поступила в редакцию 15.06.2018 г.

После доработки 27.09.2018 г.

Принята к публикации 27.09.2018 г.

Современные представления о жизни микроорганизмов сложились в значительной мере благодаря исследованиям на популяционном уровне. Такой подход был связан с необходимостью преодоления ограничений по чувствительности используемых физико-химических, молекулярно-биологических и генетических методов. При этом потенциальные различия отдельных клеток нивелировались, свойства всех клеток усреднялись, а полученные сведения характеризовали исследуемые микробные популяции в целом. Со временем некоторые аналитические методы были усовершенствованы настолько, что открылась перспектива количественно исследовать многие физико-химические и морфологические свойства отдельных микробных клеток. Это позволило по-новому подойти к решению ряда проблем, к числу которых относятся гетерогенность микробных популяций, природа некультивируемых в лабораторных условиях и персистентных форм, развитие биопленок, взаимодействие микроорганизмов с клетками растений и животных, связь структуры и функции в метаболизме и ряд других. В настоящем обзоре кратко рассмотрены основные методы количественного анализа единичных клеток бактерий и дрожжей на клеточном и субклеточном уровне, а также примеры их применения по сведениям литературы за последние пятнадцать лет.

Ключевые слова: бактерии, дрожжи, морфометрия, биопленки, жизнеспособность, гетерогенность, флуоресцентная микроскопия, фазовоконтрастная микроскопия, микроскопия сверхвысокого разрешения, компьютерный анализ изображений, микрофлуориметрия, флуоресцентные белки, сканирующая зондовая микроскопия, сканирующая электрохимическая микроскопия, сканирующая атомно-силовая микроскопия, микроскопия химических сил, спектроскопия сил единичных клеток, спектроскопия сил единичных молекул, проточная цитометрия, сканирующая цитометрия, нано масс-спектрометрия вторичных ионов, микро-рамановская спектроскопия

DOI: 10.1134/S0026365619010130

Метод держит в руках судьбу исследования.

И.П. Павлов

Живая клетка является основной биологической единицей мира микроорганизмов. Все микроскопические проявления этого мира являются результатом активности отдельных клеток в составе больших популяций, включая взаимодействие между членами сообщества. Размеры микроорганизмов так малы, что изучение природы жизнедеятельности каждой отдельной клетки на молекулярном уровне с помощью физико-химических методов до недавнего времени было невозможно. Основные современные представления о структурно-функциональной организации микробных клеток сформировались главным образом благодаря анализам различных препаратов, содержащих много клеток, с учетом чувствительности традиционных аналитических методов. При таком подходе полученные результаты отра-

жают усредненные свойства всех клеток в популяции. Однако существует ряд проблем, решение которых возможно только путем анализа индивидуальных клеток микроорганизмов. К их числу относятся гетерогенность микробных популяций по генотипическим и фенотипическим признакам, природа некультивируемых в лабораторных условиях и персистентных форм, развитие биопленок, взаимодействие микроорганизмов с клетками растений и животных, связь структуры и функции в метаболизме и ряд других. За последние тридцать лет некоторые аналитические методы были усовершенствованы настолько, что открылась перспектива количественно оценить многие физико-химические и морфологические свойства отдельных микробных клеток. Это позволило подойти к вышеуказанным проблемам на клеточном и субклеточном уровне.

За время, прошедшее после публикации обзоров по этой теме (Shapiro, 2000; Brehm-Stecher, Johnson, 2004), появились модификации ряда подходов, расширилось их применение, были разработаны новые методы. В связи с этим цель настоящего обзора – кратко охарактеризовать основные методы количественного анализа единичных клеток бактерий и дрожжей на клеточном и субклеточном уровне и рассмотреть примеры их применения по материалам работ, выполненных, преимущественно, после 2004 года. Тем не менее, количество публикаций по данной теме даже за этот период настолько велико, что рассмотрение и цитирование их всех не может уложиться в рамки одной статьи. Однако по отдельным вопросам рассматриваемой темы опубликованы специальные обзоры. Они по возможности максимально будут процитированы в соответствующих разделах.

ОПТИЧЕСКАЯ МИКРОСКОПИЯ

Традиционные методы оптической микроскопии являются в основном качественными и субъективными. Во второй половине XX века оптическая микроскопия, благодаря применению лазеров, высокочувствительных детекторов света, цифровой фотографии и компьютерной технике трансформировалась в методологию, обеспечивающую объективные количественные исследования пространственно-временных и физико-химических характеристик объектов в масштабах единичных клеток. Особую роль в формировании этой методологии сыграли компьютерные методы обработки и анализа цифровых изображений. Они позволили не только упростить, ускорить и автоматизировать многие уже имеющиеся количественные методы, но и обеспечили получение ранее недоступной количественной информации. Это спектральные свойства и их пространственное распределение; размер и форма индивидуальных компонентов сложной геометрии, их взаимное расположение; интенсивность и спектральные свойства свечения (например, флуоресценции); динамика процессов в широком интервале времен (Puchkov, 2016a). Проиллюстрируем широкий спектр возможностей этой методологии.

Так, например, на основе компьютерного анализа изображений разработан программный комплекс для характеристики морфотипов бактерий в микробных сообществах по данным фазово-контрастной микроскопии SMEIAS (Center for Microbial Ecology Image Analysis System) (Liu et al., 2001). Этот комплекс позволяет классифицировать клетки по одиннадцати доминирующим морфотипам бактерий. С помощью SMEIAS исследована динамика микробных популяций в анаэробном биореакторе (Liu et al., 2001) и в природных биопленках (Dazzo, Niccum, 2015; Dazzo et al., 2017). Его также успешно применяли для

изучения межклеточной сигнализации в микробных популяциях (Dazzo, 2012) (о межклеточной сигнализации у микроорганизмов см. обзор Пучков, 2016).

Морфометрия с помощью компьютерного анализа данных микроскопии была использована для оценки времени первого деления единичных клеток бактерий *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* и *Pseudomonas aeruginosa*, растущих на плотной среде (Niven et al., 2006). Разработанный подход был автоматизирован, что позволило проводить исследования на популяционном уровне и изучать распределение клеток по длительности лаг-фазы.

Интересные методические возможности открывает оригинальное микропроточное устройство, которое позволяет с помощью микроскопии, сопряженной с компьютерным анализом изображений, исследовать динамику деления отдельных клеток *E. coli* и связь этого процесса с их размерами. С помощью этого устройства был проведен анализ скоростей деления и размеров клеток нескольких сотен поколений, происходящих от одной “материнской” клетки. Было показано, что средняя скорость деления клеток сохраняется на протяжении сотен поколений. Вместе с тем существует “флуктуационная” разница в продолжительности клеточного цикла каждой пары “материнской” и “дочерней” клеток. На основании полученных данных предполагается, что каждая клетка бактерий *E. coli* имеет устойчивый механизм развития (размножения), и утрата жизнеспособности является не результатом “стохастического” старения, а накопления повреждений (Wang et al., 2010a). С использованием такого же устройства, а также мутантного по RecA белку штамма *E. coli* исследована природа пороговой зависимости увеличения средней длины клеток от скорости роста. Установлено, что при увеличении скорости роста выше определенной величины средняя длина клеток возрастает в результате стохастического подавления деления у части популяции, что, по крайней мере, частично может быть связано ограничением поступления RecA в нуклеоид (Gangan, Athale, 2017).

Особой проблемой является “извлечение” морфометрических характеристик индивидуальных бактериальных клеток из больших массивов данных микроскопии, полученных при видеорегистрации развития бактериальных популяций. Для решения этой задачи разработан программный комплекс BaSCA (Bacterial image analysis driven Single Cell Analytics) (Balomenos et al., 2017). По мнению авторов, комплекс может быть использован для решения задач системной биологии на уровне бактериальных популяций.

Два алгоритма компьютерного анализа микроскопических изображений были созданы для морфометрических исследований единичных клеток почкующихся дрожжей. Первый был ис-

пользован в роботизированном методе автоматической дифференциации морфотипов штаммов *Saccharomyces cerevisiae* с делетированными генами (Liu et al., 2011). Было показано, что метод позволяет статистически достоверно различать исследуемые штаммы по морфологическим признакам, в том числе на разных фазах роста. Второй алгоритм был разработан для выявления фазы клеточного цикла путем автоматического “извлечения” из микроскопического изображения геометрических характеристик клеток в целом и почки в частности (Yu et al., 2011).

Благодаря использованию компьютерного анализа изображений произошло значительное усовершенствование флуоресцентной микроскопии. Практически весь обширный набор исследовательских “инструментов”, основанных на явлении флуоресценции (Lakowicz, 2006), теперь стал применим на уровне единичных клеток.

Так, прежде всего, оказалось возможным сделать более объективными и менее трудоемкими некоторые традиционные количественные методы с использованием окраски микроорганизмов флуоресцентными красителями. Один из примеров – компьютерная программа автоматического учета числа активно дышащих бактерий по данным флуоресцентной микроскопии в образцах речной воды (Ogawa et al., 2003). Та же программа в усовершенствованном виде была использована для выявления, идентификации и оценки дыхательной активности бактерий *E. coli* O157:H7 в молоке (Ogawa et al., 2005). Другой пример – автоматический учет доли поврежденных клеток *S. cerevisiae* после двойного витального окрашивания с применением программы ImageJ (National Institutes of Health, США; <http://rsb.info.nih.gov/ij>). В сухих препаратах дрожжей этот показатель коррелировал с жизнеспособностью клеток (Puchkov, 2014). Аналогичный подход с использованием программы ImageJ был разработан для оценки жизнеспособности цианобактерий (Schulze et al., 2011).

Ведутся работы по внедрению информационной технологии глубинного анализа данных (data mining) (Han et al., 2011) для изучения взаимосвязи морфологических признаков окрашенных флуоресцентными красителями клеток дрожжей *S. cerevisiae* с их функциональными свойствами (Ohtani et al., 2004). С этой целью сформирована база морфологических данных *S. cerevisiae* (*S. cerevisiae* Morphological Database, SCMD) (Saito et al., 2004) и создана специальная программа для фенотипирования мутантов дрожжей (Ohya et al., 2005). Глубинный анализ данных позволил, в частности, установить, что делеция почти половины генов у *S. cerevisiae*, не существенных для роста, влияет на некоторые морфологические признаки. Изучается возможность использова-

ния данного подхода при поиске антифунгальных агентов (Gebre et al., 2015), а также для работы с дрожжами *Schizosaccharomyces* (Negishi et al., 2009).

Компьютерный анализ изображений позволяет измерять параметры флуоресценции на субклеточном уровне. Для сравнительно крупных объектов, таких как дрожжи, это можно осуществлять с помощью стандартной эпифлуоресцентной микроскопии широкого поля (Puchkov, 2016) или конфокальной микроскопии (Day et al., 2016). Так, с помощью субклеточной микрофлуориметрии была определена вязкость внутри вакуолей *S. cerevisiae* (подробнее о внутриклеточной вязкости см. обзор Пучков, 2014) и разработан подход, получивший название “псевдоспектральный анализ”, для изучения на примере доксорубина и клеток *S. cerevisiae* в качестве модели внутриклеточной локализации противораковых препаратов в клетках животных и человека (Puchkov, 2016).

Применение технологии мечения флуоресцирующими белками (ФБ), которые являются производными в аналогах зеленого флуоресцирующего белка (Tsien, 1998), привело к значительному прогрессу в изучении внутриклеточной структуры и функций живых клеток, включая микробные (Snapp, 2005).

В исследованиях, связанных с локализацией определенных белков, меченных ФБ, у разных штаммов или у одних и тех же штаммов дрожжей при разных условиях культивирования необходима автоматизация количественного сравнения больших массивов данных. С этой целью разработана специальная программа компьютерного анализа изображений (Chen et al., 2007). В качестве одного из перспективных подходов сопряжения протеомного анализа с локализацией белков в клетках создана коллекция дрожжей с белками, меченными ФБ (Chong et al., 2012). Для изучения гетерогенности бактериальных популяций по проявлению признаков у генетически сконструированных штаммов в рамках программы по синтетической биологии разработан протокол MUSIQ (Microscope fLUorescence SIngle cell Quantification), также основанный на технологии мечения ФБ и компьютерного анализа изображений (Cortesi et al., 2017).

Особый интерес представляет изучение динамики распределения белков в интактных (не фиксированных) препаратах дрожжей. Например, исследована локализация и перемещение трех меченных ФБ белков Lac репрессора (LacR), встроенного в кластер генов белка Chr1, белка Cut11 ядерной мембраны и компонента Sid4 веретена в делящихся дрожжах *Schizosaccharomyces pombe* (Bjergling et al., 2012). Методические аспекты изучения единичных интактных делящихся дрожжей с ис-

пользованием ФБ и флуоресцентной микроскопии обобщены в обзоре (Mulvihill, 2017).

Сравнительно недавно были разработаны методы флуоресцентной микроскопии сверхвысокого разрешения (“наноскопии”), которые позволяют исследовать внутриклеточные структуры с размерами порядка 0.02–0.04 мкм и даже отслеживать локализацию и движение отдельных макромолекул. В основе этих методов лежит использование химерных белков, меченных ФБ (Yao, Carballido-López, 2014). Развиваются и альтернативные методы введения флуоресцентных меток во внутриклеточные белки для “наноскопии” (Minoshima, Kikuchi, 2017).

Существует два основных подхода микроскопии сверхвысокого разрешения (Gahlmann, Moerner, 2014). Первый позволяет следить за перемещениями флуоресцирующей молекулы белка, который экспрессирован или активирован в очень низкой концентрации – одна или две молекулы на клетку. Во втором регистрируют серию изображений флуоресценции молекул одного и того же белка, меченных разными флуорофорами, свечение которых может “включаться” или “выключаться” специальными световыми импульсами. Компьютерная обработка изображений, наложенных друг на друга, позволяет выявить положение в клетке расположенных рядом флуоресцирующих белков, расстояние между которыми 0.02–0.04 мкм.

С помощью этой методологии получено много фундаментальных сведений о цитоскелете бактерий и организации нуклеоида (Yao, Carballido-López, 2014), о динамике транскрипции (Strauss, Kapranidis, 2017) и трансляции (Gahlmann, Moerner, 2014), о динамике белков, взаимодействующих с ДНК (Urphoff, 2016), об организации секреторных систем и внутриклеточной компарментализации (Schneider, Basler, 2016). Имеются примеры использования микроскопии сверхвысокого разрешения для изучения механизмов действия противобактериальных препаратов (Choi et al., 2016).

СКАНИРУЮЩАЯ ЗОНДОВАЯ МИКРОСКОПИЯ

Существует четыре основных вида сканирующей зондовой микроскопии: сканирующая туннельная микроскопия (СТМ), сканирующая электрохимическая микроскопия (СЭХМ), сканирующая магнитно-силовая микроскопия (СМСМ) и сканирующая атомно-силовая микроскопия (САСМ). Все они основаны на регистрации взаимодействия миниатюрного механического зонда (кантилевера) с поверхностью исследуемого объекта при ее сканировании. Причем размеры зонда настолько малы, что позволяют характеризовать физическо-химические свойства поверхности (получать “физико-химические изображе-

ния”) с разрешением вплоть до размеров атомов. СТМ основана на измерении так называемого туннельного тока, возникающего между поверхностью образца и зондом. При СЭХМ осуществляется регистрация электрохимических процессов между зондом и изучаемой поверхностью. Взаимодействие атомов зонда и исследуемого образца за счет магнитных полей или сил Ван-дер-Ваальса лежит в основе СМСМ и САСМ соответственно (Bhushan, Marti, 2011).

Сведений о применении СТМ и СМСМ для изучения единичных клеток микроорганизмов в литературе не обнаружено. Есть данные об использовании СЭХМ для изучения биохимических процессов на поверхности биопленок ряда бактерий (подробнее о принципах и методических возможностях СЭХМ при изучении биопленок см. обзор Zoski, 2016). Так, в частности, с помощью СЭХМ проводились измерения содержания перекиси водорода на поверхности биопленок *Vibrio fischeri* (Abucayon et al., 2014) и *Streptococcus gordonii* в комбинации с *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Lyu et al., 2011). В первом случае показано, что каталазная активность двух штаммов *V. fischeri*, свободноживущего и живущего в симбиозе с клетками кальмара, примерно одинакова. Во втором случае благодаря анализу “химического изображения” содержания перекиси водорода на поверхности биопленки удалось установить, что на поверхности клеток *S. gordonii* генерируется перекись водорода, которая разлагается каталазой *A. actinomycetemcomitans*.

При исследовании межклеточной сигнализации в биопленках *P. aeruginosa* с помощью СЭХМ было охарактеризовано распределение редокс-активных сигнальных молекул пиоцианина в 3D пространстве над поверхностью биопленки *P. aeruginosa*. При этом была показана возможность получать “химическое изображение” редокс-активности исследуемой биопленки в 2D пространстве (Koley et al., 2011). Еще в одном исследовании, связанном с межклеточной сигнализацией, с использованием СЭХМ пиоцианина изучали реакции quorum sensing (QS) в 3D пространстве внутри и между искусственно созданными агрегатами клеток *P. aeruginosa*. Благодаря этому подходу была выявлена зависимость реакций QS от размеров агрегатов (Connella et al., 2014).

Использование АСМ в изучении микроорганизмов началось сравнительно давно, и эта область исследований обобщена в многочисленных обзорах. Поэтому имеющиеся сведения мы суммируем главным образом со ссылками на основные из них.

Первоначально АСМ использовали для получения изображений структуры поверхности нативных микробных клеток с разрешением, сопоставимым со сканирующей электронной микроскопией

(СЭМ). Осуществлялось это в водной среде, что выгодно отличало АСМ от СЭМ, которая проводится на сухих или замороженных препаратах в вакууме (Dorobantu et al., 2012). Показано применение АСМ для получения изображений структуры полисахаридов, пептидогликана, тейхоевых кислот, пилей, жгутиков и многих других компонентов поверхностей различных микробных клеток в физиологических условиях (Dufrière, 2014).

Разрешающая способность АСМ позволяет изучать структурную организацию единичных белковых молекул в надмолекулярных комплексах. Одним из примеров реализации этой уникальной возможности АСМ является характеристика пространственной самоорганизации молекул белков оболочки бактериальных микрокомпарментов *Haliangium ochraceum* (Sutter et al., 2016) (о микрокомпартаментах бактерий см. обзор Vobik et al., 2015). АСМ высокого разрешения может быть использована и для регистрации динамики формирования надмолекулярных комплексов белков. Так, с помощью специальной методики скоростной АСМ изучены структурные особенности сборки и активации MotPS статорного компонента Na⁺-типа жгутикового мотора *Bacillus subtilis* (Terahara et al., 2017).

АСМ позволяет проводить количественный анализ сил взаимодействия различных молекулярных структур, находящихся на поверхности микробных клеток, между собой и с окружающей средой. Для этого проводится модификация (функционализация) кантелевера различными химическими группировками (например, аминогруппой или карбоксильной группой), небольшими шариками (например, стеклянными или латексными) или даже целыми клетками бактерий (Lower, 2011). Поэтому на сегодняшний день можно говорить о АСМ не как о методе, а о совокупности методов: микроскопии химических сил (МХС), спектроскопии сил единичных клеток (ССЕК) и спектроскопии сил единичных молекул (ССЕМ). Они позволяют характеризовать пространственную организацию химических групп и зарядов на поверхности микробных клеток (получать “химическое изображение”), а также и измерять силы взаимодействия микроорганизмов между собой, с различными лигандами и абиогенными поверхностями (Dorobantu et al., 2012; Oit et al., 2017).

Основанные на АСМ подходы оказались наиболее востребованными при изучении микробных биопленок (Angeloni et al., 2016). Например, одна из методик АСМ позволяет исследовать деление единичных клеток бактерий *E. coli* при росте на плоской поверхности (Van Der Hofstadt et al., 2015). Получение многопараметрических АСМ изображений с использованием ССЕМ и ССЕК успешно применяли для изучения молекулярных механизмов адгезии клеток бактерий при формировании

биопленок на минеральных микрочастицах почвы (Huang et al., 2015), инструментах медицинского назначения (Herman-Bausier et al., 2017) и биотехнологическом оборудовании (James et al., 2017).

ЦИТОМЕТРИЯ

Цитометрия объединяет три основных подхода для анализа единичных клеток: проточную цитометрию (ПЦ), проточную цитометрию с визуализацией (ПЦВ (imaging flow cytometry)) и сканирующую цитометрию (СЦ).

ПЦ основана на измерении оптических параметров отдельных клеток в потоке жидкости. Для этого суспензию клеток пропускают через узкий капилляр таким образом, что в потоке его центральной части единичные клетки движутся одна за другой. Поток единичных клеток проходит через оптический участок, где освещается сфокусированным пучком света. При этом в зависимости от поставленной задачи регистрируется возникающее на клетках светорассеяние под разными углами и флуоресценция, если клетки предварительно были обработаны определенными флуорохромами. ПЦ используется в микробиологии сравнительно давно и является едва ли не самым популярным методом анализа отдельных клеток в микробных популяциях. Этому способствует наличие коммерчески доступных приборов, возможность быстро анализировать большие популяции, а также широкий спектр флуорохромов, позволяющих характеризовать различные свойства клеток. Типичные коммерчески доступные приборы позволяют анализировать микробные суспензии со скоростью до 1000 клеток в секунду по 5–10 оптическим параметрам, а специализированные – до 50000 клеток в секунду и до 20 параметров одновременно. Мы не будем останавливаться на подробностях использования ПЦ в микробиологии, поскольку они достаточно полно освещены в ряде исчерпывающих обзоров, посвященных, в частности, количественному анализу гетерогенности микробных популяций (Avery, 2006; Wilkinson, 2015), оценке жизнеспособности микроорганизмов (Juzwa et al., 2016; Emerson et al., 2017), характеристике различных физиологических реакций у бактерий (Ambriz-Aviña et al., 2014), а также исследованию экологии микроорганизмов (Czechowska et al., 2008; Wang et al., 2010; Emerson et al., 2017).

На основе ПЦ разработан препаративный метод избирательного выделения клеток с определенными свойствами, основанный на измерении их флуоресценции, FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting). Этот подход широко применяется в исследовании клеток человека и животных (Herzenberg et al., 2002). Есть примеры использования FACS в микробиологии (подробнее о других препаративных методах получения единичных кле-

ток микроорганизмов см. обзор Ishii et al., 2010). Так, например, с помощью FACS отсортировали клетки бактерий с низким содержанием нуклеиновых кислот из трех пресноводных источников. Были получены три культуры ранее неизвестных бактерий, принадлежащих к группе грамотрицательных бактерий рода *Polynucleobacter* по результатам анализа генов 16S РНК (Wang et al., 2009). Другой пример – метод, позволяющий проводить выделение бактерий из природных образцов с использованием одновременно технологии флуоресцентной гибридизации *in situ*, FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) и FACS. На примере смеси бактерий *E. coli* с ДНК фага λ показана применимость этого метода для выделения целевых бактерий в условиях загрязнения посторонним генетическим материалом (Chen et al., 2011).

ПЦВ сочетает в себе возможности ПЦ и флуоресцентной микроскопии с одновременным измерением интегральных оптических параметров клеток в потоке и получением их цифровых флуоресцентных изображений. Это дает возможность характеризовать каждую клетку в целом по ее светорассеянию и флуоресценции, а также анализировать ее морфологию и/или пространственное распределение тех или иных оптических показателей в структуре клеток (Barteneva et al., 2012). Важно, что метод позволяет быстро количественно анализировать большие популяции клеток по множеству параметров, благодаря специальным алгоритмам компьютерного анализа (Hennig et al., 2017). Первоначально, как и ПЦ, этот подход был разработан для исследования единичных клеток человека и животных (Barteneva et al., 2012), которые существенно больше по размерам, чем клетки микроорганизмов. Это связано с небольшим разрешением получаемых изображений по сравнению с обычной микроскопией. С появлением коммерчески доступных приборов метод нашел широкое применение в биомедицинских исследованиях, в том числе при изучении взаимодействия микроорганизмов с клетками макроорганизма. Так, в частности, с помощью ПЦВ разработаны подходы для изучения фагоцитоза и интернализации бактерий *Salmonella enterica* в макрофаги клеточной линии RAW 264.7 (Phanse et al., 2012), *Yersinia enterocolitica* в мононуклеарные фагоциты (Drechsler-Nake et al., 2016), *Neisseria gonorrhoeae* в нейтрофилы (Smirnov et al., 2017), *Toxoplasma gondii* и *Mycobacterium tuberculosis* в различные клеточные линии (Haridas et al., 2017). С использованием ПЦВ выявлены морфологические изменения дрожжевой формы криптококков, связанные с приобретением факторов патогенности, в мононуклеарных лимфоцитах (Okazaki et al., 2010), проведена идентификация, классификация и изучены стадии развития простейших *Plasmodium falciparum* в крови (Dekel et al., 2017). Показано применение ПЦВ

для количественной характеристики распределения клеток по стадиям клеточного цикла в популяции *S. cerevisiae* (Calvert et al., 2008), а также для количественной оценки сообществ фитопланктона по таким показателям, как распределение клеток по размерам, жизнеспособность и метаболическая активность (Dashkova et al., 2017).

СЦ основана на регистрации флуоресценции и светорассеяния на небольшом участке поверхности, которая освещается узким пучком лазерного излучения при горизонтальном сканировании (Kamentsky, Kamentsky, 1991). В известной мере это аналог ПЦ, который позволяет исследовать образцы клеток не в суспензии, а находящиеся на плоской поверхности, например, на предметном стекле для микроскопии, в лунке планшета для культивирования клеток, на мембранном фильтре и т.п. Это обеспечивает ряд преимуществ по сравнению с ПЦ, например, возможность работать с небольшими образцами, исследовать морфологию клеток, проводить исследования *in situ*. СЦ нашла широкое применение преимущественно в исследованиях клеток человека и животных (Pozarowski et al., 2013). Примеров применения СЦ в микробиологии сравнительно немного. Так, например, разработаны методики количественного учета бактерий и грибов в различных природных образцах (Vanhee et al., 2010) и бактерий в питьевой воде (Baudart et al., 2004) с использованием СЦ на мембранных фильтрах. Есть также аналогичные методики количественного учета микобактерий в клеточных образцах (Pina-Vaz et al., 2004) и *Staphylococcus xylosum* в биопленках на стеклянных поверхностях (Regina et al., 2012). Метод СЦ был использован совместно с микрофлуориметрией индивидуальных клеток *Cryptococcus neoformans* для оценки содержания в них ДНК, окрашенной йодидом пропидия, при изучении клеточного цикла этих дрожжей. Метод микрофлуориметрии позволил проследить динамику синтеза ДНК по стадиям развития, а СЦ оценить соотношение клеток на разных стадиях клеточного цикла в популяции (Yamaguchi et al., 2007).

НАНО МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ ВТОРИЧНЫХ ИОНОВ

Метод нано масс-спектрометрии вторичных ионов, nano SIMS (nano Secondary Ion Mass Spectrometry), позволяет характеризовать наличие тех или иных химических соединений в исследуемых объектах в координатах плоскости с разрешением в нанометровом диапазоне (получать “химическое изображение” объекта). Это осуществляется с помощью уникальных приборов, основанных на масс-спектрометрии вторичных ионов – так называемых ионных микроскопов и ионных микрозондов. В приборах первого типа образец “бомбардируется” первичными ионами по всей по-

верхности одновременно, во втором – в сканирующем режиме очень узким пучком. В качестве первичных ионов используют ионы цезия (Cs^+) и кислорода (O^-). Возникающие под ударом первичных ионов “осколки” разрушенных молекул образца – вторичные ионы, разделяются в детекторе масс-спектрометра по массе и регистрируются в виде спектра масс. Причем все эти данные у обоих типов приборов находятся в строгом соответствии с координатами плоскости образца. Если в образце имеются компоненты, имеющие пространственно-упорядоченную структуру, как например, клетки микроорганизмов, то после специальной компьютерной обработки данных, получается их “химическое изображение” по специфическому составу вторичных ионов. Кроме того приборы оснащены микроскопом, что позволяет сопоставлять “химическое изображение” с оптическим изображением (Gao et al., 2016; Nuñez et al., 2017). Применение nano SIMS в изучении микроорганизмов на уровне единичных клеток достаточно полно отражено в обзоре (Gao et al., 2016). Поэтому мы ограничимся лишь двумя примерами для иллюстрации возможностей метода. Первый пример – это исследование динамики размножения единичных бактерий *Staphylococcus aureus* непосредственно в мокроте пациентов с кистозным фиброзом (Kopf et al., 2016). Подход был основан на мечении дейтерием (2H_2O) вновь синтезируемых разветвленных насыщенных C_{14} и C_{16} жирных кислот с параллельным анализом специфичности в отношении *S. aureus* методом FISH. Была обнаружена выраженная гетерогенность клеток *S. aureus* по времени генерации, причем медиана исследованной популяции *in situ* по этому показателю оказалась существенно меньше измеренного ранее *in vitro* предела скоростей для патогенов кистозного фиброза. Авторы подчеркивают значимость данных, полученных *in situ* на единичных клетках, для выбора правильной стратегии химиотерапии при кистозном фиброзе.

Второй пример связан с изучением экологии микроорганизмов. Исследовали количественные физиологические характеристики индивидуальных бактериальных клеток *Chromatium okenii*, *Lamprocystis purpurea* и *Sulfolobium clathratiforme* экосистемы олиготрофного меромиктического озера (Musat et al., 2008). Для этого был разработан подход, также как и в предыдущем примере основанный на сопряжении nano SIMS и молекулярной идентификации с помощью FISH. Метаболическую активность характеризовали по ассимиляции $^{13}CO_2$ и $^{15}NH_4^+$. Было установлено, что в популяциях клеток каждого вида существует гетерогенность по метаболической активности. Еще одним любопытным наблюдением было обнаружение того, что клетки *C. okenii*, составляю-

щие менее 0.3% популяции обеспечивали более 40% потребления аммония и 70% общего потребления углерода в системе. Этот результат особенно ярко иллюстрирует принципиальную значимость и перспективность исследований экофизиологии микроорганизмов на уровне индивидуальных клеток, в частности с помощью методов nano SIMS.

КОЛЕБАТЕЛЬНАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ

Колебательная спектроскопия позволяет регистрировать спектры квантовых переходов между колебательными уровнями энергии молекул после возбуждения фотонами света. Колебательные спектры регистрируют с помощью инфракрасной спектроскопии (ИКС) и рамановской спектроскопии (РС) (названа так в честь Ч.В. Рамана, впервые описавшего феномен неупругого рассеяния света, в российской литературе часто пользуются термином “спектроскопия комбинационного рассеяния”).

ИКС позволяет измерять спектры поглощения инфракрасного излучения, обусловленные колебательными энергетическими переходами в молекулах. В основе РС лежит эффект так называемого неупругого рассеяния света. При отражении от молекул основная часть света рассеивается в виде так называемого упругого (рэлеевского) рассеяния. При этом спектр отраженного света не изменяется. Однако небольшая часть фотонов претерпевает неупругое отражение вследствие взаимодействия с молекулами, которое связано с колебательными энергетическими переходами, и у них изменяются спектральные свойства. Это излучение и регистрируется в виде рамановского спектра. Следует подчеркнуть, что ИКС и РС несут информацию о разных колебательных переходах молекул: поглощение инфракрасного света определяется изменениями электрического момента молекулы в ходе поглощения, а интенсивность рамановского рассеяния зависит от того, как меняется поляризуемость молекулы при возникновении колебания. Изменения поляризуемости и изменение электрического момента могут быть по-разному выражены при различных колебаниях. Поэтому эти колебания по-разному представлены в ИКС и РС. В частности, полярные группы органических соединений ($C=O$, $N-H$, $O-H$) хорошо выражены в инфракрасных спектрах, а неполярные группы ($C=C$, $C-C$, $S-S$) лучше видны в рамановских спектрах (Ferraro et al., 2003; Stuart, 2004).

ИКС и РС уже давно применяют для характеристики многоклеточных микробных препаратов с использованием стандартных приборов, получая усредненные данные о химическом составе основных компонентов микробных клеток в популяции. Примером может служить использование этих методов для идентификации на уровне

рода, вида и даже подвида, поскольку колебательные спектры микроорганизмов являются своего рода их “отпечатками пальцев” (Lu et al., 2011). Есть работы, в которых ИКС и РС использовали для изучения развития бактериальных биопленок, механизмов повреждения клеток, чувствительности к антибиотикам и ряд других (Lu et al., 2011; Santos et al., 2015).

Разработано несколько методов, которые могут быть использованы для исследования единичных клеток микроорганизмов с использованием РС (микро-РС): SERS (Surface-Enhanced Raman Spectroscopy), TERS (Tip-Enhanced Raman Spectroscopy), CARS (Coherent Anti-Stokes Raman Spectroscopy) и RRS (Resonance Raman Spectroscopy) (Li et al., 2012; Harrison, Berry, 2017). Учитывая, что рамановское рассеяние – это очень слабое по интенсивности излучение, то все эти методы используют те или иные приемы для усиления регистрируемых сигналов. Основным достоинством TERS является возможность регистрировать РС с пространственным разрешением ниже оптического дифракционного предела (Domke, Pettinger, 2010). Так, в частности, показано применение TERS для изучения поверхностных структур, в том числе динамики полисахаридов и пептидов у бактерий (Neugebauer et al., 2007), а также для идентификации бактерий и дрожжей на уровне единичных клеток (Neugebauer et al., 2007; Harz et al., 2009). Усиление сигнала рамановского рассеяния также может быть достигнуто с использованием облучения ультрафиолетовым светом. Нуклеиновые кислоты и белки по остаткам ароматических аминокислот у бактерий исследовали именно этим методом в ходе развития клеток по фазам роста (Neugebauer et al., 2007).

С помощью микро-РС можно получать так называемые “рамановские изображения” (Raman imaging) микроорганизмов подобно “химическим изображениям” при папо SIMS (см. предыдущий раздел) в условиях *in situ* или *in vivo* (Li et al., 2012; Harrison, Berry, 2017). Так, например, с учетом таксономической специфичности рамановских спектров (см. выше) благодаря применению RRS и специальных методов математической статистики показана возможность идентифицировать и локализовать *Mycobacterium gordonae* в макрофагах (Silge et al., 2007), идентифицировать, локализовать и даже определить физиологическое состояние разных популяций *S. aureus* в клетках эндотелия (Große et al., 2015). Методы RRS и SERS использовали для визуализации ризосферных бактерий *Pantoea* sp. YR343 на поверхности корней *Arabidopsis thaliana* (Polisetti et al., 2016).

Особый интерес представляет применение микро-РС в сочетании с зондированием стабильными изотопами, Raman-SIP (Raman Stable Isotope Probing) (Wang et al., 2016). Метод основан на

том, что замена какого-нибудь атома его изотопом в химическом соединении приводит к сдвигу характерных полос данного атома в рамановском спектре. Это открывает возможность изучения метаболизма определенных соединений путем введения в исследуемую систему субстратов, меченных стабильными изотопами. В случае изучения метаболизма целых клеток микроорганизмов в качестве меченых стабильными изотопами метаболитов в среду культивирования вносят различные субстраты. К настоящему времени исследована возможность применения субстратов меченых изотопами ^{13}C , ^{15}N и ^2H . Прием наиболее значимые результаты пока получены в основном с ^{13}C - и ^2H -аналогами природных субстратов.

Учитывая отсутствие или большую стоимость разнообразных ^{13}C -субстратов, был разработан оригинальный подход, основанный на обратном замещении ^{13}C -метаболитов природными ^{12}C -метаболитами (Wang et al., 2016a). Этот метод был использован при изучении симбиотических взаимоотношений бактерий *Acinetobacter baylyi* ADP1 и *E. coli* DH5 α -GFP. Исходно клетки выращивали с коммерчески доступной ^{13}C -D-глюкозой в качестве субстрата с добавлением D $_2$ O. После ^{13}C и ^2H меченых обоих штаммов клетки инкубировали с ^{12}C -цитратом. С помощью микро-РС было установлено, что клетки *E. coli* DH5 α -GFP, не утилизирующие цитрат в монокультуре, приобретали эту способность в присутствии клеток *A. baylyi* ADP1. Дополнительные исследования с использованием масс-спектрометрии позволили предположить, что экскретируемые *A. baylyi* ADP1 путресцин и фенилаланин могут быть стимуляторами анаболизма цитрата *E. coli* DH5 α -GFP.

Еще одно перспективное направление использования микро-РС связано с препаративным выделением отдельных клеток, обладающих определенными свойствами, RACS (Raman Activated Cell Sorting). Достоинствами этого подхода являются неинвазивность, отсутствие дополнительных химических обработок таких, как, например, флуоресцентное зондирование при FACS (см. раздел “Цитометрия”), а также возможность осуществлять выделение клеток, идентифицируемых по определенному химическому составу метаболитов (химическим “отпечаткам пальцев”). Однако развитие этой методологии сдерживается техническими трудностями, связанными главным образом с низкой интенсивностью рамановского светорассеяния и необходимостью регистрации спектров со скоростью, обеспечивающей возможность физического разделения клеток по определенным признакам в реальном масштабе времени (Pahlow et al., 2015; Song et al., 2016).

В качестве успешного применения выделения клеток бактерий с помощью RACS приведем два примера, в которых в качестве признака для пре-

Таблица 1. Основные методы количественного анализа бактерий и дрожжей на уровне единичных клеток*

Метод	Разновидность метода	Структурный уровень анализа	Исследованные микроорганизмы	Анализируемые свойства	Источники литературы
Оптическая микроскопия, сопряженная с компьютерным анализом изображений	Микроскопия в проходящем свете	Клеточный	Бактерии	Морфометрические показатели	Niven et al., 2006; Wang et al., 2010a; Dazzo, Niccum, 2015; Balomenos et al., 2017; Gangan, Athale, 2017; Dazzo et al., 2017; Yu et al., 2011; Liu et al., 2011
	Флуоресцентная микроскопия	Клеточный, субклеточный, молекулярный	Бактерии	Морфометрические показатели Метаболические реакции Жизнеспособность Внутриклеточная локализация белков, в том числе в динамике Динамика транскрипции Динамика трансляции	Ogawa et al., 2005 Schulze et al., 2011 Yao, Carballido-López, 2014; Uphoff, 2016; Schneider, Basler, 2016; Cortesi et al., 2017 Stracy, Karanidis, 2017 Gahlmann, Moerner, 2014
Сканирующая зондовая микроскопия	Сканирующая электронная микроскопия	Клеточный, субклеточный	Бактерии	Морфометрические показатели	Ohya et al., 2005; Negishi et al., 2009; Han et al., 2011; Gebre et al., 2015
				Жизнеспособность	Puchkov, 2014
	Сканирующая атомно-силовая микроскопия	Клеточный, субклеточный, молекулярный	Бактерии	Внутриклеточная локализация белков, в том числе в динамике	Chong et al., 2012; Bjerfving et al., 2012; Day et al., 2016
				Вязкость в вакуолях	Puchkov, 2016
				Электрохимические свойства поверхности клеток в биопленках	Koley et al., 2011; Liu et al., 2011; Abucayon et al., 2014; Connella et al., 2014; Zoski, 2016
Изолированные надмолекулярные комплексы	Изолированные надмолекулярные комплексы	Изолированные надмолекулярные комплексы	Структура полисахаридов, пептидогликана, тейхоевых кислот, пилей, жгутиков и других компонентов поверхности клеток	Dorobantu et al., 2012; Dufréne, 2014; Angeloni et al., 2016	
			Пространственная организация химических групп и зарядов на поверхности клеток, а также силы взаимодействия клеток между собой, с различными лигандами и поверхностями	Dorobantu et al., 2012; Huang et al., 2015; Ott et al., 2017; Henman-Balsler et al., 2017	

Таблица 1. Окончание

Метод	Разновидность метода	Структурный уровень анализа	Исследованные микроорганизмы	Анализируемые свойства	Источники литературы
Цитометрия	Проточная цитометрия	Клеточный	Бактерии, дрожжи	Гетерогенность популяций Жизнеспособность	Avery, 2006; Wilkinson, 2015 Juzwa et al., 2016; Emerson et al., 2017
	Массовая точная цитометрия	Клеточный	Бактерии	Физиологические реакции Экология	Ambriz-Aviña et al., 2014 Czechowska et al., 2008; Wang et al., 2010; Emerson et al., 2017
	Проточная цитометрия с визуализацией	Клеточный	Бактерии	Выделение бактерий с определенными свойствами	Wang et al., 2009; Chen et al., 2011
Нано масс-спектрометрия вторичных ионов	Сканирующая цитометрия	Клеточный	Бактерии	Интернализация фагоцитами	Phanse et al., 2012; Drechsler-Hake et al., 2016; Smirnov et al., 2017; Hanidas et al., 2017
		Клеточный	Дрожжи	Интернализация фагоцитами	Okagaki et al., 2010
		Клеточный	Бактерии	Морфометрические показатели	Calvert et al., 2008
		Клеточный	Бактерии	Морфометрические показатели	Baudart et al., 2004; Pina-Vaz et al., 2004; Vanhee et al., 2010; Regina et al., 2012
Коллебатальная спектроскопия	Микро-рамановская спектроскопия (микро-спектроскопия комбинационного рассеяния)	Клеточный	Дрожжи	Содержание ДНК	Yamaguchi et al., 2007
		Клеточный	Бактерии	Оптические метаболиты	Musat et al., 2008; Gao et al., 2016; Kopf et al., 2016; Nuñez et al., 2017
		Клеточный, субклеточный	Бактерии	Специфическая характеристика клеток по составу пептидов, белков, полисахаридов, нуклеиновых кислот, в том числе субклеточным пространственным разрешением	Neugebauer et al., 2007; Silge et al., 2007; Harz et al., 2009; Große et al., 2015; Wang et al., 2016; Harrison, Betty, 2017
Препаративное разделение клеток по рамановским спектрам	Препаративное разделение клеток по рамановским спектрам	Клеточный	Дрожжи	Спектральная характеристика клеток по составу пептидов, белков, полисахаридов и нуклеиновых кислот, в том числе субклеточным пространственным разрешением	Harz et al., 2009; Harrison, Betty, 2017
		Клеточный	Бактерии	Выделение бактерий с определенными свойствами рамановского спектра	McIlvenna et al., 2016; Song et al., 2017

* В таблицу включены методы, описанные в настоящем обзоре. Синими возможностям и применения этих и некоторых других методов, представленных в публикациях до 2004 г., можно познакомиться в обзорах (Shapiro, 2000; Brehm-Stecher, Johnson, 2004).

паративной сортировки клеток использовали хорошо выраженную спектральную полосу каротиноидов. Первый пример связан с использованием микропроточной системы RACS, которая была разработана для непрерывного разделения каротиноид-содержащих бактерий. В качестве модельного объекта использовали цианобактерий *Synechocystis* sp. PCC6803. Показана возможность разделения клеток, культивированных на ^{12}C - и ^{13}C -субстратах и содержащих, соответственно, ^{12}C - и ^{13}C -каротиноиды, с эффективностью 96.3% (McIlvenna et al., 2016). В другой работе проводилось разделение бактерий в образцах морской воды Красного моря с помощью RACS. При этом идентификация также была основана на спектрах каротиноидов, но разделение клеток производилось с использованием, так называемого клеточного выталкивания (cell ejection) с подложки, на которой фиксировались клетки. С помощью последующего геномного анализа изолированных клеток были выявлены новые функциональные гены, кодирующие биосинтез каротиноидов и изопреноидов, а также ранее неизвестные фототрофные микроорганизмы, включая некультивируемые *Cyanobacteria* spp. (Song et al., 2017).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

К настоящему времени в руках микробиологов имеется большой набор методов изучения физико-химических свойств единичных клеток микроорганизмов (табл. 1). Все эти методы основаны на разных принципах и, соответственно, позволяют осуществлять многостороннюю характеристику микробных клеток: это открывает перспективу по-новому подойти к решению многих фундаментальных и прикладных проблем.

Методы количественного анализа единичных клеток лежат в основе изучения природы гетерогенности микробных популяций. С помощью этих методов уже получены уникальные сведения о структурно-функциональной организации бактерий и дрожжей на молекулярном уровне, в том числе в динамике. В сочетании с методами геномики появилась возможность изучения некультивируемых в лабораторных условиях микроорганизмов (Solden et al., 2016) непосредственно *in situ*. Ведутся работы по использованию данных, полученных на единичных клетках микроорганизмов, в исследованиях по системной и синтетической биологии, а также для информационной технологии глубинного анализа данных (data mining). Количественный анализ взаимодействия единичных микробных клеток с клетками макроорганизмов, несомненно, сыграет важную роль в изучении и лечении инфекционных заболеваний.

Фронт работ по разработке и применению методов количественного анализа единичных клеток

микроорганизмов на клеточном и субклеточном уровне так широк, что его даже стали выделять как самостоятельное направление – “микробиология единичных клеток” (single-cell microbiology) (Brehm-Stecher, Johnson, 2004). Дальнейшее развитие этого направления, включая совершенствование его методической составляющей, несомненно, будет способствовать углублению наших представлений о мире микробов. Хороших методов в экспериментальной науке не может быть слишком много!

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Пучков Е.О. Внутриклеточная вязкость: методы измерения и роль в метаболизме // Биологические мембраны. 2014. Т. 31. С. 3–13.
- Puchkov E.O. Intracellular viscosity: methods of measurement and role in metabolism // Biochemistry (Moscow) Suppl. Ser. A: Membrane and Cell Biology. 2013. V. 7. № 4. P. 270–279. <http://dx.doi.org/doi10.1134/s19907478-13050140>.
- Пучков Е.О. Межклеточная сигнализация в мире микроорганизмов: панорамный вид // Биологические мембраны. 2016. Т. 33. С. 32–42.
- Puchkov E.O. Intercellular signaling in microbial world: A panoramic view // Biochemistry (Moscow) Suppl. Ser. A: Membrane and Cell Biology. 2016. V. 10. № 1. P. 1–10.
- Abucayon E., Ke N., Cornut R., Patelunas A., Miller D., Nishiguchi M.K., Zoski C.G. Investigating catalase activity through hydrogen peroxide decomposition by bacteria biofilms in real time using scanning electrochemical microscopy // Anal. Chem. 2014. V. 86. P. 498–505. doi 10.1021/ac402475m
- Agrawal U., Reilly D.T., Schroeder C.M. Zooming in on biological processes with fluorescence nanoscopy // Curr. Opin. Biotechnol. 2013. V. 24. P. 646–653. <http://dx.doi.org/doi10.1016/j.copbio.2013.02.016>.
- Ambriz-Aviña V., Contreras-Garduño J.A., Pedraza-Reyes M. Applications of flow cytometry to characterize bacterial physiological responses // Biomed. Res. Int. 2014. V. 2014. ID 461941. doi 10.1155/2014/461941
- Angeloni L., Passeri D., Reggente M., Pantanella F., Mantovani D., Rossi M. Microbial cells force spectroscopy by atomic force microscopy: A review // Nanosci. Nanometrol. 2016. V. 2. P. 30–40. doi 10.11648/j.nsnm.20160201.13
- Avery S.V. Microbial cell individuality and the underlying sources of heterogeneity // Nat. Rev. Microbiol. 2006. V. 4. P. 577–587.
- Balomenos A.D., Tsakanikas P., Aspidou Z., Tampakaki A.P., Koutsoumanis K.P., Manolagos E.S. Image analysis driven single-cell analytics for systems microbiology // BMC Syst. Biol. 2017. V. 11. P. 43. doi 10.1186/s12918-017-0399-z
- Barteneva N.S., Fasler-Kan E., Vorobjev I.A. Imaging flow cytometry: coping with heterogeneity in biological systems // J. Histochem. Cytochem. 2012. V. 60. P. 723–733.
- Baudart J., Olaizola A., Coallier J., Gauthier V., Laurent P. Assessment of a new technique combining a viability test,

- whole-cell hybridization and laser-scanning cytometry for the direct counting of viable *Enterobacteriaceae* cells in drinking water // *FEMS Microbiol. Lett.* 2005. V. 243. P. 405–409.
- Bhushan B., Marti O.* Scanning probe microscopy – Principle of operation, instrumentation and probes // *Nanotribology and Nanomechanics* / Ed. Bhushan B. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2011. Ch. 2. P. 37–110. doi 10.1007/978-3-642-15283-2_2
- Bjerling P., Olsson I., Meng X.* Quantitative live cell fluorescence-microscopy analysis of fission yeast // *J. Visual. Exper.* 2012. V. 59. e3454. <http://dx.doi.org/10.3791/3454>.
- Bobik T.A., Lehman B.P., Yeates T.O.* Bacterial microcompartments: widespread prokaryotic organelles for isolation and optimization of metabolic pathways // *Mol. Microbiol.* 2015. V. 98. P. 193–207. <https://doi.org/10.1111/mmi.13117>.
- Brehm-Stecher B.F., Johnson E.A.* Single-cell microbiology: tools, technologies, and applications // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2004. V. 68. P. 538–559.
- Calvert M.E., Lannigan J.A., Pemberton L.F.* Optimization of yeast cell cycle analysis and morphological characterization by multispectral imaging flow cytometry // *Cytometry A*. 2008. V. 73. P. 825–833. doi 10.1002/cyto.a.20609
- Chen C.H., Cho S.H., Chiang H.I., Tsai F., Zhang K., Lo Y.H.* Specific sorting of single bacterial cells with microfabricated fluorescence-activated cell sorting and tyramide signal amplification fluorescence in situ hybridization // *Anal. Chem.* 2011. V. 83. P. 7269–7275. doi 10.1021/ac2013465
- Chen S.-C., Zhao T., Gordon G.J., Murphy R.F.* Automated image analysis of protein localization in budding yeast // *Bioinformatics*. 2007. V. 23. P. i66–i71. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btm206>.
- Choi H., Rangarajan N., Weisshaar J.C.* Lights, camera, action! Antimicrobial peptide mechanisms imaged in space and time // *Trends Microbiol.* 2016. V. 24. P. 111–122. doi 10.1016/j.tim.2015.11.004
- Chong Y.T., Cox M.J., Andrews B.* Proteome-wide screens in *Saccharomyces cerevisiae* using the yeast GFP collection // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2012. V. 736. P. 169–178. doi 10.1007/978-1-4419-7210-1_8
- Connella J.L., Kimb J., Shearb J.B., Bards A.J., Whiteley M.* Real-time monitoring of quorum sensing in 3D-printed bacterial aggregates using scanning electrochemical microscopy // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2014. V. 111. P. 18255–18260. doi 10.1073/pnas.1421211111
- Cortesi M., Bandiera L., Pasini A., Bevilacqua A., Gherardi A., Furini S., Giordano E.* Reliable measurement of *E. coli* single cell fluorescence distribution using a standard microscope set-up // *J. Biol. Eng.* 2017. V. 11. № 8. doi 10.1186/s13036-017-0050-y
- Czechowska K., Johnson D.R., van der Meer J.R.* Use of flow cytometric methods for single-cell analysis in environmental microbiology // *Curr. Opin. Microbiol.* 2008. V. 11. P. 205–212. doi 10.1016/j.mib.2008.04.006
- Dashkova K., Malashenkov D., Poulton N., Vorobjev I., Barteneva N.S.* Imaging flow cytometry for phytoplankton analysis // *Methods*. 2017. V. 112. P. 188–200. doi 10.1016/j.ymeth.2016.05.007
- Dazzo F.B.* CMEIAS-aided microscopy of the spatial ecology of individual bacterial interactions involving cell-to-cell communication within biofilms // *Sensors*. 2012. V. 12. P. 7047–7062. doi 10.3390/s120607047
- Dazzo F.B., Niccum B.C.* Use of CMEIAS image analysis software to accurately compute attributes of cell size, morphology, spatial aggregation and color segmentation that signify *in situ* ecophysiological adaptations in microbial biofilm communities // *Computation*. 2015. V. 3. P. 72–98.
- Dazzo F.B., Sexton R., Jain A., Makhoul A., Shears M., Gusfa D., Handelsman S., Niccum B., Oksay D.* Influence of substratum hydrophobicity on the geomicrobiology of river biofilm architecture and ecology analyzed by CMEIAS bioimage informatics // *Geosciences*. 2017. V. 7. № 56. P. 1–36. doi 10.3390/geosciences7030056
- Dekel E., Rivkin A., Heidenreich M., Nadav Y., Ofir-Birin Y., Porat Z., Regev-Rudzki N.* Identification and classification of the malaria parasite blood developmental stages, using imaging flow cytometry // *Methods*. 2017. V. 112. P. 157–166. doi 10.1016/j.ymeth.2016.06.021
- Domke K., Pettinger B.* Studying surface chemistry beyond the diffraction limit: 10 years of TERS // *Chemphyschem*. 2010. V. 11. P. 1365–1373. doi 10.1002/cphc.200900975
- Dorobantu L.S., Goss G.G., Burrell R.E.* Atomic force microscopy: a nanoscopic view of microbial cell surfaces // *Micron*. 2012. V. 43. P. 1312–1322. doi 10.1016/j.micron.2012.05.005
- Drechsler-Hake D., Alamir H., Hahn J., Günter M., Wagner S., Schütz M., Bohn E., Schenke-Layland K., Pisano F., Dersch P., Autenrieth I.B., Autenrieth S.E.* Mononuclear phagocytes contribute to intestinal invasion and dissemination of *Yersinia enterocolitica* // *Int. J. Med. Microbiol.* 2016. V. 306. P. 357–366. doi 10.1016/j.ijmm.2016.04.002
- Dufrêne Y.F.* Atomic force microscopy in microbiology: new structural and functional insights into the microbial cell surface // *MBio*. 2014. V. 5. P. e01363-14. doi 10.1128/mBio.01363-14
- Emerson J.B., Adams R.I., Román C.M.B., Brooks B., Coil D.A., Dahlhausen K., Ganz H.H., Hartmann E.M., Hsu T., Justice N.B., Paulino-Lima I.G., Luongo J.C., Lympelopoulou D.S., Gomez-Silvan C., Rothschild-Mancinelli B., Balk M., Huttenhower C., Nocker A., Vaishampayan P., Rothschild L.J.* Schrödinger's microbes: Tools for distinguishing the living from the dead in microbial ecosystems // *Microbiome*. 2017. V. 5. P. 86. doi 10.1186/s40168-017-0285-3
- Ferraro J., Nakamoto K., Brown C.W.* Introductory Raman Spectroscopy. 2nd ed. Elsevier, 2003. 434 p.
- Gahlmann A., Moerner W.E.* Exploring bacterial cell biology with single-molecule tracking and super-resolution imaging // *Nat. Rev. Microbiol.* 2014. V. 12. P. 9–22. doi 10.1038/nrmicro3154
- Gangan M.S., Athale C.A.* Threshold effect of growth rate on population variability of *Escherichia coli* cell lengths // *R. Soc. Open Sci.* 2017. V. 4. P. 160417. doi 10.1098/rsos.160417

- Gao D., Huang X., Tao Y. A critical review of NanoSIMS in analysis of microbial metabolic activities at single-cell level // *Crit. Rev. Biotechnol.* 2016. V. 36. P. 884–890. doi 10.3109/07388551.2015.1057550
- Gebre A.A., Okada H., Kim C., Kubo K., Ohnuki S., Ohya Y. Profiling of the effects of antifungal agents on yeast cells based on morphometric analysis // *FEMS Yeast Res.* 2015. V. 15. fov040. <http://dx.doi.org/10.1093/femsyr/fov040>.
- Große C., Bergner N., Dellith J., Heller R., Bauer M., Mellmann A., Popp J., Neugebauer U. Label-free imaging and spectroscopic analysis of intracellular bacterial infections // *Anal. Chem.* 2015. V. 87. P. 2137–2142. doi 10.1021/ac503316s
- Han J., Kamber M., Pei J. *Data Mining: Concepts and Techniques*. 3rd ed. Amsterdam: Elsevier, 2011. 744 p.
- Haridas V., Ranjbar S., Vorobjev I.A., Goldfeld A.E., Barteneva N.S. Imaging flow cytometry analysis of intracellular pathogens // *Methods*. 2017. V. 112. P. 91–104. doi 10.1016/j.ymeth.2016.09.007
- Harrison J.P., Berry D. Vibrational spectroscopy for imaging single microbial cells in complex biological samples // *Front. Microbiol.* 2017. V. 8. P. 675. doi 10.3389/fmicb.2017.00675
- Harz M., Rösch P., Popp J. Vibrational spectroscopy – a powerful tool for the rapid identification of microbial cells at the single-cell level // *Cytometry A*. 2009. V. 75. P. 104–113. doi 10.1002/cyto.a.20682
- Hennig H., Rees P., Blasi T., Kamensky L., Hung J., Dao D., Carpenter A.E., Filby A. An open-source solution for advanced imaging flow cytometry data analysis using machine learning // *Methods*. 2017. V. 112. P. 201–210. doi 10.1016/j.ymeth.2016.08.018
- Herman-Bausier P., Formosa-Dague C., Feuillie C., ValotEAU C., Dufrêne Y.F. Forces guiding staphylococcal adhesion // *J. Struct. Biol.* 2017. V. 197. P. 65–69. doi 10.1016/j.jsb.2015.12.009
- Herzenberg L.A., Parks D., Sahaf B., Perez O., Roederer M., Herzenberg L.A. The history and future of the fluorescence activated cell sorter and flow cytometry: a view from Stanford // *Clin. Chem.* 2002. V. 48. P. 1819–1827.
- Huang Q., Wu H., Cai P., Fein J.B., Chen W. Atomic force microscopy measurements of bacterial adhesion and biofilm formation onto clay-sized particles // *Sci. Rep.* 2015. V. 5. P. 16857. doi 10.1038/srep16857
- Ishii S., Tago K., Senoo K. Single-cell analysis and isolation for microbiology and biotechnology: methods and applications // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2010. V. 86. P. 1281–1292. doi 10.1007/s00253-010-2524-4
- James S.A., Hilal N., Wright C.J. Atomic force microscopy studies of bioprocess engineering surfaces – imaging, interactions and mechanical properties mediating bacterial adhesion // *Biotechnol. J.* 2017. V. 12. P. 7. doi 10.1002/biot.201600698
- Juzwa W., Daber A., Myszka K., Białas W., Czarczyk K. Identification of microbes from the surfaces of food-processing lines based on the flow cytometric evaluation of cellular metabolic activity combined with cell sorting // *Biofouling*. 2016. V. 32. P. 841–851. doi 10.1080/08927014.2016.1201657
- Kamensky L.A., Kamensky L.D. Microscope-based multi-parameter laser scanning cytometer yielding data comparable to flow cytometry data // *Cytometry*. 1991. V. 12. P. 381–387.
- Koley D., Ramsey M.M., Bard A.J., Whiteley M. Discovery of a biofilm electrocline using real-time 3D metabolite analysis // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2011. V. 108. P. 19996–20001. doi 10.1073/pnas.1117298108
- Kopf S.H., Sessions A.L., Cowley E.S., Rees C., Van Sambeek L., Hu Y., Orphan V.J., Kato R., Newman D.K. Trace incorporation of heavy water reveals slow and heterogeneous pathogen growth rates in cystic fibrosis sputum // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2016. V. 113. P. E110-6. doi 10.1073/pnas.1512057112
- Lakowicz J.R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 3rd ed. Berlin: Springer Science and Business Media, 2006. 871 p. <http://dx.doi.org/10.1007/978-0-387-46312-4>.
- Li M., Xu J., Romero-Gonzalez M., Banwart S.A., Huang W.E. Single cell Raman spectroscopy for cell sorting and imaging // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2012. V. 23. P. 56–63.
- Liu J., Dazzo F.B., Glagoleva O., Yu B., Jain A.K. CMEIAS: A computer-aided system for the image analysis of bacterial morphotypes in microbial communities // *Microbial Ecol.* 2001. V. 41. P. 173–194. <http://dx.doi.org/10.1007/s002480000004>.
- Liu X., Aubrey W., Martin K., Sparkes A., Lu C., King R.D. The analysis of yeast cell morphology features in exponential and stationary phase // *J. Biol. Systems*. 2011. V. 19. P. 561–575. <http://dx.doi.org/doi/10.1142/S0218339011003968>.
- Liu X., Ramsey M.M., Chen X., Koley D., Whiteley M., Bard A.J. Real-time mapping of a hydrogen peroxide concentration profile across a polymicrobial bacterial biofilm using scanning electrochemical microscopy // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2011. V. 108. P. 72668–72673. doi 10.1073/pnas.1018391108
- Lower S.K. Atomic force microscopy to study intermolecular forces and bonds associated with bacteria // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2011. V. 715. P. 285–299. doi 10.1007/978-94-007-0940-9_18
- Lu X., Al-Qadiri H.M., Lin M., Rasco B.A. Application of mid-infrared and Raman spectroscopy to the study of bacteria // *Food Bioproc. Technol.* 2011. V. 4. P. 919–935. doi 10.1007/s11947-011-0516-8
- McIlvenna D., Huang W.E., Davison P., Glidle A., Cooper J., Yin H. Continuous cell sorting in a flow based on single cell resonance Raman spectra // *Lab Chip*. 2016. V. 16. P. 1420–1429. doi 10.1039/c6lc00251j
- Minoshima M., Kikuchi K. Photostable and photoswitching fluorescent dyes for super-resolution imaging // *J. Biol. Inorg. Chem.* 2017. V. 22. P. 639–652. doi 10.1007/s00775-016-1435-y
- Mulvihill D.P. Live cell imaging in fission yeast // *Cold Spring Harb. Protoc.* 2017. V. 2017. № 10. <https://doi.org/10.1101/pdb.top090621>.
- Musat N., Halm H., Winterholler B., Hoppe P., Peduzzi S., Hillion F., Horreard F., Amann R., Jørgensen B.B., Kuypers M.M.M. A single-cell view on the ecophysiology of anaerobic phototrophic bacteria // *Proc. Natl. Acad.*

- Sci. USA. 2008. V. 105. P. 17861–17866. doi.org/10.1073/pnas.0809329105
- Negishi T., Nogami S., Ohya Y. Multidimensional quantification of subcellular morphology of *Saccharomyces cerevisiae* using CalMorph, the high-throughput image-processing program // J. Biotechnol. 2009. V. 141. P. 109–117. http://dx.doi.org/ doi 10.1016/j.jbiotec.2009.03.014.
- Neugebauer U., Schmid U., Baumann K., Ziebuhr W., Kozitskaya S., Deckert V., Schmitt M., Popp J. Towards a detailed understanding of bacterial metabolism – spectroscopic characterization of *Staphylococcus epidermidis* // Chemphyschem. 2007. V. 8. P. 124–137.
- Niven G.W., Fuks T., Morton J.S., Rua S.A., Mackey B.M. A novel method for measuring lag times in division of individual bacterial cells using image analysis // J. Microbiol. Methods. 2006. V. 65. P. 311–317. http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2005.08.006
- Nuñez J., Renslow R., Cliff J.B. 3rd, Anderton C.R. NanoSIMS for biological applications: Current practices and analyses // Biointerphases. 2017. V. 13. № 3. P. 03B301. doi 10.1116/1.4993628
- Ogawa M., Tani K., Yamaguchi N., Nasu M. Development of multicolour digital image analysis system to enumerate actively respiring bacteria in natural river water // J. Appl. Microbiol. 2003. V. 95. P. 120–128. http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01950.x.
- Ogawa M., Tani K., Ochiai N., Yamaguchi N., Nasu M. Multicolour digital image analysis system for identification of bacteria and concurrent assessment of their respiratory activity // J. Appl. Microbiol. 2005. V. 98. P. 1101–1106. http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02551.x.
- Ohtani M., Saka A., Sano F., Ohya Y., Morishita S. Development of image processing program for yeast cell morphology // J. Bioinform. Computat. Biol. 2004. V. 1. P. 695–709. http://dx.doi.org/10.1142/S0219720004000366
- Ohya Y., Sese J., Yukawa M., Sano F., Nakatani Y., Saito T.L., Saka A., Fukuda T., Ishihara S., Oka S., Suzuki G., Watanabe M., Hirata A., Ohtani M., Sawai H., Frouse N., Latgé J.P., François J.M., Aebi M., Tanaka S., Muramatsu S., Araki H., Sonoike K., Nogami S., Morishita S. High-dimensional and large-scale phenotyping of yeast mutants // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2005. V. 102. P. 19015–19020. http://dx.doi.org/ doi 10.1073/pnas.0509436102.
- Okagaki L.H., Strain A.K., Nielsen J.N., Charlier C., Baltes N.J., Chrétien F., Heitman J., Dromer F., Nielsen K. Cryptococcal cell morphology affects host cell interactions and pathogenicity // PLoS Pathog. 2010. V. 6. № 6. doi 10.1371/annotation/1b59fd9e-9ac9-4eab-a083-14c413c80b03
- Ott W., Jobst M.A., Schoeler C., Gaub H.E., Nash M.A. Single-molecule force spectroscopy on polyproteins and receptor-ligand complexes: The current toolbox // J. Struct. Biol. 2017. V. 197. P. 3–12. doi 10.1016/j.jsb.2016.02.011
- Pahlow S., Meisel S., Cialla-May D., Weber K., Rösch P., Popp J. Isolation and identification of bacteria by means of Raman spectroscopy // Adv. Drug. Deliv. Rev. 2015. V. 89. P. 105–126. doi 10.1016/j.addr.2015.04.006
- Phanse Y., Ramer-Tait A.E., Friend S.L., Carrillo-Conde B., Lueth P., Oster C.J., Phillips G.J., Narasimhan B., Wannemuehler M.J., Bellaire B.H. Analyzing cellular internalization of nanoparticles and bacteria by multi-spectral imaging flow cytometry // J. Vis. Exp. 2012. V. 8. № 64. P. e3884. doi 10.3791/3884
- Pina-Vaz C., Costa-Oliveira S., Rodrigues A.G., Salvador A. Novel method using a laser scanning cytometer for detection of mycobacteria in clinical samples // J. Clin. Microbiol. 2004. V. 42. P. 906–908.
- Polisetti S., Bible A.N., Morrell-Falvey J.L., Bohn P.W. Raman chemical imaging of the rhizosphere bacterium *Pantoea* sp. YR343 and its co-culture with *Arabidopsis thaliana* // Analyst. 2016. V. 141. P. 2175–2182. doi 10.1039/c6an00080k
- Pozarowski P., Holden E., Darzynkiewicz Z. Laser scanning cytometry: principles and applications—an update // Methods Mol. Biol. 2013. V. 931. P. 187–212. doi 10.1007/978-1-62703-056-4_11
- Puchkov E.O. Computer image analysis as a tool for microbial viability assessment: examples of use and prospects // J. Biosci. Med. 2014. V. 2. P. 1–6. http://dx.doi.org/ doi 10.4236/jbm.2014.23001.
- Puchkov E. Microfluorimetry of single yeast cells by fluorescence microscopy combined with digital photography and computer image analysis // Advances in Medicine and Biology / Ed. Berhardt L.V. New York: Nova Science Publishers, Inc., 2016. V. 98. Ch. 6. P. 69–90.
- Puchkov E. Image analysis in microbiology: a review // J. Comp. Commun. 2016a. V. 4. P. 8–32.
- Regina V.R., Poulsen M., Søhoel H., Bischoff C., Meyer R.L. Quantification of bacteria on abiotic surfaces by laser scanning cytometry: an automated approach to screen the anti-fouling properties of new surface coatings // J. Lab. Autom. 2012. V. 17. P. 293–301. doi 10.1177/2211068212450013
- Saito T.L., Ohtani M., Sawai H., Sano F., Saka A., Watanabe D., Yukawa M., Ohya Y., Morishita S. SCMD: *Saccharomyces cerevisiae* Morphological Database // Nucleic Acid Res. 2004. V. 32. Database issue D319–D322. http://dx.doi.org/ doi 10.1093/nar/gkh113.
- Santos M.I., Gerbino E., Tymczyszyn E., Gomez-Zavaglia A. Applications of infrared and Raman spectroscopies to probiotic investigation // Foods. 2015. V. 4. P. 283–305. doi 10.3390/foods4030283
- Schneider J.P., Basler M. Shedding light on biology of bacterial cells // Phil. Trans. R. Soc. 2016. V. B 371. P. 20150499. http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2015.0499.
- Schulze K., López D.A., Tillich U.M., Frohme M. A Simple viability analysis for unicellular cyanobacteria using a new autofluorescence assay, automated microscopy, and imageJ // BMC Biotechnol. 2011. V. 11. P. 118–125. http://dx.doi.org/ doi 10.1186/1472-6750-11-118
- Shapiro H.M. Microbial analysis at the single-cell level: tasks and techniques // J. Microbiol. Methods. 2000. V. 42. P. 3–16.
- Silge A., Abdou E., Schneider K., Meisel S., Bocklitz T., Lu-Walther H.W., Heintzmann R., Rösch P., Popp J. Shedding light on host niches: label-free *in situ* detection of *Mycobacterium gordonae* via carotenoids in macrophages by Raman microspectroscopy // Cell. Microbiol. 2015. V. 17. P. 832–842. doi 10.1111/cmi.12404

- Smirnov A., Solga M.D., Lannigan J., Criss A.K. High-throughput particle uptake analysis by imaging flow cytometry // *Curr. Protoc. Cytom.* 2017. V. 80. P. 11.22.1–11.22.17. doi 10.1002/cpcy.19
- Snapp E. Design and use of fluorescent fusion proteins in cell biology // *Curr. Prot. Cell Biol.* 2005. Unit–21.4. <http://doi.org/10.1002/0471143030.cb2104s27>.
- Solden L., Lloyd K., Wrighton K. The bright side of microbial dark matter: lessons learned from the uncultivated majority // *Curr. Opin. Microbiol.* 2016. V. 31. P. 217–226. doi 10.1016/j.mib.2016.04.020
- Song Y., Yin H., Huang W.E. Raman activated cell sorting // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2016. V. 33. P. 1–8. doi 10.1016/j.cbpa.2016.04.002
- Song Y., Kaster A.K., Vollmers J., Song Y., Davison P.A., Frentrop M., Preston G.M., Thompson I.P., Murrell J.C., Yin H., Hunter C.N., Huang W.E. Single-cell genomics based on Raman sorting reveals novel carotenoid-containing bacteria in the Red Sea // *Microb. Biotechnol.* 2017. V. 10. P. 125–137. doi 10.1111/1751-7915.12420
- Stracy M., Kapanidis A.N. Single-molecule and super-resolution imaging of transcription in living bacteria // *Methods.* 2017. V. 120. P. 103–114. doi 10.1016/j.ymeth.2017.04.001
- Stuart B.H. *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications.* John Wiley & Sons, Ltd., 2004. 244 p. doi 10.1002/0470011149
- Sutter M., Faulkner M., Aussignargues C., Paasch B.C., Barrett S., Kerfeld C.A., Liu L.N. Visualization of bacterial microcompartment facet assembly using high-speed atomic force microscopy // *Nano Lett.* 2016. V. 16. P. 1590–1595. doi 10.1021/acs.nanolett.5b04259
- Terahara N., Kadera N., Uchihashi T., Ando T., Namba K., Minamino T. Na⁺-induced structural transition of MotPS for stator assembly of the *Bacillus* flagellar motor // *Sci. Adv.* 2017. V. 3. № 11. P.eaao4119. doi 10.1126/sciadv.aao4119
- Tsien R.Y. The green fluorescent protein // *Ann. Rev. Biochem.* 1998. V. 67. P. 509–544.
- Uphoff S. Super-resolution microscopy and tracking of DNA-binding proteins in bacterial cells // *Methods Mol. Biol.* 2016. V. 1431. P. 221–234. doi 10.1007/978-1-4939-3631-1_16
- Van Der Hofstadt M., Hüttener M., Juárez A., Gomila G. Nanoscale imaging of the growth and division of bacterial cells on planar substrates with the atomic force microscope // *Ultramicroscopy.* 2015. V. 154. P. 29–36. doi 10.1016/j.ultramicro.2015.02.018
- Vanhee L.M., D'Haese E., Cools I., Nelis H.J., Coenye T. Detection and quantification of bacteria and fungi using solid-phase cytometry // *Detection of bacteria, viruses, parasites and fungi. NATO science for peace and security series A: Chemistry and Biology.* Ed. Viola Magni M. Dordrecht: Springer, 2010. P. 25–41.
- Wang Y., Hammes F., Boon N., Chami M., Egli T. Isolation and characterization of low nucleic acid (LNA)-content bacteria // *ISME J.* 2009. V. 3. P. 889–902. doi 10.1038/ismej.46
- Wang Y., Hammes F., De Roy K., Verstraete W., Boon N. Past, present and future applications of flow cytometry in aquatic microbiology // *Trends Biotechnol.* 2010. V. 28. P. 416–424. doi 10.1016/j.tbiotech.2010.04.006
- Wang Y., Huang W.E., Cui L., Wagner M. Single cell stable isotope probing in microbiology using Raman microspectroscopy // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2016. V. 41. P. 34–42. doi 10.1016/j.copbio.2016.04.018
- Wang P., Robert L., Pelletier J., Dang W.L., Taddei F., Wright A., Jun S. Robust growth of *Escherichia coli* // *Curr. Biol.* 2010a. V. 20. P. 1099–1103. doi 10.1016/j.cub.2010.04.045
- Wang Y., Song Y., Tao Y., Muhamadali H., Goodacre R., Zhou N.Y., Preston G.M., Xu J., Huang W.E. Reverse and multiple stable isotope probing to study bacterial metabolism and interactions at the single cell level // *Anal. Chem.* 2016a. V. 88. P. 9443–9450.
- Wilkinson M.G. *Flow Cytometry in Microbiology: Technology and Applications.* Caister Academic Press, 2015. 230 p. [https://doi.org/doi 10.21775/9781910190111](https://doi.org/doi%2010.21775/9781910190111).
- Yamaguchi M., Ohkusu M., Biswas S.K., Kawamoto S. Cytological study of cell cycle of the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans* // *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi.* 2007. V. 48. № 4. P. 147–152.
- Yao Z., Carballido-López R. Fluorescence imaging for bacterial cell biology: from localization to dynamics, from ensembles to single molecules // *Annu. Rev. Microbiol.* 2014. V. 68. P. 459–476. doi 10.1146/annurev-micro-091213-113034
- Yu B.Y., Elbuken C., Ren C.L., Huissoon J.P. Image processing and classification algorithm for yeast cell morphology in a microfluidic chip // *J. Biomed. Optics.* 2011. V. 16. 066008. [http://dx.doi.org/doi 10.1117/1.3589100](http://dx.doi.org/doi%2010.1117/1.3589100).
- Zoski C.G. Review – Advances in scanning electrochemical microscopy (SECM) // *J. Electrochem. Soc.* 2016. V. 163. № 4. P. H3088–H3100. doi 10.1149/2.0141604jes

Quantitative Methods for Single-Cell Analysis of Microorganisms

E. O. Puchkov*

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

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

Received June 15, 2018

Revised September 27, 2018

Accepted October 2, 2018

Abstract—The present-day concepts of microbial life were significantly influenced by research at the population level. This approach stemmed from the necessity to overcome the sensitivity limitations of the physicochemical, molecular biological, and genetic approaches. Potential differences between microbial cells were leveled off, the properties of the cells were averaged, and the obtained results characterized the studied microbial population as a whole. However, some analytical techniques were perfected to the level when quantitative investigation of the physicochemical and morphological properties of individual cells became possible.

This made it possible to apply new approaches to a number of problems, including heterogeneity of microbial populations, the nature of uncultured and persistent forms, biofilm development, microbial interaction with plant and animal cells, relationship between structure and function in metabolism, etc. The present review provides a brief discussion on the methods of quantitative analysis of single bacterial and yeast cells at the cellular and subcellular level and examples of their application according to the literature data of the last 15 years.

Keywords: bacteria, yeasts, morphometry, biofilms, viability, heterogeneity, fluorescence microscopy, phase contrast microscopy, ultrahigh resolution microscopy, computerized image analysis, microfluorimetry, scanning probe microscopy, scanning electrochemical microscopy, scanning atomic force microscopy, microscopy of chemical forces, force spectroscopy of individual cells, force spectroscopy of individual molecules, flow cytometry, scanning cytometry, nanoscale mass spectrometry of secondary ions, micro-Raman spectroscopy

Для бесплатного ознакомления

ГЕКСАДЕКАН И БАКТЕРИИ-ДЕСТРУКТОРЫ: МЕХАНИЗМЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ

© 2019 г. И. П. Соляникова^а, *, Л. А. Головлёва^а

^аИнститут биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук, Пущино, Россия

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

Поступила в редакцию 09.04.2018 г.

После доработки 17.07.2018 г.

Принята к публикации 02.10.2018 г.

В обзоре представлено краткое описание наиболее интересных результатов, полученных при исследовании взаимодействия гидрофобного субстрата, гексадекана, и микробных клеток. Особое внимание уделено трем аспектам этого процесса – (1) взаимодействию бактериальной клетки с гидрофобным субстратом: характеристике клеточной поверхности и конформационным изменениям, происходящим при контакте клетки с нерастворимым субстратом; (2) молекулярным основам разложения гидрофобных соединений на каждом этапе взаимодействия клетки с субстратом: синтезу клеткой диспергирующих компонентов, диспергированию водонерастворимого субстрата, поглощению гидрофобного соединения клеткой и его хранению, регуляции транскрипции генов, как непосредственно вовлеченных в процесс биодеструкции, так и в процессы, взаимосвязанные с ростом на гидрофобных субстратах; (3) синтезу поверхностно-активных веществ бактериями в процессе разложения гидрофобных соединений, разнообразию структуры и условий повышения их выхода, а также биотехнологическому применению.

Ключевые слова: бактерии, гексадекан, деградация, атомно-силовая микроскопия, транскриптомный анализ, биосурфактанты

DOI: 10.1134/S0026365618060162

В настоящее время загрязнение окружающей среды продуктами переработки нефти и ее компонентами представляет одну из самых значительных проблем. Так, по оценкам экспертов, ежегодные потери нефти в результате естественных протечек и как следствие потерь в процессах добычи, переработки и транспортировки достигают 600 тыс. тонн (Kvenvolden, Cooper, 2003). Наиболее серьезные аварии произошли в США в 1989 г. (Exxon Valdez) и в 2010 г. (Petroleum Deepwater Horizon) (Atlas, Hazen, 2011), в Китае в Далине в июле 2010 г. (Xu et al., 2012). До некоторой степени разложение легких летучих компонентов нефти не представляет собой большой проблемы, хотя нельзя не учитывать относительную устойчивость бензола, толуола, ксилола к микробной деградации и токсичный эффект этих соединений на клетки. На этом фоне разложение более тяжелых фракций нефти может представлять серьезную проблему для человечества и вызывает популяционные изменения в местах, подвергшихся воздействию нефтезагрязнителей. Ряд авторов интерпретируют изменения в микробной экологии, основываясь на данных таксономии и функциональной генетики, а также биологических функциях, выраженных в активности уреазы

и дегидрогеназы в почвенных образцах, подвергнутых загрязнению сырой нефти, дизельного топлива, *n*-гексадекана и полиароматических углеводородов (ПАУ) (Wu et al., 2014). Одним из последствий этого воздействия отмечается стимулирование активности местной микрофлоры, особенно бактерий, разлагающих алканы, что приводит к убыли этих соединений примерно на 20% за месяц. Особенно наглядно этот эффект проявляется в почвах, загрязненных невысокими концентрациями гексадекана, около 2.5 г/кг сухой почвы. Однако присутствие ПАУ полностью подавляет эту биологическую активность почвы (Wu et al., 2014). Данный обзор посвящен наиболее актуальным направлениям исследований процесса разложения *n*-алканов (с упором на гексадекан как тестовое соединение) бактериями.

МОРФО-ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ КЛЕТОК ПРИ АДГЕЗИИ К РАЗЛИЧНЫМ ПОВЕРХНОСТЯМ

Общим свойством всех фракций сырой нефти является их низкая растворимость в воде, что может создавать серьезные проблемы для штаммов, способных использовать подобные гидрофобные

соединения в качестве единственного источника углерода и энергии (Cameotra, Singh, 2009). Первым этапом деградации является перенос молекул гидрофобного соединения из гидрофобной фазы на клеточную поверхность для достижения эффективного контакта с клеточной мембраной и дальнейшего переноса через клеточную мембрану внутрь клетки. Несмотря на определенный прогресс в изучении механизмов транспорта *n*-алканов в клетку и их последующей внутриклеточной ассимиляции, некоторые аспекты этого процесса остаются недостаточно изученными.

Еще в прошлом веке Киришнер описал два возможных типа взаимодействия углеводов (УВ) с клеткой: (1) адгезию к гидрофобному субстрату и (2) гипотетическую псевдосолюбилизацию, при которой бактерии, разлагающие УВ, поглощают небольшие порции эмульгированной субстанции (Kischner et al., 1980). В настоящее время опубликованы работы, подтверждающие как первую, так и вторую гипотезы (Cameotra, Singh, 2009).

Согласно первой гипотезе, способность разлагать гидрофобные соединения зависит от свойств поверхности микробной клетки (Stenström, 1989; Deziel et al., 1999). Широко распространенная стратегия, используемая бактериями для преодоления проблемы взаимодействия с нерастворимыми субстратами, заключается в формировании биопленки на границе между углеводородами и водой (Klein et al. 2010; Mounier et al., 2014). Klein et al. (2010) сообщили, что разложение гексадекана культурой *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SP17 происходит за счет образования биопленки на границе алкана и воды. Взаимодействие клеток с алкано-водной фазой исследовалось путем фиксации изменений механических свойств раздела при адсорбции клеток методом тензиометрии. При помещении клеточной суспензии в тензиометрическую ячейку в присутствии капли *n*-гексадекана биопленка, окружающая каплю, была видна после 40-часовой инкубации. Было обнаружено, что, достигнув границы раздела гексадекана–вода, клетки высвобождают поверхностно-активные вещества (ПАВ), что приводит к образованию межфазной вязкоупругой пленки. Выделение этих соединений представляет собой активный процесс, требующий синтеза белка. Было показано, что начальное взаимодействие клетки и гидрофобного соединения не коррелировало со способностью разлагать конкретные алканы, а последующие этапы подвергались дальнейшей регуляции (Klein et al., 2010).

Поскольку превалирует мнение, что для бактерий более физиологично состояние “прикрепленности” к поверхностям, в данном контексте стоит особо отметить несколько работ, отражаю-

щих исследования изменения структуры клеток при адгезии к различным поверхностям.

При исследовании особенностей поверхности клеток *Escherichia coli*, выделенных из проточной воды и осадочных пород, было показано, что клетки штамма из осадочных пород отличались от свободно живущих по гидрофобности (большей), zeta-потенциалу (с более высокой точкой нулевого заряда), поверхностному заряду (менее отрицательному), общей кислотности и составу полимеров внеклеточной субстанции (больше белков и сахаров) (Liang et al., 2016). Авторы обнаружили значительную положительную корреляцию между гидрофобностью и внеклеточными белками у клеток *E. coli* из осадков, но не у свободно живущего штамма.

Narapanahalli et al. (2015a) указывали на важность состава внеклеточного полимерного матрикса (ВПМ) при адгезии клеток к поверхности, проводя различие между понятиями химического и “механочувствительного” механизмов, относя к последнему комплекс реакций выделения внеклеточной полимерной субстанции при адгезии. Исследуя этапы формирования биопленки культурой *Staphylococcus aureus*, эти авторы показали влияние адгезии на экспрессию генов *icaA*, регулирующего выработку компонентов ВПМ, и *cidA*, ассоциированного с клеточным лизисом и высвобождением внеклеточной ДНК (Narapanahalli et al., 2015b). Из проведенных исследований авторы сделали вывод, что сила адгезии модулирует выработку поли-*N*-ацетилглюкозамина, молекул матрикса, выделение внеклеточной ДНК (в-ДНК) и экспрессию гена *icaA*, по-видимому, вследствие деформации клеточной стенки. Эти нано-деформации стенки на уровне слоев пептидогликана играют основную роль в определении силы адгезии.

Используя метод атомно-силовой микроскопии (АСМ), Cheng et al. (2011) также исследовали различные факторы, участвующие в адгезии бактерий к поверхности субстратов. Указывая на недостаток термодинамического анализа поверхности, основанного на определении природы адгезивных взаимодействий, таких как взаимодействия Лифшиц-ван-дер-ваальсовы (Lifshitz-van der Waals) и кислотно-основные, авторы приводят обзор данных, полученных с использованием АСМ, основанной на анализе по Пуассону (Poisson analysis). Суммируя литературные данные по различным комбинациям бактериальных штаммов и субстратов, авторы делают заключение, что бактериальная адгезия к субстратам в основном определяется короткими (кислотно-основными) взаимодействиями, и в меньшей степени длинными (Лифшица и ван-дер-ваальсовыми) взаимодействиями. Это заключение находится в соответствии с данными анализа поверхностной термодинамики при

бактериальной адгезии. По мнению авторов, анализ по Пуассону свидетельствует, что в клеточной адгезии большее значение имеет характеристика дискретных участков бактериальной поверхности, чем отдельные молекулярные взаимодействия. Сила адгезии, возникающая на отдельных участках поверхности, и количество таких участков могут варьировать от штамма к штамму (Chen et al., 2011). Эти же авторы обнаружили микродеформации клеточной поверхности при адгезии бактериальных клеток на твердой поверхности (Chen et al., 2014) и отметили, что адгезия бактерий, являясь одним из важнейших условий их выживания, наблюдается практически ко всем природным и синтетическим поверхностям. Сразу после адгезии бактерии начинают формировать биопленку, в которой они защищены от неблагоприятных воздействий окружающей среды. Изучая с помощью АСМ деформации клеток *Staphylococcus aureus* дикого и мутантного штаммов, Чен и соавт. сделали заключение, что сила бактериальной адгезии определяется не только составом и структурой бактериальной клеточной поверхности, но и малыми деформациями клеточной поверхности, которые приводят к усилению зоны контакта и, соответственно, возрастанию адгезии (Chen et al., 2014).

Как было указано выше, одним из компонентов структуры биопленок является внеклеточная ДНК (в-ДНК) (Narapanahalli et al., 2015b; Regina et al., 2014). Однако имеется очень мало данных о ее роли в начальной клеточной адгезии. Исследуя влияние в-ДНК на адгезию клеток *Staphylococcus xylosum* на абиотических поверхностях, Regina и соавт. (2014) показали, что удаление в-ДНК клеток *S. xylosum* обработкой ДНКазой не изменило их zeta-потенциал, но делало клетки более гидрофильными (Regina et al., 2014). Обработка ДНКазой нарушала адгезию клеток к стеклянной поверхности, при этом в отсутствие ДНКазы адгезивные свойства *S. xylosum* восстанавливались в течение получаса. Удаление в-ДНК влияло на степень адгезии, но не на ионные взаимодействия. При высокой ионной силе эффект отсутствия в-ДНК не сказывался на адгезии клеток на стекле и карбоксил-активированной поверхности. Авторы также показали, что в-ДНК усиливает адгезию клеток на гидрофобных поверхностях вне зависимости от ионной силы. Проведенные исследования позволили сделать заключение, что свойства в-ДНК как медиатора первоначальной адгезии крайне многообразны и зависят от физико-химических свойств самой поверхности и ионной силы окружающей среды (Regina et al., 2014). Результаты, представленные Klein et al. (2010), показывают, что адсорбция *M. hydrocarbonoclasticus* SPI7 на границе фаз *n*-гексадекан–вода связана с понижением межфазного натяжения. Было обнаружено, что ингибирование синтеза белка предотвращает снижение межфаз-

ного натяжения, но не влияет на адсорбцию клеток на границе раздела. Таким образом, адсорбция клеток не оказывает прямого влияния на снижение межфазного натяжения. Более того, когда достигалось равновесие межфазного натяжения, клетки покрывали только 0.3% общей доступной поверхности гексадекана. Был сделан вывод о том, что уменьшение межфазного натяжения, наблюдаемое при адсорбции клеток на границе *n*-гексадекан–вода, было вызвано не адсорбцией клеток, а скорее связано с выделяемыми бактериями ПАВ (Klein et al., 2010).

При проверке второй гипотезы в качестве модельного соединения для исследования взаимодействий микробной клетки и гидрофобных соединений использовали гексадекан. Исследования его разложения очень важны, так как он является одним из компонентов нефти и позволяет установить механизмы деградации УВ и с учетом выявленных особенностей разрабатывать методы очистки окружающей среды от нефтяных загрязнений. Способность разлагать гексадекан характерна для представителей многих классов бактерий, как аэробов, так и анаэробов (табл. 1). На рисунке 1 представлена схема разложения гексадекана штаммом *Pseudomonas aeruginosa* IASSI 201, который из 34 проверенных ростовых субстратов при росте на гексадекане синтезировал биофлокулянт с наивысшей активностью (Pathak et al., 2017).

Разложение линейных алканов в метаногенных условиях является обычным процессом, происходящим в почвах, загрязненных нефтяными продуктами. По данным филогенетического анализа гена 16S р-РНК представители двух филоципов вносят значительный вклад в разложение гексадекана. Один принадлежал к некультивируемым бактериям семейства *Syntrophaceae*, с 95–97%-ной гомологией со *Smithella propionica*, другой был идентифицирован как *Methanoculleus receptaculi* (>99% идентичности) (Cheng et al., 2013).

Три штамма *Acinetobacter* sp. не только разлагали гексадекан, но присутствие этого соединения оказывало положительный эффект на разложение данными бактериями фенола, а комбинация фенола и гексадекана приводила к большим скоростям роста штамма на этих субстратах, чем на каждом по отдельности (Sun et al., 2012). Грамотрицательные бактерии рода *Acinetobacter* являются удобным объектом для исследования, так как, помимо способности разлагать устойчивые токсичные соединения, имеют нитчатые выросты и гидрофобную поверхность клеток, характеризующуюся высокой адгезивной способностью к твердым поверхностям и агглютинацией (Hori et al., 2008). Исследование поведения “лысого” мутанта (T1) штамма *Acinetobacter* sp. Tol 5, лишенного нитча-

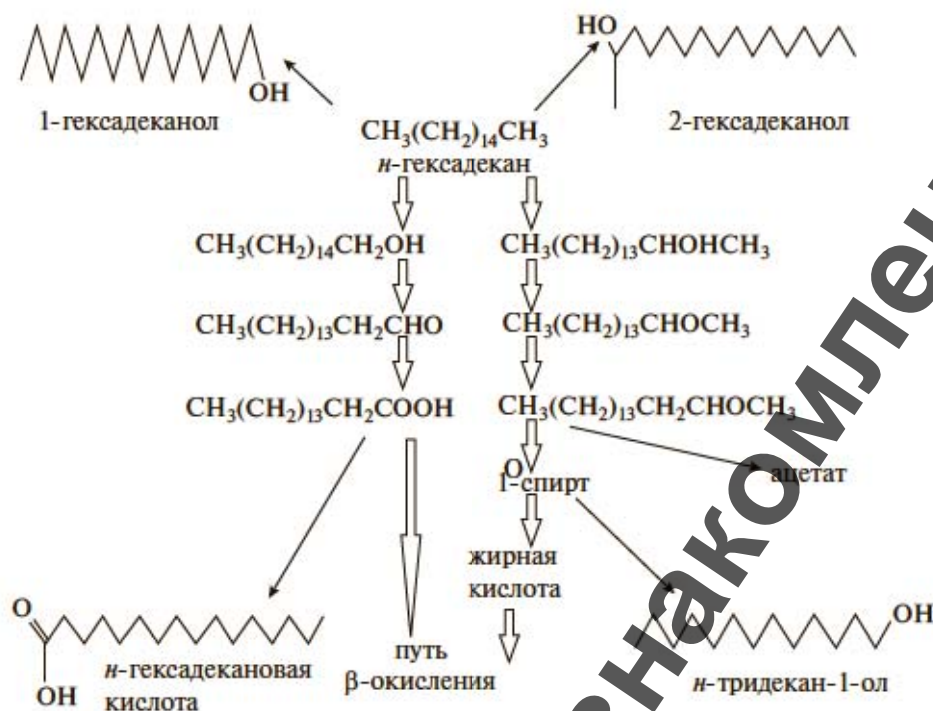


Рис. 1. Схема возможных путей деградации n-гексадекана штаммом *Pseudomonas aeruginosa* IASST201 (Pathak et al., 2017).

тых выростов, в органическом растворителе, суспендированном в водной среде, показало, что клетки мутанта T1 прилипают к капелькам гексадекана в виде монослоя на поверхности капли, тогда как клетки дикого типа образуют агрегаты на поверхностях капель. Клетки T1, адсорбированные на гексадекановых поверхностях, препятствовали слиянию капель, образованных вихревыми потоками, стабилизируя фазу эмульсии. После замены водной фазы свежей чистой водой тест на прикрепление к гидрофобным поверхностям клеток показал, что доля клеток T1, адсорбированных на поверхности капель углеводородов, отсоединенных во время дальнейшего образования вихревых потоков, указывает на обратимую адсорбцию клеток T1. Окончательное соотношение прилипающих к каплям UV клеток к общему числу клеток в тесте отрыва совпало с данными теста на прикрепление (Hogi et al., 2008).

На разложение гексадекана штаммом *Acinetobacter oleivorans* DR1 отрицательно сказывается присутствие хлорида натрия и повышение или понижение оптимальной для роста температуры (Jung et al., 2011). При повышении температуры до 37°C наряду со снижением степени разложения гексадекана наблюдалось ингибирование подвижности клеток и формирования биопленок на границе раздела фаз масло–вода, что может быть критическим фактором, определяющим способ-

ность штамма *A. oleivorans* DR1 разлагать гексадекан (Jung et al., 2011). Положительная корреляция между формированием биопленок и разложением гексадекана наблюдалась при 30°C, снижение температуры до 25°C нарушало ее. В этих условиях изменение гидрофобности клеток и нарушение синтеза ВПМ под действием температуры не коррелировали с формированием биопленки. Авторы обнаружили, что одним из важных факторов деградации гексадекана являются изменения, происходящие в глиоксилатном метаболическом пути. Как показал протеомный анализ, разложение гексадекана сопровождалось высокой экспрессией белков, участвующих в метаболизме жирных кислот, глюконеогенезе и белков защиты от окислительного стресса. По мнению авторов, полученные данные свидетельствуют о том, что разложение гексадекана у *A. oleivorans* DR1 сопряжено с начальными этапами формирования биопленки, защитой клеток от окислительного стресса и переключением метаболизма на глиоксилатный путь (Jung et al., 2011).

Большой объем информации посвящен изучению процессов разложения UV немикелиальными актинобактериями. Показано, что благодаря присутствию миколовых кислот в оболочке *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Mycobacterium* и *Arthrobacter* и коринеформных бактерий, содержащих в клеточной стенке пептидогликан типа B, для них ха-

Таблица 1. Особенности некоторых бактериальных штаммов, способных разлагать гексадекан

Штамм	Особенности утилизации УВ	Литературный источник
<i>Acinetobacter beijerinckii</i> ZRS	Продуцент нового внеклеточного эмульсификатора, стабильного в широком диапазоне значений pH, при высокой температуре и высокой концентрации солей (до 5% [в./об.] Na ¹⁺ и 24% Ca ²⁺)	Zhao et al., 2016
<i>Acinetobacter</i> sp. штамм DR1	Исследовано влияние процесса пленкообразования на разложение гексадекана	Kang, Park, 2010
<i>Alcanivorax borkumensis</i> SK2	Штамм <i>A. borkumensis</i> способен не только включать, но и модифицировать промежуточные соединения жирных кислот в процессе разложения алканов. Для штамма характерен необычный адаптивный механизм к токсичным органическим растворителям, заключающийся в <i>цис-транс</i> -изомеризации ненасыщенных жирных кислот	Naether et al., 2013
<i>Dietzia</i> штамм DMYR9	Авторами применена методология поверхностной реакции для статистического проектирования параметров сухого веса для производства биомассы в процессе деградации	Zhou et al., 2013
<i>Gordonia ajouococcus</i> A2 ^T	Синтез каротиноидов при росте на <i>n</i> -алканах	Kim et al., 2014
<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> SP17	Обнаружен белок MARHY0478, характерный исключительно для морских бактерий, разрушающих алканы; предположительно входит в семейство алкановых транспортёров, специфичных для морских бактерий	Vaysse et al., 2009
<i>Nocardia farcinica</i> BN26	Трегалозолипидный тетраэфир обладает антипролиферативной активностью против некоторых клеточных линий опухолей человека	Christova et al., 2015
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PSA5 <i>Rhodococcus</i> sp. NJ2 <i>Ochrobactrum intermedium</i> P2	Определена активность алкангидроксилазы, алкогольдегидрогеназы и липазы. Характерен высокий уровень гидрофобности клеточной поверхности. Обнаружены тельца включения, содержащие УВ	Mishra, Singh, 2012
<i>P. aeruginosa</i> NY3	Определен уровень активности <i>alkB1</i> и <i>alkB2</i> генов. Глутаровая кислота значительно увеличивала степень деструкции гексадекана	Nie et al., 2017

рактерна гидрофобность клеточной поверхности, которая обуславливает способность этих бактерий адсорбироваться на тефлоне, стекле и других поверхностях, что коррелирует со способностью разлагать гидрофобные соединения (Bendinger et al., 1993). На примере бактерий рода *Rhodococcus* показано, что адгезивная способность немитотических актинобактерий зависит от внешних факторов, таких как состав среды, уровень хлорида натрия, температура, значение pH среды, что влияет на липидный состав клетки, ее гидрофобность и zeta-потенциал (Рубцова и соавт., 2012).

Способность разлагать гексадекан также показана для штаммов *Pseudomonas aeruginosa* PSA5, *Rhodococcus* sp. NJ2 и *Ochrobactrum intermedium* P2, выделенных из нефтяных осадков (Mishra, Singh, 2012).

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ РАЗЛОЖЕНИЯ ГЕКСАДЕКАНА

Информация, касающаяся ферментов разложения длинноцепочечных алканов, особенно у грамположительных бактерий, достаточно ограничена (Lo Piccolo et al., 2011), хотя аккумуляция данных в последние годы происходит высокими темпами. Это связано с применением молекулярно-биологических методов исследований. Процесс деструкции гексадекана сопровождался индукцией синтеза ферментов алкангидроксилазы и алкогольдегидрогеназы у штамма *Rhodococcus* sp. NJ2, и липазы у штамма *P. aeruginosa* PSA5. Особенностью этих бактерий при росте на гексадекане было формирование телец включения, содержащих этот УВ, в концентрации до 60.8 г/л у штамма *P. aeruginosa* PSA5, 56.1 г/л у *Rhodococcus*

sp. NJ2 и до 51.6 г/л у *O. intermedium* P2 (Mishra, Singh, 2012). Еще один представитель актинобактерий, штамм *R. opacus* R7, способен расти на нафталине, *o*-ксилоле и нескольких длинно- и среднецепочечных *n*-алканах (Zampolli et al., 2014). При исследовании способности этого штамма разлагать гексадекан и ряд других алканов было показано, что степень разложения *n*-додекана (C_{12}) составила 88%, *n*-гексадекана (C_{16}) – 69%, *n*-эйкозана (C_{20}) – 51%, *n*-тетракозана (C_{24}) – 78%. Авторы обнаружили, что в случае среднецепочечных *n*-алканов сначала происходит образование первичного спирта – окисление одной терминальной метильной группы. Этим штамм *R. opacus* R7 отличался от других родококков, для которых было характерно образование двух спиртовых групп (Zampolli et al., 2014). Система деградации *n*-алканов была исследована для штамма *Gordonia* sp. SoCg, способного расти на *n*-алканах с длиной цепи от C_{12} (додекан) до C_{36} (гексатриоконтан) в качестве единственного источника углерода (Lo Piccolo et al., 2011). Авторы обнаружили, что штамм SoCg содержит в своей хромосоме один алк-локus с шестью открытыми рамками считывания (ORF), который имеет 78–79% идентичности с алкангидроксилазной системой других алканоразрушающих актинобактерий. Количественная обратная транскрипция-ПЦР показала, что гены, кодирующие AlkB (алкан 1-монооксигеназа), RubA3 (rubredoxin), RubA4 (rubredoxin) и RubB (rubredoxin редуктаза), индуцировались как *n*-гексадеканом, так и *n*-триаконтаном, которые были выбраны в качестве представителей длинноцепочечных жидких и твердых *n*-алканов соответственно (Lo Piccolo et al., 2011). Монооксигеназа LadA, катализирующая окисление *n*-алканов в 1-алканола, является ключевым ферментом деградации длинноцепочечных алканов (C_{15} – C_{36}) у штамма *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2 (Dong et al., 2012). Проведение случайного и сайт-направленного мутагенеза позволило авторам получить ряд мутантов с измененными свойствами монооксигеназы LadA. Было показано, что штамм *Pseudomonas fluorescens* KOB2Δ1 с мутантным белком LadA рос быстрее дикого штамма. Таким образом, путем изменения одного из ферментов деградации алканов была показана возможность создания штаммов с более высоким потенциалом в целях очистки окружающей среды от нефтезагрязнений.

Ген *alkB* из *Gordonia* SoCg был гетерологично экспрессирован в *E. coli* BL21 и *Streptomyces coelicolor* M145, и оба хозяина приобрели способность превращать *n*-гексадекан в 1-гексадеканол, но соответствующий длинноцепочечный спирт не был обнаружен при культивировании штаммов на *n*-триаконтане. Рекомбинантный штамм *S. coelicolor* M145-АН, экспрессирующий ген алкоксида из

Gordonia, мог расти на *n*-триаконтане в качестве единственного источника углерода. Мутант штамма SoCg с нарушением в гене *alkB* полностью терял способность расти на *n*-триаконтане, что указывает на участие системы алканмонооксигеназы AlkB-типа в деградации твердых *n*-алканов (Lo Piccolo et al., 2011). Помимо штамма *Gordonia* sp. SoCg (Lo Piccolo et al., 2011), гомологи гена *alkB* были амплифицированы из психротрофного штамма *Rhodococcus* sp. Q15 (White et al., 2002) и *R. opacus* B4 (Sameshima et al., 2008).

Большого внимания заслуживает исследование биodeградации сырой нефти и, соответственно, ее отдельных компонентов бактериями в условиях метаногенеза, так как данная активность приводит к потерям этого природного сырья, с одной стороны, а с другой – позволяет ликвидировать последствия аварийных разливов нефти в анаэробных условиях. Известно, что в анаэробных условиях углеводороды чрезвычайно устойчивы к микробному воздействию, так как для начальной активации и разрыва аполярной C–H связи надо преодолеть высокий энергетический барьер (Rabus et al., 2016). Как отмечают Рабус и соавт., анаэробная деградация углеводородов включает в себя множество интригующих биохимически беспрецедентных реакций, таких как взаимодействие толуола или *n*-алканов с фумаратом, O_2 -независимое гидроксильное этилбензола и АТФ-зависимые и АТФ-независимые варианты восстановительной деароматизации центрального промежуточного бензоил-CoA (Rabus et al., 2016). Тос и Гииг (Toth, Gieg, 2018) провели работу по установлению механизмов активации углеводородов и идентификации находящихся в месте естественного глубокого залегания нефти микроорганизмов, которые, возможно, способствуют образованию биоразлагаемого масла. Авторы провели мониторинг генов *assA* и *bssA*, кодирующих алкилсукцинатсинтазу при разложении алканов и бензилсукцинатсинтазу – алкилбензолов соответственно, а также секвенирование гена 16S рРНК для оценки состава микробного сообщества и изменений активности ферментов в течение 17 мес. Эти гены были выбраны не случайно, так как именно линейные алканы и алкил-замещенные ароматические соединения, как было показано, являются наиболее легко биоразлагаемыми молекулами УВ сырой нефти и других топливных смесей в метаногенных условиях. Было обнаружено образование переходных метаболитов УВ и идентифицированы штаммы, участвующие в этих процессах (*Desulfotomaculum*, *Smithella*, *Syntrophus*, метаногенные археи и представители классов *Atribacteria*, *Cloacimonetes*). Результаты этого исследования подтвердили полученные ранее данные, согласно которым добавление фумарата является возможным анаэробным активирующим механизмом для трансформации *n*-алканов и алкилзамещен-

ных ароматических соединений в метаногенных условиях.

Сравнительный транскриптомный анализ был проведен с использованием клеток штамма *Rhodococcus erythropolis* PR4, выращенных на гексадекане, дизельном топливе и ацетате (Laczi et al., 2015). Авторы показали увеличение синтеза двух генов, кодирующих алкан-1-монооксигеназу. Наряду с этим при росте клеток на дизельном топливе повышалась транскрипция 8 филогенетически различных генов, кодирующих цитохром P450. При росте *R. erythropolis* PR4 на синтетической смеси гексадекана, циклопарафина и ароматических соединений наблюдалась индукция генов, кодирующих различные оксигеназы. При этом происходило снижение транскрипции гена, кодирующего синтазу I, участвующую в синтезе жирных кислот, а также генов, участвующих в синтезе сидерофоров, транспорта железа и синтеза экзополисахаридов. Полученные данные указывают на важную роль генов оксигеназ в метаболизме углеводов.

Транскриптомный профиль генов, участвующих в разложении гексадекана, был исследован у штамма *Dietzia cinnamea* P4, выделенного из образцов, загрязненных нефтью (Procsório et al., 2013). Аннотирование генома этого штамма позволило выявить гены, участвующие в разложении алканов. Результаты количественной ПЦР в реальном времени однозначно показали, что на ранних стадиях роста штамма *D. cinnamea* P4 на алканах происходила индукция регуляторного гена *alkU* (TetR-семейства). В логарифмической фазе роста наблюдалось увеличение уровня транскрипции генов липидного транспорта, а также гена белка, отвечающего за взаимодействие рубредоксина и алканмонооксигеназы, которые, по мнению авторов, также могут находиться под действием регулятора *AlkU* (Procsório et al., 2013).

С использованием транскриптомного анализа изучали клеточный ответ почвенного штамма *Acinetobacter oleivorans* DR1, деструктора дизельного топлива и алканов, на внесение гексадекана и механизмы стимулирования разложения гексадекана воздействием красной глины (Jung et al., 2011). Авторы показали, что уровень экспрессии генов, связанных с окислением алканов, был на высоком уровне и без добавления красной глины. Внесение глины в суспензию клеток DR1, разлагающих гексадекан, повышало уровень индукции генов β -окисления и генов, относящихся к защите от окислительного стресса, таких как супероксиддисмутаза, каталаза, глутаредоксина. Это указывало на то, что красная глина поддерживает ответ клеток DR1 на окислительный стресс, возникающий при разложении гексадекана.

Проведенное сравнение данных транскриптомного анализа геномов, полученных из биоэле-

ментов *M. hydrocarbonoclasticus* SP17, выращиваемых на *n*-гексадекане или триолеине, и из планктонных клеток, экспоненциально растущих на ацетате, подтвердили, что рост биопленки на каждом гидрофобном соединении включал различные специфические генетические ответы вместе с набором генов, опосредующих общие механизмы формирования биопленок (Mounier et al., 2014). По данным авторов, рост биопленки на триолеине модулировал экспрессию сотен генов по сравнению с *n*-гексадеканом. При этом наблюдалось снижение активности процессов, связанных с первичным метаболизмом и обработкой генетической информации.

Таким образом, использование транскриптомного анализа позволяет выявить комплексный ответ клеток на действие гидрофобного соединения как субстрата с учетом не только взаимодействия клетки и субстрата, но и всех опосредованных этим этапом отдаленных последствий.

РОЛЬ БИОПАВ В РАЗЛОЖЕНИИ ГИДРОФОБНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Исследования показали, что важную роль в бактериальной деструкции гидрофобных субстратов играет способность клеток образовывать поверхностно-активные соединения (ПАВ), биосурфактанты (биоПАВ). БиоПАВ представляют собой разнообразную по химическому составу группу соединений. Как правило, их гидрофобная часть представлена длинноцепочечными жирными кислотами, гидроксилированными жирными кислотами или α -алкил- β -гидроксид-жирными кислотами, а гидрофильная часть – углеводами, аминокислотами, пептидами, фосфатами, карбоксикислотами или спиртами (Rosenberg, Ron, 1999). В зависимости от своей химической структуры биоПАВ можно разделить на пять групп: гликолипиды, липопептиды, фосфолипиды, жирные кислоты и полимерные смеси (Rosenberg, Ron, 1999; Mao et al., 2015). Биосурфактанты можно классифицировать как ионные и неионные. Их также подразделяют на низкомолекулярные соединения, снижающие поверхностное натяжение, и высокомолекулярные биоэмульгаторы, которые прочно связываются с поверхностью и не всегда снижают поверхностное натяжение (Rosenberg, Ron, 1999). К наиболее распространенным биоПАВ относятся гликолипиды, состоящие из углеводной головки и липидного хвоста, к ним относят трегалолипиды, софоролипиды и рамнолипиды. Трегалоллипиды представляют собой гликолипиды, продуцируемые в основном бактериями родов *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Arthrobacter*, *Nocardia*, *Gordonia* (Rosenberg, Ron, 1999; Christova et al., 2015). К липопептидам относятся сурфактин, грамицидин S и полимиксин (Rosenberg, Ron, 1999). Биосурфак-

танты микроорганизмов и водорослей, представленные гликолипидами, фосфолипидами, липопептидами, натуральными липидами, жирными кислотами и липополисахаридами, применяются в ряде промышленных производств, таких как пищевая промышленность, фармакология, биоремедиация нефтезагрязненных участков (Panigagua-Michel et al., 2014). Биосурфактанты, обычно используемые для восстановления почвы, включают гликолипиды (например, рамнолипиды, фруктозные липиды, софоролипиды), липопептиды (например, сурфактин, полимиксин) и гуминовые вещества (Mao et al., 2015). Как наибо-

лее распространенное естественное органическое вещество, гуминовые кислоты (ГК) проявляют амфифильные свойства, которые могут быть использованы в качестве экологически чистых биосурфактантов (Mao et al., 2015). Роль биоэмульгаторов заключается в увеличении площади поверхности гидрофобных нерастворимых в воде субстратов роста; в повышении биодоступности гидрофобных субстратов за счет увеличения их кажущейся растворимости или десорбирования субстратов с поверхностей, а также регулирования прикрепления и десорбции микроорганизмов с поверхностей (Rosenberg, Ron, 1999). В

Таблица 2. Биосурфактанты бактериального происхождения

Клас биосурфактанта	Микробный источник	Литературный источник
Рамнолипиды	<i>Pseudomonas</i> ; <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Cameotra, Singh, 2009; Arelli et al., 2018
Липопептиды Viscosin, massetolide A, putisolvin, amphisin	<i>Pseudomonas</i> spp.	Bak et al., 2015
Трегалолипиды (низкомолекулярные, высокомолекулярные)	<i>Rhodococcus</i> sp. <i>Rhodococcus erythropolis</i> EK-1 <i>Nocardia farcinica</i> B-26	White et al. 2013; Inaba et al. 2013 Пирог и соавт., 2010 Christova et al., 2015
Эмульгатор, липидный фрагмент которого содержал смесь жирных кислот в молярном соотношении: каприловая кислота 18.85, миристиновая кислота 1.0, пальмитиновая кислота 9.68, пальмитоловая кислота 5.69 и олеиновая кислота 1.26. Полисахаридная часть также содержала смесь сахаров со следующим молярным соотношением: манноза 1.71, галактоза 1.00 и глюкоза 2.96.	<i>Halomonas</i> sp. ANT-3b, антарктическая психротрофная бактерия	Pepi et al., 2005
Комплексе углеводов (41.1%), липидов (47.6%) и белков (11.3%)	<i>Aeribacillus pallidus</i> YM-1	Zheng et al., 2012
Комплексе белок–полисахарид–липид	<i>Methanobacterium thermoautotrophicus</i>	Rosenberg, Ron, 1999
Углевод–белковый комплекс	<i>Bacillus stearothermophilus</i> и <i>Candida lipolytica</i>	Rosenberg, Ron, 1999
Экзополисахариды	<i>Rhodococcus</i> sp. <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Paenibacillus</i> spp.	Urai et al. 2007a, 2007b; Perry et al. 2007 Hua et al., 2010 Liang, Wang, 2015
Белковый комплекс (биоэмульгатор)	<i>Halomonas eurihalina</i> , <i>Pseudomonas tralucida</i>	Rosenberg, Ron, 1999
Эмульсан (комплексе анионного гетерополисахарида и белка)	<i>Acinetobacter</i> spp.	Rosenberg, Ron, 1999
Комплексе олигосахарида и липида	<i>Paenibacillus</i> sp.	Gudiña et al., 2015
Alasan (комплексе анионного гетерополисахарида и ковалентно связанных аланина и белков)	<i>Acinetobacter radioresistens</i>	Navon-Venezia et al., 1995

табл. 2 приведен список некоторых биосурфактантов, синтезируемых бактериями.

Известно, что бактерии рода *Pseudomonas* синтезируют сильнодействующие биосурфактанты, относящиеся к классу липопротеинов, в том числе вискозин, массетилипид А, путизолвин и амфизин (Bak et al., 2015). Действие липопротеинов, синтезируемых псевдомонадами, по эмульгирующей способности сопоставимо с действием синтетического ПАВ Tween 80. Cameotra, Singh (2009) исследовали синтез ПАВ и разложение *n*-гексадекана штаммом *Pseudomonas* sp. и показали, что этот штамм, выделенный из почв, загрязненных нефтью, синтезировал ПАВ в виде рамнолипидов, представленных 13 изомерами. Синтез ПАВ позволял культуре эмульгировать гексадекан до размера менее чем 0,22 мкм. Это значительно повышало его доступность для клеток, что было подтверждено микроскопическими исследованиями. Авторы показали, что ПАВ образовывал с гексадеканом эмульсию, что усиливало контакт между этим соединением и клетками штамма-деструктора. Было отмечено поглощение насыщенной биосурфактантами углеводородной капельки, что предполагает механизм, похожий по внешнему виду на активный пиноцитоз, факт, ранее не наблюдавшийся в бактериальных системах для поглощения углеводородов. Таким образом, обсуждаемое исследование проливает свет на механизм поглощения углеводородов у бактерии *P. aeruginosa*. Синтез ПАВ был показан также у штаммов *P. aeruginosa* PSA5, *Rhodococcus* sp. N12 и *Ochrobactrum intermedium* P2, выделенных из нефтяных осадков, при разложении гексадекана (Mishra, Singh, 2012). Бактерии рода *Rhodococcus* для снижения поверхностного натяжения и повышения биодоступности гидрофобных соединений синтезируют различные ПАВ: низкомолекулярные трегалолипиды (White et al., 2013; Inaba et al., 2013), высокомолекулярные экзополисахариды (Urai et al., 2007a, 2007b; Perry et al., 2007). При этом концентрация внеклеточных ПАВ может достигать 7 г/л, что было показано для штамма *R. erythropolis* ЕК-1, растущего на гексадекане (Пирог и соавт., 2011). Величина поверхностного натяжения минеральной среды с компонентами нефти под действием синтезируемых ПАВ псевдомонад и родококков снижается до значений 26–36 мН/м (Franzetti et al., 2010; Petrikov et al., 2013). Например, штамм *Rhodococcus* sp. PLM026 синтезировал трегалолипиды в концентрации до 300 мг/л, что сопровождалось снижением поверхностного натяжения до 29 мН/м (White et al., 2013). Концентрат сукцинилтретгалозолипидов из культуральной жидкости бактерий *R. wratislaviensis* BN38 и *Rhodococcus* sp. SD74 снижал поверхностное натяжение до величин 24 и 19 мН/м соответственно (Tuleva et al., 2008; Tokumoto et al., 2009). Величина поверхностного натяжения меж-

ду *n*-гексадеканом и суспензией клеток *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 уменьшалась с 38 мН/м до выхода на плато около 18 мН/м за 250 мин культивирования в синтетической морской воде за счет синтеза ПАВ (Klein et al., 2010).

При исследовании влияния монорамнолипида на разложение гексадекана грибом *Candida tropicalis* было показано, что повышение концентрации монорамнолипида до определенных значений стимулирует разложение гексадекана и оказывает негативное влияние на его дегградацию при повышении концентрации до 114 мг/л (Zeng et al., 2011). Возможно, этот эффект связан со снижением биодоступности гексадекана, вызванной образованием мицелл. Авторы отмечают, что присутствие монорамнолипида изменяет свойства клеточной поверхности, что выражается в увеличении ее гидрофобности, снижении zeta-потенциала клеточной поверхности, изменения FT-IR спектра клеточной оболочки (Zeng et al., 2011). Полученные результаты указывают на положительный эффект внесения монорамнолипида на биоремедиацию углеводородов.

В случае, когда синтез биосурфактантов не происходит, может иметь место прямой контакт клеток с капельками углеводородов путем строгомежфазного поглощения углеводородов (Bouchez-Naitali et al., 2001). Как пример, исследована кинетика разложения гексадекана у 4 штаммов вида *Rhodococcus equi*, не синтезирующих биосурфактанты (Bouchez-Naitali et al., 2001). Авторы проводили непрерывное измерение электролитической респирометрии в двухфазной системе, в которой гидрофобной фазой были гексадекан или раствор гексадекана в нетоксичном, но не разлагаемом растворителе, 2,2,4,4,6,8,8-гептаметилнонаноле, а также силиконовое масло. Удельные скорости роста в короткой экспоненциальной фазе варьировали у штаммов от 0,11 до 0,20 ч⁻¹ и не зависели от межфазной поверхности в соответствии с очень сильной адсорбцией бактериальных клеток на границе растворителя и водной сред. Скорость дегградации при линейном росте не увеличивалась при возрастании межфазной площади, но повышалась при повышении эффективности перемешивания. Эти особенности авторы объясняют формированием многоклеточных хлопьев, обусловленным гидрофобностью клеток штаммов. Хлопьевидный рост наблюдался при росте родококков на гексадекане практически при всех условиях. Результаты показывают, что строгое межфазное поглощение, ограниченное формированием хлопьев, происходящее при умеренной и более высокой плотности клеток и контролируемое эффективностью перемешивания, является общей картиной для роста микроорганизмов, не продуцирующих биосурфактанты, на длинноцепочечных алканах (Bouchez-Naitali et al., 2001).

Для восстановления загрязненных участков от нефтяных разливов применяют физические, химические или биологические технологии (Agarwal, Liu, 2015). Одной из самых быстрых технологий для удаления топливных компонентов и восстановления естественной почвы, осадков или песка считается технология промывки. Однако эффективность данной технологии зависит от использования синтетических ПАВ (Mao et al., 2015). В результате образуются сточные воды, содержащие не только исходный загрязнитель, но и синтетические ПАВ, которые зачастую очень устойчивы к разложению и наносят не меньший вред окружающей среде, чем исходные загрязняющие соединения. Поэтому одним из направлений современной биотехнологии очистки является поиск ПАВ природного происхождения, которые могут служить альтернативой используемым синтетическим ПАВ, благодаря своей высокой биоразлагаемости и меньшей токсичности. В обзорах Paria и Mao и соавт. суммируются данные по применяемым синтетическим и биогенным ПАВ (Paria, 2008; Mao et al., 2015). Авторы отмечают, что биосурфактанты растительного, животного или микробного происхождения могут действовать на гидрофобные загрязнители в качестве поверхностно-активных веществ, то есть путем образования мицелл или усиленного растворения в водных средах без образования мицелл (например, циклодекстрины). Некоторые из этих соединений уже показали свою эффективность, превосходящую или сравнимую с синтетическими поверхностно-активными веществами, такими как Tween 80, Triton X-100 или SDS (Mao et al., 2015). Микробные сурфактанты, рамнолипиды из культур *Pseudomonas aeruginosa* и софоролипиды из культур *Candida bombicola* ATCC 22214, наравне с другими ПАВ биологического и химического происхождения, были протестированы в технологии отмывки песка от загрязнителей (Arelli et al., 2018).

Биофлокулянт, синтезируемый бактериями *P. aeruginosa* штамм IASST201, растущими на гексадекане, был протестирован на способность извлекать тяжелые металлы (Pathak et al., 2017). Данный биофлокулянт состоял из углеводовных мономеров и белка в соотношении 89.4 и 6.2%, соответственно, и удалял ионы тяжелых металлов (Ni^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} и Pb^{2+}) из водных растворов в концентрациях 1–50 мг/л. Наибольшая активность биофлокулянта наблюдалась с Ni^{2+} при эффективности биофлокуляции $79.29 \pm 0.12\%$ (Pathak et al., 2017).

Таким образом, биосурфактанты и биоэмульгаторы, вырабатываемые микроорганизмами в определенных условиях культивирования, не только способствуют биодegradации гидрофобных соединений, но, выделенные из культураль-

ной жидкости, могут конкурировать с синтетическими ПАВ, заменяя последние в технологиях очистки окружающей среды от различных загрязнителей.

Анализ литературы, посвященной бактериальному разложению гидрофобных соединений, демонстрирует прогресс, достигнутый в изучении различных аспектов деградации гидрофобных субстратов микроорганизмами. (1) В исследованиях процессов разложения бактериями гидрофобных соединений важное место занимает этап взаимодействия бактериальной клетки с гидрофобным субстратом. В первую очередь это касается характеристик клеточной поверхности. Наиболее интересными результатами можно считать данные о конформационных изменениях, происходящих при контакте клетки с нерастворимым субстратом. (2) В последние годы, благодаря применению таких методов, как транскриптомный анализ, ПЦР в реальном времени, двумерный гель-электрофорез, идет интенсивное накопление информации, касающейся не только молекулярных основ разложения конкретных слаборастворимых или нерастворимых соединений. Комплексная оценка позволяет выявить все этапы взаимодействия клетки и субстрата, непосредственно вовлеченные в процесс биодеструкции, а также процессы, связанные с ростом бактерий на гидрофобных субстратах. (3) Не менее важна информация, касающаяся синтеза поверхностно-активных веществ бактериями в процессе разложения гидрофобных соединений, их разнообразия, структуры и условий повышения их биосинтеза, что позволит заменять синтетические ПАВ биосурфактантами, оказывающими менее токсичное влияние на окружающую среду.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Pirog T.P., Shevchuk T.A., Klimenko Yu.A. Интенсификация синтеза поверхностно-активных веществ при культивировании *Rhodococcus erythropolis* EK-1 на гексадекане // Прикл. биохимия и микробиология. 2010. Т. 46. № 6. С. 651–658.
- Pirog T.P., Shevchuk T.A., Klimenko Iu.A. Intensification of surfactant synthesis in *Rhodococcus erythropolis* EK-1 cultivated on hexadecane // Appl. Biochem. Microbiol. 2010. V. 46. P. 599–606.
- Пирог Т.П., Игнатенко С.В. Масштабирование процесса биосинтеза поверхностно-активных веществ *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1 на гексадекане // Прикл. биохимия и микробиология. 2011. Т. 47. № 4. С. 436–442.
- Pirog T.P., Ignatenko S.V. Scaling of the process of biosynthesis of surfactants by *Rhodococcus erythropolis* EK-1 on hexadecane // Appl. Biochem. Microbiol. 2011. V. 47. P. 393–399.
- Рубцова Е.В., Кулюкина М.С., Ившина И.Б. Влияние условий культивирования на адгезивную активность родококков к *n*-гексадекану // Прикл. биохимия и микробиология. 2012. Т. 48. № 5. С. 501–509.

- Rubtsova E.V., Kuiuikina M.S., Ivshina I.B. Effect of cultivation conditions on the adhesive activity of rhodococci towards *n*-hexadecane // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2012. V. 48. P. 452–459.
- Agarwal A., Liu Y. Remediation technologies for oil-contaminated sediments // *Mar. Pollut. Bull.* 2015. V. 101. P. 483–490.
- Arelli A., Nuzzo A., Sabia C., Banat I.M., Zancarolia G., Fava F. Optimization of washing conditions with biogenic mobilizing agents for marine fuel-contaminated beach sands // *New Biotechnol.* 2018. V. 43. P. 13–22.
- Atlas R.M., Hazen T.C. Oil biodegradation and bioremediation: a tale of the two worst spills in U.S. history // *Environ. Sci. Technol.* 2011. V. 45. P. 6709–6715.
- Bak F., Bonnichsen L., Jørgensen N.O., Nicolaisen M.H., Nybroe O. The biosurfactant viscosin transiently stimulates *n*-hexadecane mineralization by a bacterial consortium // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2015. V. 99. P. 1475–1483.
- Bendinger B., Rijnaarts H.H., Altendorf K., Zehnder A.J. Physicochemical cell surface and adhesive properties of coryneform bacteria related to the presence and chain length of mycolic acids // *Appl. Environ. Microbiol.* 1993. V. 59. P. 3973–3977.
- Bouchez-Naitali M., Blanchet D., Bardin V., Vandecasteele J.P. Evidence for interfacial uptake in hexadecane degradation by *Rhodococcus equi*: the importance of cell flocculation // *Microbiology (SGM)*. 2001. V. 147. P. 2537–2543.
- Cameotra S.S., Singh P. Synthesis of rhamnolipid biosurfactant and mode of hexadecane uptake by *Pseudomonas* species // *Microb. Cell Fact.* 2009. V. 8. P. 16. doi 10.1186/1475-2859-8-16
- Chen Y., Busscher H.J., van der Mei H.C., Norde W. Statistical analysis of long- and short-range forces involved in bacterial adhesion to substratum surfaces as measured using atomic force microscopy // *Appl. Environ. Microbiol.* 2011. V. 77. P. 5065–5070.
- Chen Y., Harapanahalli A.K., Busscher H.J., Norde W., van der Mei H.C. Nanoscale cell wall deformation impacts long-range bacterial adhesion forces on surfaces // *Appl. Environ. Microbiol.* 2014. V. 80. P. 637–643.
- Cheng L., Ding C., Li Q., He Q., Dai L.R., Zhang H. DNA-SIP reveals that *Syntrophaceae* play an important role in methanogenic hexadecane degradation // *PLoS ONE*. 2013. V. 8. e 66784. doi 10.1371/journal.pone.0066784
- Christova N., Lang S., Wray V., Kaloyanov K., Konstantinov S., Stoineva I. Production, structural elucidation, and *in vitro* antitumor activity of trehalose lipid biosurfactant from *Nocardia farcinica* strain // *J. Microbiol. Biotechnol.* 2015. V. 25. P. 439–447.
- Deziel E., Comeau Y., Villemur R. Two-liquid-phase bioreactors for enhanced degradation of hydrophobic/toxic compounds // *Biodegradation*. 1999. V. 10. P. 219–233.
- Dong Y., Yan J., Du H., Chen M., Ma T., Feng L. Engineering of LadA for enhanced hexadecane oxidation using random- and site-directed mutagenesis // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2012. V. 94. P. 1019–1029.
- Franzetti A., Gondolfi I., Bestetti G., Smyth T.J.P., Banat I.M. Production and applications of trehalose lipid biosurfactants // *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2010. V. 112. P. 617–627.
- Gudiña E.J., Pereira J.F., Costa R., Evtuguin D.V., Coutinho J.A., Teixeira J.A., Rodrigues L.R. Novel bioemulsifier produced by a *Paenibacillus* strain isolated from crude oil // *Microb. Cell Fact.* 2015. V. 14. P. 14. doi 10.1186/s12934-015-0197-5
- Harapanahalli A.K., Younes J.A., Allan E., van der Mei H.C., Busscher H.J. Chemical signals and mechanosensing in bacterial responses to their environment // *PLoS Pathog.* 2015a. V. 11. e1005057. doi 10.1371/journal.ppat.1005057
- Harapanahalli A.K., Chen Y., Li J., Busscher H.J., van der Mei H.C. Influence of adhesion force on *ladA* and *cidA* gene expression and production of matrix components in *Staphylococcus aureus* biofilms // *Appl. Environ. Microbiol.* 2015b. V. 81. P. 3369–3378.
- Hori K., Watanabe H., Ishii S., Tanji Y., Unno H. Monolayer adsorption of a “bald” mutant of the highly adhesive and hydrophobic bacterium *Acinetobacter* sp. strain Tol 5 to a hydrocarbon surface // *Appl. Environ. Microbiol.* 2008. V. 74. P. 2511–2517.
- Hua X., Wu Z., Zhang H., Lu D., Wang M., Liu Y., Liu Z. Degradation of hexadecane by *Enterobacter cloacae* strain TU that secretes an exopolysaccharide as a bioemulsifier // *Chemosphere*. 2010. V. 80. P. 951–956.
- Inaba T., Tokumoto Y., Miyazaki Y., Inoue N., Maseda H., Nakajima-Kambe T., Uchiyama H., Nomura N. Analysis of genes for succinyl trehalose lipid production and increasing production in *Rhodococcus* sp. strain SD-74 // *Appl. Environ. Microbiol.* 2013. V. 79. P. 7082–7090.
- Jung J., No J., Park W. Physiological and metabolic responses for hexadecane degradation in *Acinetobacter oleivorans* DR1 // *J. Microbiol.* 2011. V. 49. P. 208–215.
- Kang Y.S., Park W. Contribution of quorum-sensing system to hexadecane degradation and biofilm formation in *Acinetobacter* sp. strain DR1 // *J. Appl. Microbiol.* 2010. V. 109. P. 1650–1659.
- Kim J.H., Kim S.H., Yoon J.H., Lee P.C. Carotenoid production from *n*-alkanes with a broad range of chain lengths by the novel species *Gordonia ajoucoccus* A2(T) // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2014. V. 98. P. 3759–3768.
- Kirscher Z.I., Rosenberg E., Gutnic D. Incorporation of ³²P and growth of *Pseudomonad* UP-2 on *n*-tetracosane // *Appl. Environ. Microbiol.* 1980. V. 40. P. 1086–1093.
- Klein B., Bouriat P., Goulas P., Grimaud R. Behavior of *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SP17 cells during initiation of biofilm formation at the alkane-water interface // *Biotech. Bioeng.* 2010. V. 105. P. 461–468.
- Kvenvolden K.A., Cooper C.K. Natural seepage of crude oil into the marine environment // *Geo-Mar. Lett.* 2003. V. 23. P. 140–146.
- Lacz K., Kis Á., Horváth B., Maróti G., Hegedüs B., Perei K., Rákhely G. Metabolic responses of *Rhodococcus erythropolis* PR4 grown on diesel oil and various hydrocarbons // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2015. V. 99. P. 9745–9759.
- Liang X., Liao C., Thompson M.L., Soupir M.L., Jarboe L.R., Dixon P.M. *E. coli* surface properties differ between stream water and sediment environments // *Front. Microbiol.* 2016. V. 7. P. 1732.
- Liang T.W., Wang S.L. Recent advances in exopolysaccharides from *Paenibacillus* spp.: production, isolation, structure, and bioactivities // *Mar. Drugs*. 2015. V. 13. P. 1847–1863.
- Lo Piccolo L., De Pasquale C., Fodale R., Puglia A.M., Quatrini P. Involvement of an alkane hydroxylase system of *Gordonia* sp. strain SoCg in degradation of solid *n*-alkanes // *Appl. Environ. Microbiol.* 2011. V. 77. P. 1204–1213.

- Mao X, Jiang R, Xiao W, Yu J. Use of surfactants for the remediation of contaminated soils: a review // *J. Hazard. Mater.* 2015. V. 285. P. 419–435.
- Mishra S., Singh S.N. Microbial degradation of *n*-hexadecane in mineral salt medium as mediated by degradative enzymes // *Bioresour. Technol.* 2012. V. 111. P. 148–154.
- Mounier J., Camus A., Mitteau I., Vaysse P.J., Goulas P., Grimaud R., Sivadon P. The marine bacterium *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SP17 degrades a wide range of lipids and hydrocarbons through the formation of oleolytic biofilms with distinct gene expression profiles // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2014. V. 90. P. 816–831.
- Naether D.J., Slawtschew S., Stasik S., Engel M., Olzog M., Wick L.Y., Timmis K.N., Heipieper H.J. Adaptation of the hydrocarbonoclastic bacterium *Alcanivorax borkumensis* SK2 to alkanes and toxic organic compounds: a physiological and transcriptomic approach // *Appl. Environ. Microbiol.* 2013. V. 79. P. 4282–4293.
- Navon-Venezia S., Zosim Z., Gottlieb A., Legmann R., Carmeli S., Ron E., Rosenberg E. Alasan, a new bioemulsifier from *Acinetobacter radioresistens* // *Appl. Environ. Microbiol.* 1995. V. 61. P. 3240–3244.
- Nie H., Nie M., Xiao T., Wang Y., Tian X. Hexadecane degradation of *Pseudomonas aeruginosa* NY3 promoted by glutaric acid // *Sci. Total Environ.* 2017. V. 575. P. 1423–1428.
- Paniagua-Michel J.de J., Olmos-Soto J., Morales-Guerrero E.R. Algal and microbial exopolysaccharides: new insights as biosurfactants and bioemulsifiers // *Adv. Food Nutr. Res.* 2014. V. 73. P. 221–257.
- Paria S. Surfactant-enhanced remediation of organic contaminated soil and water // *Adv. Colloid Interface Sci.* 2008. V. 138. P. 24–58.
- Pathak M., Sarma H.K., Bhattacharyya K.G., Subudhi S., Bisht V., La B., Devi A. Characterization of a novel polymeric bioflocculant produced from bacterial utilization of *n*-hexadecane and its application in removal of heavy metals // *Front. Microbiol.* 2017. V. 8. Article 170. doi 10.3389/fmicb.2017.00170
- Pepi M., Cesàro A., Liut G., Baldi F. An antarctic psychrotrophic bacterium *Halomonas* sp. ANT-3b, growing on *n*-hexadecane, produces a new emulsifying glycolipid // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2005. V. 53. P. 157–166.
- Perry M.B., MacLean L.L., Patrauchan M.A., Vinogradov E. The structure of the exocellular polysaccharide produced by *Rhodococcus* sp. RHA1 // *Carbohydr. Res.* 2007. V. 342. P. 2223–2229.
- Petrikov K.V., Delean Ya.A., Surin A., Ponamoreva O.N., Puntus I.F., Filonov A.E., Boronin A.M. Glycolipids of *Pseudomonas* and *Rhodococcus* oil-degrading bacteria used in bioremediation preparations. Formation and structure // *Process Biochemistry* 2013. V. 48. P. 931–935.
- Procópio L., de Cassia Pereira e Silva M., van Elsas J.D., Seldin L. Transcriptional profiling of genes involved in *n*-hexadecane compounds assimilation in the hydrocarbon degrading *Dietzia cinnamea* P4 strain // *Braz. J. Microbiol.* 2013. V. 44. P. 633–641.
- Rabus R., Boll M., Heider J., Meckenstock R.U., Buckel W., Einsle O., Ermler U., Golding B.T., Gunsalus R.P., Kroneck P.M., Krüger M., Lueders T., Martins B.M., Musat F., Richnow H.H., Schirck B., Seifert J., Szaleniec M., Treude T., Ullmann G.M., Vogt C., von Bergen M., Wilkes H. Anaerobic microbial degradation of hydrocarbons: from enzymatic reactions to the environment // *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2016. V. 26. P. 5–28.
- Regina V.R., Lokanathan A.R., Modrzyński J.J., Sutherland D.S., Meyer R.L. Surface physicochemistry and ionic strength affects eDNA's role in bacterial adhesion to abiotic surfaces // *PLoS ONE.* 2014. V. 9. e105033. doi 10.1371/journal.pone.0105033
- Rosenberg E., Ron E.Z. High- and low-molecularmass microbial surfactants // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1999. V. 52. P. 154–162.
- Sameshima Y., Honda K., Kato J., Omasa T., Ohtake H. Expression of *Rhodococcus opacus alkB* genes in anhydrous organic solvents // *J. Biosci. Bioeng.* 2008. V. 106. P. 199–203.
- Stenström T.A. Bacterial hydrophobicity, an overall parameter for the measurement of adhesion potential to soil particles // *Appl. Environ. Microbiol.* 1989. V. 55. P. 142–147.
- Sun J.Q., Xu L., Tang Y.Q., Chen F.M., Wu X.L. Simultaneous degradation of phenol and *n*-hexadecane by *Acinetobacter* strains // *Bioresour. Technol.* 2012. V. 123. P. 664–668.
- Tokumoto Y., Nomura N., Uchiyama H., Imura T., Morita T., Fukuoka T., Kitamoto D. Structural characterization and surface-active properties of a succinoyl trehalose lipid produced by *Rhodococcus* sp. SD-74 // *J. Oleo Sci.* 2009. V. 58. P. 97–102.
- Toth C.B.A., Gieg L.M. Time course-dependent methanogenic crude oil biodegradation: dynamics of fumarate addition metabolites, biodegradative genes, and microbial community composition // *Front. Microbiol.* 2018. V. 8. P. 2610. doi 10.3389/fmicb.2017.02610
- Tuleva B., Christova N., Cohen R., Stoev G., Stoineva I. Production and structural elucidation of trehalose tetraesters (biosurfactants) from a novel alkanotrophic *Rhodococcus wratislaviensis* strain // *J. Appl. Microbiol.* 2008. V. 104. P. 1703–1710.
- Urai M., Yoshizaki H., Anzai H., Ogihara J., Iwabuchi N., Harayama S., Sunairi M., Nakajima M. Structural analysis of an acidic, fatty acid ester-bonded extracellular polysaccharide produced by a pristane-assimilating marine bacterium, *Rhodococcus erythropolis* PR4 // *Carbohydr. Res.* 2007a. V. 342. P. 933–942.
- Urai M., Yoshizaki H., Anzai H., Ogihara J., Iwabuchi N., Harayama S., Sunairi M., Nakajima M. Structural analysis of mucoidan, an acidic extracellular polysaccharide produced by a pristane-assimilating marine bacterium, *Rhodococcus erythropolis* PR4 // *Carbohydr. Res.* 2007b. V. 342. P. 927–932.
- Vaysse P.J., Prat L., Mangenot S., Cruveiller S., Goulas P., Grimaud R. Proteomic analysis of *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SP17 biofilm formation at the alkane-water interface reveals novel proteins and cellular processes involved in hexadecane assimilation // *Res. Microbiol.* 2009. V. 160. P. 829–837.
- White D.A., Hird L.C., Ali S.T. Production and characterization of a trehalolipid biosurfactant produced by the novel marine bacterium *Rhodococcus* sp., strain PML026 // *J. Appl. Microbiol.* 2013. V. 115. P. 744–755.
- Whyte L.G., Smits T.H.M., Labbé D., Witholt B., Greer C.W., van Beilen J.B. Gene cloning and characterization of multiple alkane hydroxylase systems in *Rhodococcus* strains Q15

- and NRRL B-16531 // *Appl. Environm. Microbiol.* 2002. V. 68. P. 5933–5942.
- Wu B., Lan T., Lu D., Liu Z. Ecological and enzymatic responses to petroleum contamination // *Environ Sci. Process Impacts.* 2014. V. 16. P. 1501–1509.
- Xu H.L., Chen J.N., Wang S.D., Liu Y. Oil spill forecast model based on uncertainty analysis: a case study of Dalian oil spill // *Ocean Eng.* 2012. V. 54. P. 206–212.
- Zampolli J., Collina E., Lasagni M., Di Gennaro P. Biodegradation of variable-chain-length *n*-alkanes in *Rhodococcus opacus* R7 and the involvement of an alkane hydroxylase system in the metabolism // *AMB Express.* 2014. V. 4. P. 73. doi 10.1186/s13568-014-0073-4
- Zhao Y.H., Chen L.Y., Tian Z.J., Sun Y., Liu J.B., Huang L. Characterization and application of a novel bioemulsifier in crude oil degradation by *Acinetobacter beijerinckii* ZRS // *J. Basic Microbiol.* 2016. V. 56. P. 184–195.
- Zeng G., Liu Z., Zhong H., Li J., Yuan X., Fu H., Ding Y., Wang J., Zhou M. Effect of monorhamnolipid on the degradation of *n*-hexadecane by *Candida tropicalis* and the association with cell surface properties // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2011. V. 90. P. 1155–1161.
- Zheng C., Li Z., Su J., Zhang R., Liu C., Zhao M. Characterization and emulsifying property of a novel bioemulsifier by *Aeribacillus pallidus* YM-1 // *J. Appl. Microbiol.* 2012. V. 113. P. 44–51.
- Zhou X., Xin Z.J., Lu X.H., Yang X.P., Zhao M.R., Wang L., Liang J.P. High efficiency degradation crude oil by a novel mutant irradiated from *Dietsia* strain by 12C6+ heavy ion using response surface methodology // *Bioresour. Technol.* 2013. V. 137. P. 386–393.

Hexadecane and Hexadecane-Degrading Bacteria: Mechanisms of Interaction

I. P. Solyanikova¹, * and L. A. Golovina¹

¹*Skyrabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia*

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

Received April 9, 2018

Revised July 17, 2018

Accepted October 2, 2018

Abstract—The review presents the results of investigation of the interaction between the hydrophobic substrate hexadecane and microbial cells. Three aspects of this process are discussed in more detail: (1) interaction of bacterial cells with the hydrophobic substrate, including characteristics of the cell surface and the conformational changes occurring at contact between the cell and the insoluble substrate; (2) molecular basics of the degradation of hydrophobic compounds at each stage of the cell–substrate interaction, such as synthesis of dispersing components, dispersion of the water-insoluble substrate, sorption of the hydrophobic compound by the cell and its storage, as well as transcription regulation of the genes involved either directly in biodegradation or in the processes associated with growth on hydrophobic substrates; and (3) bacterial synthesis of surfactants in the course of the degradation of hydrophobic compounds, diversity of their structure and conditions for their enhance release, as well as their biotechnological application.

Keywords: bacteria, hexadecane, degradation, atomic force microscopy, transcriptome analysis, biosurfactants

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДАННЫХ МОРФОЛОГИИ И МОЛЕКУЛЯРНОЙ СИСТЕМАТИКИ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ЗЕЛЕННЫХ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ РОДА *CHLOROCOCCUM* И НЕКОТОРЫХ БЛИЗКОРОДСТВЕННЫХ ТАКСОНОВ© 2019 г. А. Д. Темралеева^а, *, С. В. Москаленко^а^аИнститут физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН, Пушкино, 142290, Россия

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

Поступила в редакцию 25.06.2018 г.

После доработки 28.08.2018 г.

Принята к публикации 02.10.2018 г.

Подтверждена полифилия трех родов зеленых микроводорослей – *Chlorococcum*, *Deasonia* и *Neosporogiococcum*. Часть видов рода *Chlorococcum* вместе с типовым видом *C. infusionum* вошли в состав макроклады *Moewusinia* и образовали истинную кладу *Chlorococcum*. Ее представители отличались сверхдлинными ITS2 с необычной вторичной структурой. Остальные являются членами макроклады *Stephanosphaerina* и должны быть переименованы. В результате наблюдений за аутентичными штаммами уточнены и дополнены морфологические диагнозы *N. gelatinosum*, *C. diplobionicum*, *C. isabeliense* и *C. sphacosum*. Предложения по номенклатурным изменениям даны на основании морфологического сходства, уровня замен в гене 18S рРНК, наличия компенсаторных замен в консервативных регионах ITS2, различий во вторичной структуре спейсера и в консервативном мотиве III шпильки.

Ключевые слова: идентификация, морфология, молекулярная систематика, 18S рРНК, ITS2, зеленые водоросли, *Chlorophyta*

DOI: 10.1134/S0026365619010087

Род *Chlorococcum* был впервые описан еще в XIX в. (Meneghini, 1842) и с тех пор неоднократно изменял свой объем (Коршиков, 1953; Silva, Starr, 1953; Trainor, Bold, 1954; Starr, 1955; Deason, Bold, 1960; Chantanachat, Bold, 1962; Bold, Parker, 1962; Trainor, Verses, 1967; McLean, 1968; Brown, McLean, 1969; McGuire, 1969; Archibald, Bold, 1970; Archibald, 1979; Metting, 1980; Ettl, Gärtner, 1987; Archibald, 1988; Chihara et al., 1994). Род характеризовался следующими морфологическими признаками: вегетативные клетки одиночные или во временных скоплениях, эллипсоидной и шаровидной формы, клеточная стенка гладкая, пристенный хлоропласт с отверстием или без него, пиреноид один или несколько, клетки одноядерные или многоядерные непосредственно перед размножением зооспорами, апланоспорами или изогаметами, зооспоры неметаболические, не меняют форму при движении и не округляются после остановки (*Chlamydomonas*-тип), с двумя жгутиками равной длины (Андреева, 1998). По данным AlgaeBase род включает в себя 89 видов (Guiry, Guiry, 2018), описанных из пресноводных, морских и наземно-воздушных местообитаний (Андреева, 1998; Костиков и соавт., 2001; Canter-

Lund, Lund, 1995; John, Tsarenko, 2002; Shubert, 2003).

Использование молекулярно-генетических методов позволило обнаружить полифилию рода и обосновало необходимость его ревизии (Nakayama et al., 1996; Klochkova et al., 2006; Kawasaki et al., 2015). Согласно последним номенклатурным изменениям по данным 18S рРНК-анализа (Watanabe, Lewis, 2017), истинные представители рода – типовой вид *C. infusionum*, *C. costatozygotum*, *C. echinozygotum*, *C. hypnosporum* – вошли в кладу *Chlorococcum*. Также в род *Chlorococcum* была перенесена часть видов родов *Neosporogiococcum* и *Tetracystis* – *N. macropyrenoidosum*, *N. vacuolatum*, *T. aerea* и *T. polymorpha*, переименованные в *C. macropyrenoidosum*, *C. vacuolatum*, *C. aerium* и *C. polymorphum* соответственно. *C. dorsiventrale* и *C. littorale* образовали новый род *Alvikia*. Обе перечисленные клады находятся внутри макроклады *Moewusinia*. Виды *C. oloefaciens*, *C. elkhartiense*, *C. minutum* и *C. ellipsoideum* принадлежат макрокладу *Stephanosphaerina* и образуют другой род. Следует отметить, что исследование S. Watanabe и L. Lewis (2017) было сфокусировано на 18S рРНК-филогении только 12 видов рода *Chlorococcum*,

Таблица 1. Праймеры и условия амплификации гена 18S рРНК и спейсера ITS2

Локус	Праймер	Последовательность (5'–3')	Условия амплификации
18S рРНК	F	AACCTGGTTGATCCTGCCAGT	95°C – 5 мин;
	R	TGATCCTTCTGCAGGTTACCTACG	95°C – 1 мин, 55°C – 1 мин, 72°C – 2 мин, 25 циклов; 72°C – 5 мин
ITS2	ITS3	GCATCGATGAAGAACGCAGC	95°C – 3 мин;
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	95°C – 30 с, 51,6°C – 30 с, 72°C – 1 мин, 35 циклов*; 72°C – 10 мин

* Оптимизация условий ПЦР.

другие виды и филогенетические маркеры не были охвачены.

В данной работе впервые для представителей полифилетичного рода *Chlorococcum* были одновременно исследованы морфологические характеристики 19 штаммов, проведен 18S рРНК-анализ и оценена вторичная структура спейсера ITS2.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изоляция и культивирование штаммов водорослей. Объектами данного исследования стали аутентичные штаммы рода *Chlorococcum* и некоторые близкородственные таксоны зеленых микроводорослей (*Chlorophyceae*, *Chlorophyta*), полученные из Коллекции культур водорослей Киевского национального университета им. Т. Шевченко (Algae Culture Collection of Kyiv University, ACCU) и депонированные нами в Альгологическую коллекцию Института физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН (Algal Collection of Soil Science Institute, ACSSI): *Chlorococcum citriforme* ACSSI 200, *C. costatozygotum* ACSSI 201, *C. diplobionticum* ACSSI 202, *C. echinozygotum* ACSSI 203, *C. hypnosporum* ACSSI 205, *C. isabeliense* ACSSI 207, *C. oleofaciens* ACSSI 208, *C. sphacosum* ACSSI 209, *Neosporangium gelatinosum* ACSSI 217. Кроме того, дополнительно был изучен дикий штамм *Deasonia grandis* ACSSI 152, изолированный к. б. н. Ю.М. Бачура (Гомельский государственный университет им. Ф. Скорины). Культивирование штаммов проводили на среде BG11 с азотом (1% агар, pH 7.0) в климатостате при температуре 23–25°C, световом потоке 60–75 мкмоль фотонов м⁻² с⁻¹ и фотопериоде 12 ч (Темралева и соавт., 2014).

Микроскопия. Морфологию и жизненные циклы штаммов изучали методами световой микроскопии (светлое поле и интерференционный контраст) с помощью микроскопов Leica DM750 и Carl Zeiss Axio Scope A1 (Германия) в ЦКП ИФХиБП РАН. Результаты наблюдений документированы рабочими рисунками и фотографиями,

снятыми с помощью цветных цифровых камер "Видеозавр" (Россия) и Carl Zeiss MRc 5 (Германия). Сроки наблюдения составляли от 2 недель до 6 месяцев. При морфологической идентификации штаммов зеленых микроводорослей учитывали тип организации таллома, наличие и толщину слизистых оболочек, количество и тип хлоропластов, наличие и структуру пиреноида, форму и размеры клеток, способы размножения и другие характеристики. Названия таксонов приведены согласно Международной электронной базе данных AlgaeBase (Guiry, Guiry, 2018).

Выделение, амплификация, очистка и секвенирование ДНК. Суммарную ДНК выделяли с помощью колоночного набора DNeasy Plant Mini Kit ("Qiagen", США) и набора на магнитных частицах ФитоСорб ("Синтол", Россия), следуя протоколам производителей. Для амплификации использовали готовую смесь для ПЦР Screen Mix-HS ("Евроген", Россия). Праймеры для амплификации гена 18S рРНК и спейсера ITS2 были использованы из статей Katana et al. (2001) и White et al. (1990) соответственно, условия при необходимости были оптимизированы (табл. 1). Детекцию целевых ПЦР-продуктов проводили электрофоретически в 1%-ном агарозном геле. Для дальнейшей очистки ампликонов из геля применяли набор Cleanup Mini ("Евроген", Россия). Секвенирование нуклеотидных последовательностей осуществляли на базе ЗАО "Синтол" (Россия).

Молекулярно-филогенетический анализ. Для филогенетического анализа гена 18S рРНК и спейсера ITS2 штаммов зеленых водорослей был выполнен поиск гомологии нуклеотидных последовательностей по алгоритму BLASTn в GenBank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>), составлены наборы из собственных и депонированных в генетические базы данных последовательностей, имеющих максимальную гомологию, длину прочтения и принадлежащих типовым видам и коллекционным аутентичным штаммам (табл. 2). В программе BioEdit по алгоритму ClustalW было выполнено множественное выравнивание (Hall, 1999). Для выбора модели нуклеотидных замен использова-

ли программу jModelTest (Darriba et al., 2012), ориентируясь на наименьший индекс AIC. Реконструкцию филогенетических взаимосвязей осуществляли с помощью метода максимального правдоподобия (ML) в программе PhyML. В качестве внешней группы выбрали представителя класса *Trebouxiophyceae* – *Chlorella vulgaris* (*Chlorophyta*). Статистическая поддержка топологии дерева была оценена с помощью бутстреп-анализа (1000 повторностей) и указана в узлах ветвей в виде процентов. Генетические различия между нуклеотидными последовательностями охарактеризовали с помощью генетических дистанций. Мерой генетических различий являлся процент несовпадений нуклеотидов при попарном сравнении выровненных последовательностей, вычисление которого проводили в программе MEGA 6.0 (Tamura et al., 2013).

Для анализа вторичной структуры ITS2 была выполнена аннотация спейсера в ITS2-DataBase (<http://its2.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de>), его фолдинг с помощью веб-сервера Mfold (<http://unafold.rna.albany.edu>) и визуализация посредством программы PseudoViewer3 (Byun, Han, 2009). Сравнение вторичной структуры между штаммами, поиск консервативных мотивов и компенсаторных замен осуществляли в программе 4SALE (Seibel et al., 2006). В качестве инструмента разделения видов был использован подход, предложенный A. Coleman (2000, 2009), которая показала, что наличие хотя бы одной компенсаторной замены в консервативных регионах ITS2 (10 пар нуклеотидов для II шпильки и 18 пар для III шпильки) у двух водорослей коррелирует с их полной половой несовместимостью. Напротив, замены в менее консервативных регионах (I и IV шпильки), а также полукompенсаторные замены в консервативных регионах не были связаны со способностью скрещиваться. На основе мета-анализа большого числа данных Müller et al. (2007) установили, что наличие даже одной компенсаторной замены в 93% исследованных случаев указывает на принадлежность организмов к разным видам. При оценке правильности фолдинга ITS2 зеленых водорослей ориентировались на работу Caisová et al. (2013).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Световая микроскопия. Длительное наблюдение за морфологией и размножением перечисленных коллекционных штаммов, а также изучение литературных источников и первоописаний показало, что виды, традиционно относимые к роду *Chlorococcum*, имеют существенные различия в таких признаках как количество ядер, тип хлоропласта, структура крахмальной обертки пиреноида и др. (Андреева, 1998). Так в изученной выборке все виды рода *Chlorococcum*, кроме

C. aquaticum и *C. nivale*, имеют одно ядро. Большинство имеют полый шаровидный хлоропласт (рис. 1а, 1в, 1г, 1ж, 1з, 1л, 1м), за исключением *C. costatozygotum* с глубококашевидным и трещиноватым хлоропластом (рис. 1к) и *C. nivale* с лопастным хлоропластом (согласно рисунку Андреевой, 1998).

По строению крахмальной обертки пиреноида можно выделить 2 группы видов со сплошной оберткой – *C. aquaticum*, *C. sphacosum* (рис. 1а), *C. citriforme* (рис. 1в), *C. elkhartense*, *C. ellipsoideum*, *C. isabeliense* (рис. 1ж), *C. microstigmatum*, *C. minutum*, *C. nivale*, *C. oleofaciens* (рис. 1г), *C. rugosum*, *C. vacuolatum*, а также виды с сегментированной оберткой – *C. chlorococcoides*, *C. diplobionticum* (рис. 1з), *C. costatozygotum* (рис. 1к), *C. hyposporum* (рис. 1л), *C. echinozygotum* (рис. 1м), *C. infusionum*, *C. polymorphum*. Кроме того, при наблюдении за аутентичными штаммами был выявлен ряд несоответствий их первоначальному морфологическому диагнозу. Так, например, у аутентичного штамма *C. diplobionticum* ACSSI 202 мы наблюдали сегментированную, а не сплошную крахмальную обертку пиреноида (рис. 1з) и способность к образованию комплексов клеток (рис. 1и), что ранее описано не было (Archibald, Bold, 1970). Однако в более раннем исследовании W. Herndon, открывшего данный вид, несмотря на отсутствие описания структуры крахмальной обертки пиреноида, по рисункам исследователя можно заключить, что она ближе к прерывистой (Herndon, 1958).

Согласно первоописаниям, *C. isabeliense* и *C. sphacosum* имеют массивные хлоропласты (Archibald, Bold, 1970). Однако при изучении аутентичных штаммов ACSSI 207 и ACSSI 209, соответственно, мы охарактеризовали хлоропласт как полый шаровидный, слегка рассеченный по краям в первом случае (рис. 1ж) и полый шаровидный с отверстием (рис. 1а) во втором. Кроме того, мы обратили внимание на морфологическую близость некоторых видов рода *Chlorococcum* с *Neosporangium gelatinosum* ACSSI 217 (рис. 1б), который имел пристенный полый шаровидный хлоропласт, нетипичный для представителей рода *Neosporangium* (Deason, 1971). Кроме того, наши дальнейшие наблюдения показали, что штамм ACSSI 152, идентифицированный и переданный в коллекцию к. б. н. Ю.М. Бачура как *Deasonia granata*, имел характерные признаки рода *Macrochloris* (Андреева, 1998) – центральный асимметричный хлоропласт (рис. 1д), несколько пиреноидов в зрелых клетках (рис. 1е).

18S рРНК-анализ. Морфологическую гетерогенность рода *Chlorococcum* подтвердил молекулярно-генетический анализ. Так, на 18S рРНК-дереве виды рода *Chlorococcum* не образовали единой клады, что подтверждает его полифилетичность

Таблица 2. Список штаммов зеленых микроводорослей, использованных в филогенетическом анализе

Вид	Авторское название штамма	Коллекционный штамм	Идентификационный номер GenBank		Местообитание
			18S рPHK	ITS2	
<i>Chlamydomodium starrii</i>	—	SAG 16.87*	AB983625	AB983644	Почва, Южная Африка
<i>Chlorococcum aquaticum</i>	64/88	UTEX 2222*	AB983622	KX147374	Озеро, Куба
<i>Chlorococcum chlorococcoides</i>	—	NIES-155	AB936287	—	Почва, Япония
<i>Chlorococcum citriforme</i>	E6B	ACSSI 200* (SAG 62.80)	MG491514	MG582214	Почва торфяников, США
<i>Chlorococcum costatozygotum</i>	T 51	ACSSI 201* (SAG 20.95)	MG491515	—	Почва соснового леса, Италия
<i>Chlorococcum diplobionticum</i>	—	ACSSI 202* (SAG 32.95)	MG491512	MG582213	Почва кукурузного поля, Ямайка
<i>Chlorococcum echinozygotum</i>	—	ACSSI 203* (SAG 213-5)	MG491509	—	Почва, Филиппины
<i>Chlorococcum elkhartiense</i>	15T3A	UTEX 1772*	AB936286	—	Почва торфяного болота, Индия
<i>Chlorococcum ellipsoideum</i>	T-1-3	UTEX 972*	U70586	—	Песчаная почва, США
<i>Chlorococcum hypnosporum</i>	F35-1	ACSSI 205* (SAG 213-6)	MG491508	—	Почва, США
<i>Chlorococcum infusionum</i> (T)	A 91	SAG 10.86	AB936281	—	Пресные воды, терр. бывш. Чехословакии
<i>Chlorococcum isabeliense</i>	P. I. 92	ACSSI 207* (SAG 65.80)	MG491510	MG582211	Прибрежный песок, США
<i>Chlorococcum microstigmatum</i>	18T2A	UTEX 1777*	AB983616	KX147360	Торфяное болото, США
<i>Chlorococcum minutum</i>	W7-2	SAG 213-7* (UTEX 117)	KR607490	KX147343	Почва, Индия
<i>Chlorococcum nivale</i>	—	UTEX 2225*	AB983623	AB983641	Снег, горы Высокие Татры, Словакия
<i>Chlorococcum oleofaciens</i>	FRT-2	ACSSI 208* (SAG 213-11)	MG491516	MG582215	Почва с поля, США
<i>Chlorococcum polymorphum</i>	—	UTEX 1242	AB936279	—	—
<i>Chlorococcum rugosum</i>	P.I.7-3	UTEX 1785*	AB983621	AB983639	Прибрежный песок, США
<i>Chlorococcum sphacosum</i>	W1D2	ACSSI 209* (UTEX 1787; SAG 66.80)	MG491513	KX147369	Почва сфагнового болота, США
<i>Chlorococcum vacuolatum</i>	—	SAG 213-8*	KF144189	KX147342	Почва, Южная Африка
<i>Chlorosarcinopsis minor</i> (T)	—	UTEX 949*	AB049415	—	—

Таблица 2. Окончание

Вид	Авторское название штамма	Коллекционный штамм	Идентификационный номер GenBank		Местообитание
			18S рPHK	ITS2	
<i>Deasonia granata</i>	–	ACSSI 152	MG491517	MG582216	Почва, Беларусь
<i>Deasonia granata</i>	–	SAG 213-1*	KM020105	–	Почва, Чехия
<i>Deasonia multinucleata</i>	–	SAG 25.95*	KM020098	–	Садовая почва, Япония
<i>Deasonia prolifera</i> (T)	–	UTEX 1846*	AB936280	–	Почва с хлопкового поля, США
<i>Macrochloris radiosa</i>	–	SAG 213-2a*	KM020104	–	Почва, терр. бывш. Чехословакии
<i>Macrochloris rubrioleum</i>	–	CCCryo 340b-08*	AB983624	AB983643	Аэрофит, Шпицберген, Норвегия
<i>Neosporogium alabamense</i> (T)	–	UTEX 960	AB972426	–	–
<i>Neosporogium gelatinosum</i>	15 K1A	ACSSI 217* (SAG 64.80)	MG491511	MG582212	Торфяное болото, США
<i>Neosporogium macropyrenoidosum</i>	–	UTEX 1839*	AB936284	–	Почва, США
<i>Neosporogium vacuolatum</i>	–	UTEX 1838*	AB936283	–	Почва, США
<i>Protosiphon botryoides</i> (T)	–	UTEX B 99	JN880460	LC095629	Почва, США
<i>Sporogium spongiosa</i> (T)	318	SAG 280-2b* (UTEX 1; CCAP 3/1)	KR607497	U34776	Почва, Швейцария
<i>Tetracystis aerea</i> (T)	C-6	SAG 89.80*	JN903990	–	Почва, США
<i>Tetracystis tetraspora</i>	59A	SAG 98.80*	JN968582	KM020024	Почва, Куба
Внешняя группа					
<i>Chlorella vulgaris</i> (T)	35	SAG 211-11b* (CCAP 211/11B; UTEX 259)	FM205832	AY591508	Пруд, Нидерланды

Примечание. Прочерк означает отсутствие данных; (T) – типовой вид; последовательности, полученные в данном исследовании, отмечены жирным шрифтом.

* Аутентичный штамм.

(рис. 2). Истинными представителями рода могут считаться виды, образовавшие группу с типовым видом *C. infusionum*, а именно *C. costatozygotum* ACSSI 201, *C. hypnosporum* ACSSI 205, *C. chlorococcoides* NIES-155, *C. echinozygotum* ACSSI 203. Кроме того, к ним же были перенесены виды *N. macropyrenoidosum*, *N. vacuolatum*, *T. aerea* и *T. polymorpha* (Watanabe, Lewis, 2017). Все они вошли в макрокладу *Moewusinia* (Watanabe, Lewis, 2017). Различия в гене, кодирующем 18S рPHK, внутри клады "истинных" *Chlorococcum* составляли от 0.1 до 2%, при сравнении с *Chlorococcum*-подобными видами различия варьировали от 9.4 до 10.9%.

Сам род в настоящее время сложно выделить морфологически. Но, например, замечено, что кластеризация таксонов на дереве 18S рPHK соответствует их группированию по типу крахмальной обертки пиреноида (рис. 2): клады *Chlorococcum*, принадлежащую макрокладу *Moewusinia*, составляли водоросли с прерывистой крахмальной оберткой пиреноида. Среди представителей макроклады *Stephanosphaerina* часть таксонов характеризовалась прерывистой крахмальной оберткой пиреноида, часть – сплошной. Вероятно, требуется более детальное изучение цитологических признаков вегетативных клеток и зооспор для разграничения таксонов. Остальные предста-

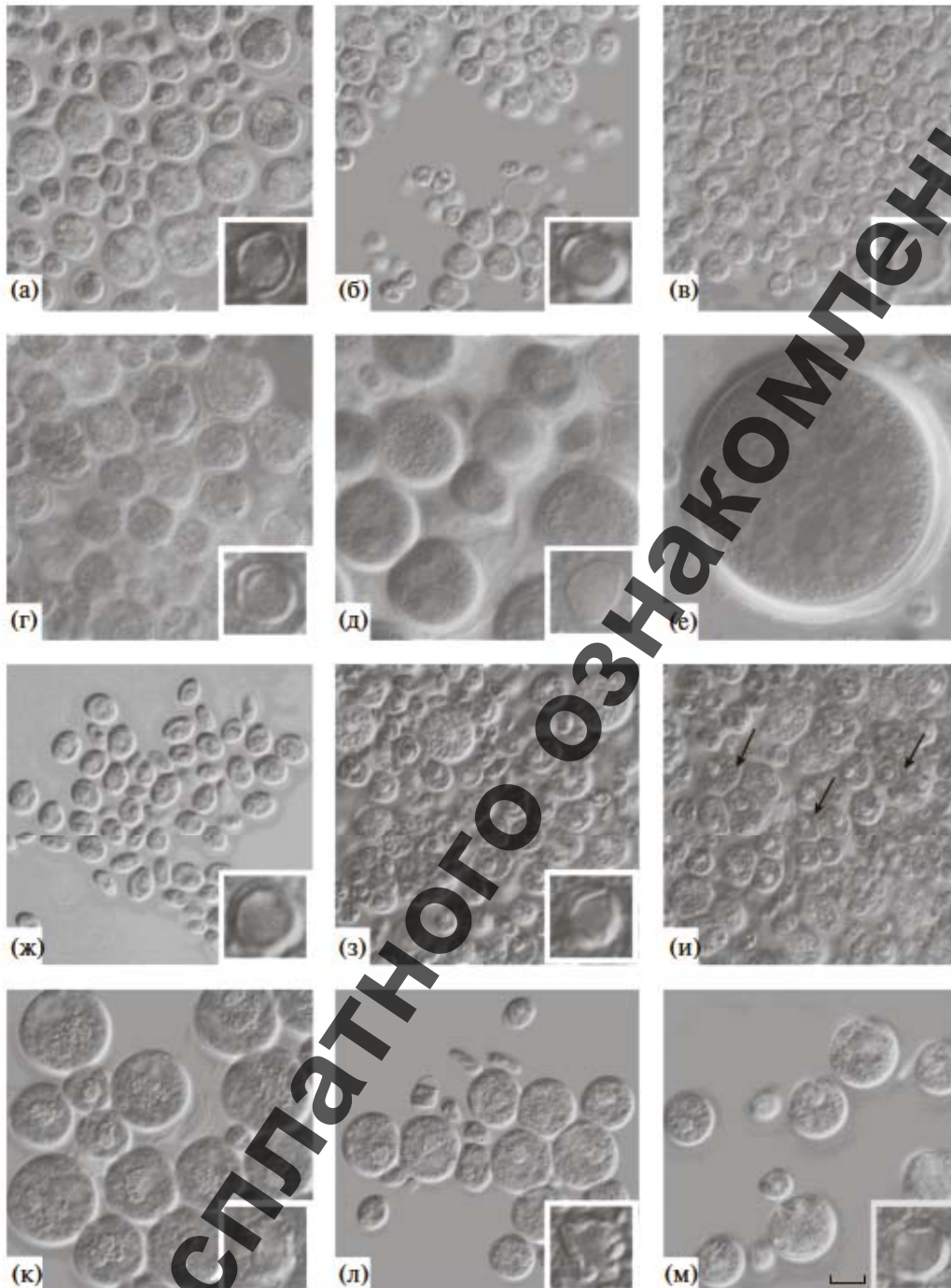


Рис. 1. Фотографии штаммов водорослей ACSSI: а – *C. sphacosum* ACSSI 209; б – *N. gelatinosum* ACSSI 217; в – *C. citriforme* ACSSI 200; г – *C. oleofaciens* ACSSI 208; д – молодые клетки и е – зрелая клетка *D. granata* ACSSI 152; ж – *C. isabeliense* ACSSI 207; з – одиночные клетки, и – комплексы клеток (указаны стрелками) *C. diplobionicum* ACSSI 202; к – *C. costatozygotum* ACSSI 201; л – *C. hypnosporum* ACSSI 205; м – *C. echinozygotum* ACSSI 203. Во вклейке представлена увеличенная фотография крахмальной обертки пиреноида. Масштабная линейка – 10 мкм.

вители *Chlorella* вошли в состав макроклады *Stephanosphaerina* и разделились на четыре группы и отдельно *C. nivale* (рис. 2). Первая группа объединила *N. gelatinosum* ACSSI 217, *C. citriforme* ACSSI 200, *C. oleofaciens* ACSSI 208, *C. sphacosum*

ACSSI 209, *C. elkhartiense* UTEX 1772 и *C. microstigmatum* UTEX 1777 с различиями в гене 18S рРНК от 0 до 0.1%. Вторая группа со 100%-ной статистической поддержкой включает в себя *C. isabeliense* ACSSI 207, *C. rugosum* UTEX 1785 и *C. vacuolatum*

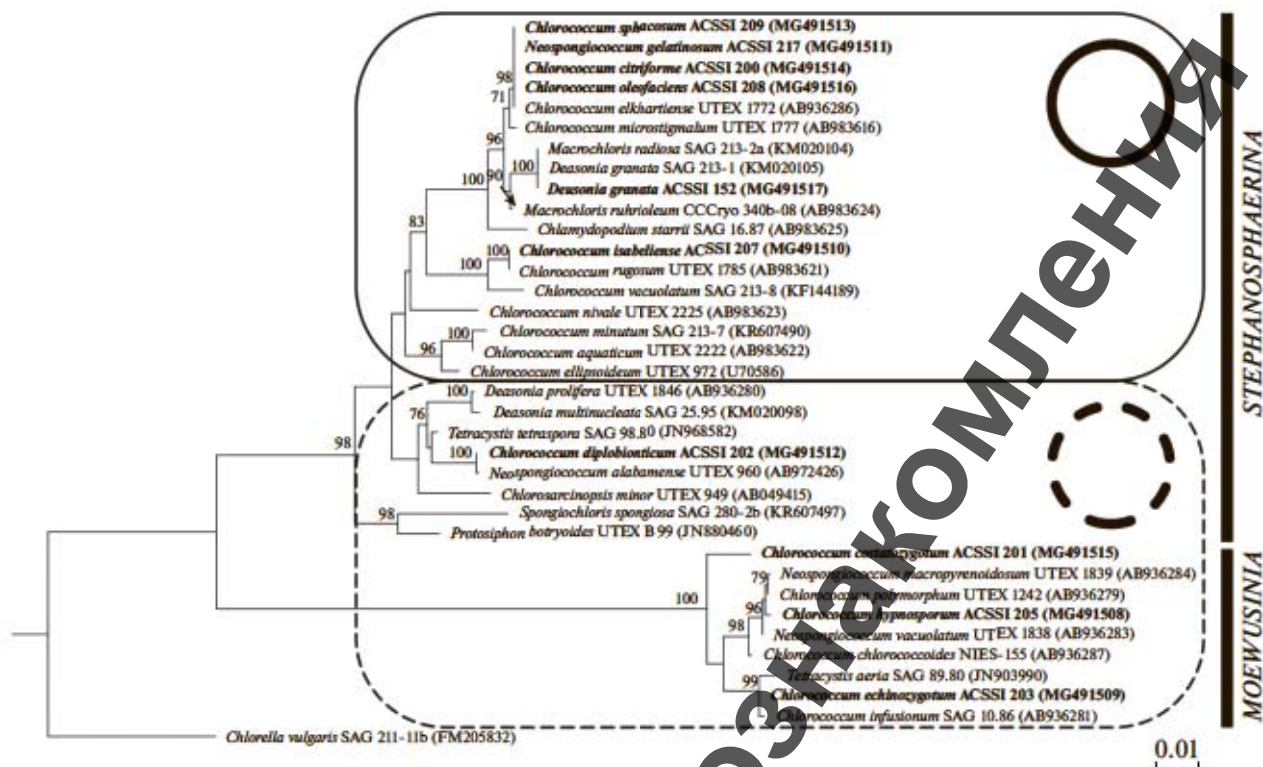


Рис. 2. Укорененное филогенетическое дерево некоторых видов рода *Chlorococcum* и близкородственных таксонов, построенное методом максимального правдоподобия (ML), на основе анализа гена 18S рРНК (1760 п.н.). В качестве статистической поддержки узлов дерева указаны бутстреп-значения ML; значения <70% не показаны. Модель нуклеотидных замен: GTR + I + G. Жирным шрифтом выделены штаммы ACSSI.

SAG 213-8 (рис. 2). Между первыми двумя видами генетические различия в гене 18S рРНК отсутствуют, от *C. vacuolatum* они отличаются на 11%. В третью группу вошли *C. aquaticum*, *C. minutum*, *C. ellipsoideum* с генетическими дистанциями от 0.3 до 1%. В последнюю кладу образовал *C. diplobionticum* ACSSI 202 с *N. alabamense* и *T. tetraspora* с генетическими различиями в 0.1 и 10% соответственно.

Кроме того, в результате анализа установлена полифилия еще двух родов зеленых микроводорослей – *Deasonia* и *Neosporoglossum*. Кладу *Deasonia* образовали типовой вид *D. prolifera* и *D. multinucleata* (0.2% различий в гене 18S рРНК), а *D. granata* со 100%-ной статистической поддержкой группируется с *Macrochloris radiosa* (0% генетических различий), что позволяет перенести этот вид в род *Macrochloris*. Голотип рода *N. alabamense* вошел в кладу *Neosporoglossum*, остальные представители *N. gelatinosum*, *N. macropyrenoidosum*, *N. vacuolatum* были переименованы (Kawasaki et al., 2015; Watanabe, Lewis, 2017).

Анализ вторичной структуры ITS2. Поскольку 18S рРНК-анализа бывает недостаточно при исследовании близкородственных таксонов (Coleman, 2003; Hall et al., 2010), нами была дополни-

тельно изучена вторичная структура ITS2 для разделения коллекционных штаммов ACSSI по A. Coleman. Между *N. gelatinosum* ACSSI 217, *C. citrifforme* ACSSI 200 и *C. oleofaciens* ACSSI 208 не было обнаружено компенсаторных замен (рис. 3). Вторичная структура ITS2 данной группы отличается на 1 компенсаторную замену в I шпильке от ITS2 *C. sphaerosum* UTEX 1787 и *C. sphaerosum* ACSSI 152, между двумя последними структурами компенсаторных замен не выявлено. При сравнении перечисленных штаммов со штаммом *C. microstigmatum* UTEX 1777 в структуре ITS2 найдено 4 компенсаторные замены: одна – в I шпильке и три – на верхушке II шпильки (рис. 3). Все обнаруженные компенсаторные замены не относятся к заменам в консервативных регионах ITS2 и не учитываются при разграничении видов зеленых водорослей (Coleman, 2000, 2009).

Таким образом, учитывая генетические различия в гене 18S рРНК от 0 до 0.1%, отсутствие компенсаторных замен в консервативных регионах ITS2, одинаковую консервативную последовательность III шпильки (табл. 3) и сходные морфологические характеристики (тип хлоропласта, форма вегетативных клеток и зооспор, количество ядер, тип крахмальной обертки пиреноида), виды *N. gelatinosum*, *C. citrifforme*, *C. oleofaciens*,

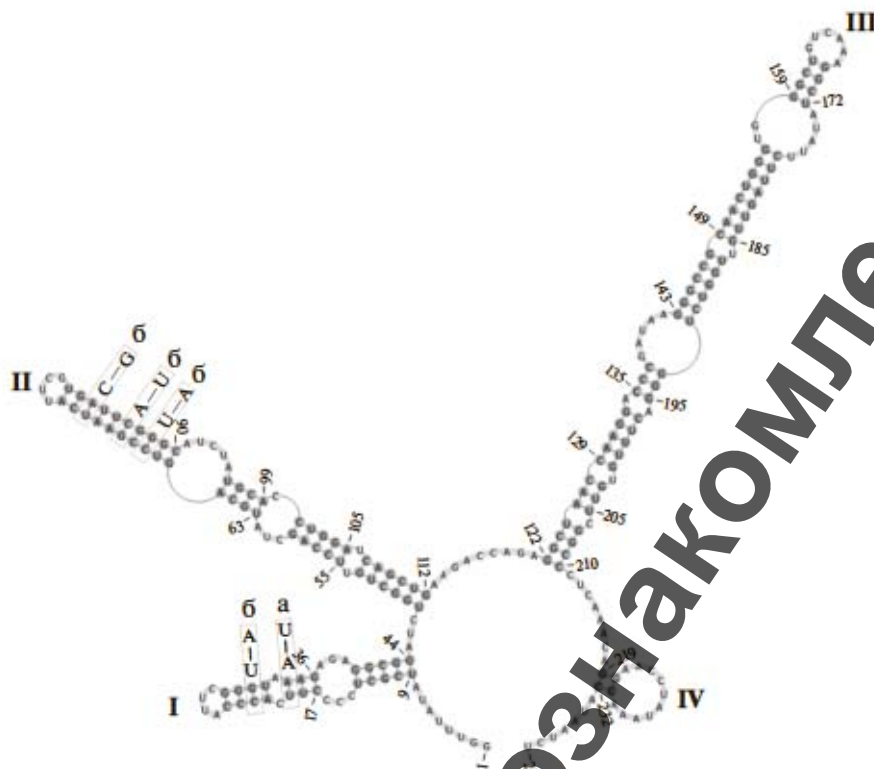


Рис. 3. Сравнение вторичной структуры ITS2 *C. oleofaciens* ACSSI 208 (показанная структура), *C. sphacosum* ACSSI 209 (а), *C. microstigmatum* UTEX 1777 (б).

C. sphacosum и *C. microstigmatum* следует объединить в один вид. Ранее *C. microstigmatum* был оставлен в качестве самостоятельного вида на основании формы стигмы (Kawasaki et al., 2015), что на наш взгляд и мнение других систематиков недостаточно (Ettl, Gärtner, 2014). Под сомнением оказывается самостоятельность вида *C. elkhartiense* (0–0.1% различий в гене 18S рРНК и сходные морфологические признаки), однако в генетических базах данных отсутствует депонированная последовательность ITS2 для аутентичного штамма UTEX 1772. Данный аутентичный штамм использовался в филогенетическом анализе рода *Chlorococcum* впервые. В ревизии Kawasaki et al. (2015) был исследован неаутентичный штамм *C. elkhartiense* UTEX 293, который не вошел в группу *C. oleofaciens* (макроклада *Stephanosphaerina*), а принадлежит макрокладу *Moewusinia*.

D. granata ACSSI 152 и *Macrochloris rubrioleum* CCCryo 340b-08 имеют идентичную консервативную последовательность III шпильки (табл. 3). Между ними было обнаружено 5 компенсаторных замен: одна в I шпильке, две – во II шпильке и две – в III, в том числе три из них в консервативных регионах ITS2 (рис. 4). Но определить является ли штамм ACSSI 152 самостоятельным видом *M. granata* или должен быть синонимизирован с *M. radiosa* невозможно без сравнения вторичной

структуры его ITS2 с *M. radiosa*, нуклеотидная последовательность которого в настоящее время в генетических базах данных отсутствует.

Группа штаммов *C. isabeliense* ACSSI 207, *C. rugosum* UTEX 1785, *C. vacuolatum* SAG 213-8 является морфологически сходной и имеет одинаковый консервативный мотив III шпильки (табл. 3). Между первыми двумя видами компенсаторные замены в ITS2 отсутствуют, благодаря чему их, возможно, следует объединить в один вид. От *C. vacuolatum* они отличаются на 2 компенсаторные замены (вершины I и II шпилек). Несмотря на то, что компенсаторные замены произошли в неконсервативных регионах, структура ITS2 *C. vacuolatum* сильно отличается от *C. isabeliense* и *C. rugosum*, что позволяет его оставить в качестве самостоятельного таксона (рис. 5). Морфологически *C. vacuolatum* отличается от близкородственных видов большими размерами вегетативных клеток и наличием толстой слизистой оболочки.

При сравнении вторичных структур ITS2 *Chlorococcum diplobionticum* ACSSI 202 и *Tetracystis tetraspora* SAG 98.80 было обнаружено две компенсаторные замены в неконсервативных участках ITS2 (рис. 6). Однако разница в длине спейсера и различия в консервативном мотиве III шпильки (табл. 3) дают возможность сохранить их в качестве отдельных видов.

Таблица 3. Характеристика вторичной структуры ITS2 некоторых видов рода *Chlorococcum* и близкородственных таксонов

Свойства ITS2 Штаммы	Суммарное количество нуклеотидов	Консервативная последовательность III шпильки
<i>C. citriforme</i> ACSSI 200*	239	UGGGUGGCGCUGUCAAAAG
<i>C. microstigmatum</i> UTEX 1777*	236**	
<i>C. oleofaciens</i> ACSSI 208*	239	
<i>C. sphacosum</i> ACSSI 209*	238**	
<i>N. gelatinosum</i> ACSSI 217*	239	
<i>Deasonia granata</i> ACSSI 152	245	UGGGUGGGCUGUCAAAA
<i>Macrochloris rubrioleum</i> CCCryo 340b-08*	243	UGGGUGGGCAG—AAAU
<i>C. isabeliense</i> ACSSI 207*	235	
<i>C. rugosum</i> UTEX 1785*		
<i>C. vacuolatum</i> SAG 213-8*	224**	UGGGUGAGCAUUAACCU
<i>C. nivale</i> UTEX 2225*	312	
<i>C. aquaticum</i> UTEX 2222*	235	UGGGUGGGCAUUUCCAA
<i>C. minutum</i> SAG 213-7*	250	
<i>C. diplobionticum</i> ACSSI 202*	257	UGGGUAGGCAUUCACAG
<i>T. tetraspora</i> SAG 98.80*	238	UGGGUAGGCAUUCCGA—
<i>P. botryoides</i> UTEX 99*	268	UGAGUAGGCACUUGU—U
<i>S. spongiosa</i> SAG 280-2b*	239	
<i>Chlorococcum echinozygotum</i> ACSSI 203*	366	UAGGUAGGAGGGACCAU
<i>Chlorococcum hypnosporum</i> ACSSI 205*	402	UAGGUAGGCUCAAGGCA

Примечание. Жирным шрифтом выделены штаммы ACSSI; подчеркнут консервативный мотив верхушки III спирали.

* Аутентичные штаммы.

** Частичная последовательность ITS2.

Все описанные штаммы имели длину ITS2 от 235 до 312 н. и типичную вторичную 4-х шпильчатую структуру. Исключением являлись штаммы *C. echinozygotum* ACSSI 203 и *C. hypnosporum* ACSSI 205, принадлежащие макрокладе *Moewusinia*, которые имели длину 366 и 402 н. (табл. 3). Первоначальный анализ вторичной структуры ITS2 этих двух видов показал несоответствие консенсусной модели принятой для классов *Chlorophyceae* и *Ulvophyceae* (Caisova et al., 2013) с полученной нами на основе принципа минимальной энергии на сервере Mfold (данные не представлены). Описание необычной вторичной структуры ITS2 истинных *Chlorococcum* готовится к публикации.

Таким образом, подтверждена полифилия трех родов зеленых микроводорослей — *Chlorococcum*, *Deasonia* и *Neosporococcum*. Часть видов рода *Chlorococcum* вместе с типовым видом *C. infu-*

sionum вошли в состав макроклады *Moewusinia* и образовали истинную кладу *Chlorococcum*. Ее представители отличались сверхдлинными ITS2 с необычной вторичной структурой. Остальные являются членами макроклады *Stephanosphaerina* и должны быть переименованы. Уточнены и дополнены морфологические диагнозы некоторых аутентичных штаммов. Так, описан пристенный полый шаровидный хлоропласт у *N. gelatinosum* ACSSI 217, *C. isabeliense* ACSSI 207 и *C. sphacosum* ACSSI 209, а также сегментированная крахмальная обертка пиреноида у *C. diplobionticum* ACSSI 202. На основании морфологического сходства, уровня замен в гене 18S рРНК, наличия компенсаторных замен в консервативных регионах ITS2, различий во вторичной структуре спейсера и в консервативном мотиве III шпильки предложено объединить виды *N. ge-*

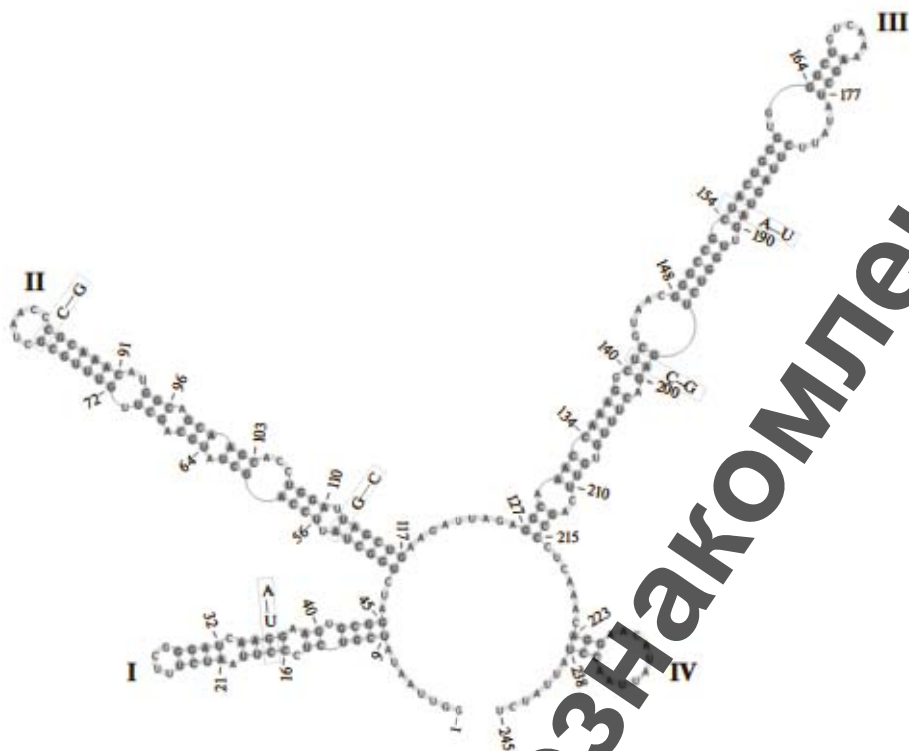


Рис. 4. Сравнение вторичной структуры ITS2 *D. granata* ACSSI 152 (показанная структура) и *M. rubrioleum* CCCryo 340b-08 (во вклейках).

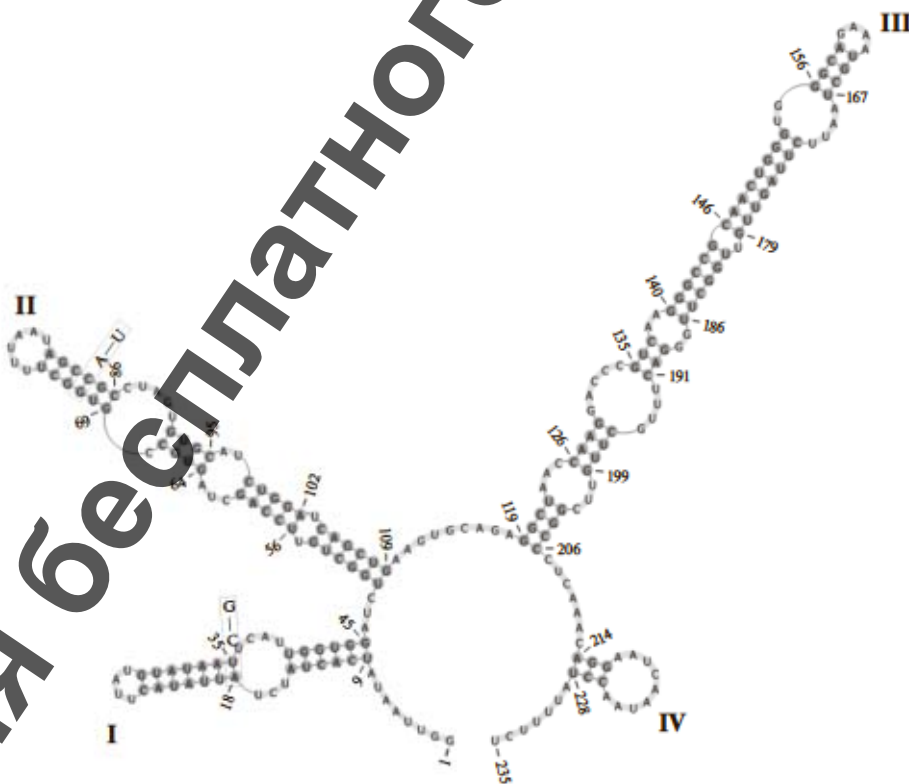


Рис. 5. Сравнение вторичной структуры ITS2 *C. isabeliense* ACSSI 207 (показанная структура) и *C. vacuolatum* SAG 213-8 (во вклейках).

- Caisová L., Marin B., Melkonian M. A consensus secondary structure of ITS2 in the *Chlorophyta* identified by phylogenetic reconstruction // *Protist*. 2013. V. 164. P. 482–496.
- Canter-Lund H., Lund J.W.G. *Freshwater Algae. Their Microscopic World Explored*. Bristol: UK Biopress, 1995. 360 p.
- Chantanachat S., Bold H.C. *Phycological studies. II. Some algae from arid soils* // University of Texas Publications. 1962. № 6218. P. 1–74.
- Chihara M., Nakayama T., Inoue I., Kodama M. *Chlorococcum littorale*, a new marine green coccoid alga (*Chlorococcales*, *Chlorophyceae*) // *Archiv für Protistenkunde*. 1994. V. 144. № 3. P. 227–235.
- Coleman A.W. Is there a molecular key to the level of “biological species” in eukaryotes? A DNA guide // *Mol. Phylogenet. Evol.* 2009. V. 50. P. 197–203.
- Coleman A.W. ITS2 is a double-edged tool for eukaryote evolutionary comparisons // *Trends Genet.* 2003. V. 19. P. 370–375.
- Coleman A.W. The significance of a coincidence between evolutionary landmarks found in mating affinity and a DNA sequence // *Protist*. 2000. V. 151. P. 1–9.
- Darriba D., Taboada G. L., Doallo R., Posada D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing // *Nature Methods*. 2012. V. 9. № 8. P. 772.
- Deason T.R. The genera *Spongiococcum* and *Neospongiococcum*. I. The genus *Spongiococcum* and the multinucleate species of the genus *Neospongiococcum* // *Phycologia*. 1971. V. 10. P. 17–27.
- Deason T.R., Bold H.C. *Phycological studies. I. Exploratory studies of Texas soil algae* // University of Texas Publication. 1960. № 6022. P. 1–72.
- Ettl H., Gärtner G. *Syllabus der Boden-, Luft- und Flechtenalgen. 2. Auflage*. Springer: Berlin Heidelberg, 2014. 773 p.
- Ettl H., Gärtner G. Taxonomic and nomenclatural changes and descriptions of new taxa of the *Tetrasporales*, *Chlorococcales* and *Gloeodendrales* (*Chlorophyta*, *Chlamydomonadales* and *Chlorophyceae*) // *Nova Hedwigia*. 1987. V. 44. P. 509–517.
- Guiry M.D., Guiry G.M. *AlgaeBase. World-wide electronic publication*, National University of Ireland, Galway. 2018. <http://www.algaebase.org>. Searched on 24 May 2018.
- Hall T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT // *Nucleic Acids Symposium Series*. 1999. № 41. P. 95–98.
- Hall J.D., Fučíková K., Lo C., Lewis L.A., Karol K.G. An assessment of proposed DNA barcodes in freshwater green algae // *Cryptogamie, Algol.* 2010. V. 31. P. 529–555.
- Herndon W. Some new species of chlorococcacean algae // *Am. J. Bot.* 1958. V. 45. P. 308–323.
- John D.M., Tsarenko P.M. Order *Chlorococcales* // *The Freshwater Algal Flora of the British Isles. An Identification Guide to Freshwater and Terrestrial Algae* / Eds. John D.M., Whitton B.A., Brook A.J. Cambridge: Cambridge University Press, 2002. P. 327–409.
- Katana A., Kłopotowski J., Spalik K., Zakryś B., Szalacha E., Szymańska H. Phylogenetic position of *Koliella* (*Chlorophyta*) as inferred from nuclear and chloroplast small subunit rDNA // *J. Phycol.* 2001. V. 37. P. 443–451.
- Kawasaki Y., Nakada T., Tomita M. Taxonomic revision of oil-producing green algae, *Chlorococcum oleofaciens* (*Volvocales*, *Chlorophyceae*) and its relatives // *J. Phycol.* 2015. V. 51. P. 1000–1016.
- Klochkova T.A., Kang S.H., Cho G.Y., Pueschel C.M., West J.A., Kim G.H. Biology of a terrestrial green alga *Chlorococcum* sp. (*Chlorococcales*, *Chlorophyta*), collected from the Miruksazi stupa in Korea // *Phycologia*. 2006. V. 45. P. 349–358.
- McGuire R.F. Attributes of *Chlorococcum* species: A numerical analysis // *J. Phycol.* 1969. V. 5. P. 220–223.
- McLean R.J. New taxonomic criteria in classification of *Chlorococcum* species. I. Pigmentation // *J. Phycol.* 1968. V. 4. P. 328–332.
- Meneghini G. *Monographia Nostochinearum Italicarum addito specimine de Rivularia*. Memorie della Reale Accademia delle Scienze di Torino. Ser. 2. 1842. V. 5. P. 1–143.
- Metting B. New species of green microalgae (*Chlorophyta*) from an eastern Washington silt loam // *Phycologia*. 1980. V. 19. P. 296–306.
- Müller T., Philippi N., Dandekar T., Schultz J., Wolf M. Distinguishing species // *RNA*. 2007. V. 3. P. 1469–1472.
- Nakayama T., Watanabe S., Mitsui K., Uchida H., Inouye I. The phylogenetic relationship between *Chlamydomonadales* and *Chlorococcales* inferred from 18S rDNA sequence data // *Phycol. Res.* 1996. V. 44. № 1. P. 47–55.
- Seiber P.N., Müller T., Dandekar T., Schultz J., Wolf M. 4SALE: a tool for synchronous RNA sequence and secondary structure alignment and editing // *BMC Bioinformatics*. 2006. V. 7. P. 498.
- Shubert E. *Nonmotile coccoid and colonial green algae // Freshwater Algae of North America. Ecology and Classification* / Eds. Wehr J.D., Sheath R.G. San Diego: Academic Press, 2003. P. 253–309.
- Silva P.C., Starr R.C. Difficulties in applying the International Code of Botanical Nomenclature to certain unicellular algae, with special reference to *Chlorococcum* // *Svensk Botanisk Tidskrift*. 1953. V. 47. № 2. P. 235–247.
- Starr R.C. A comparative study of *Chlorococcum meneghini* and other spherical, zoospore-producing genera of the *Chlorococcales* // *Indiana University Publications Science*. 1955. V. 20. P. 1–111.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipowski A., Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. // *Mol. Biol. Evol.* 2013. V. 30. P. 2725–2729.
- Trainor F.R., Bold H.C. Three new unicellular *Chlorophyceae* from soil // *Am. J. Bot.* 1954. V. 40. P. 758–767.
- Trainor F.R., Verses P.A. A new *Chlorococcum* from a Connecticut cornfield soil // *Phycologia*. 1967. V. 6. № 4. P. 237–239.
- Watanabe S., Lewis L.A. Phylogenetic interpretation of light and electron microscopic features of selected members of the phylogroup *Moewusinia* (*Chlorophyceae*), with new generic taxonomy // *Phycologia*. 2017. V. 56. № 3. P. 329–353.
- White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J.W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics // *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* / Eds. Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J. San Diego: Acad. Press, 1990. V. 3. P. 315–322.

Application of Morphological and Molecular Systematics for Identification of Green Microalgae of the Genus *Chlorococcum* and Some Closely Related Taxa

A. D. Temraleeva^{1,*} and S. V. Moslalenko¹

¹*Institute of Physicochemical and Biological Problems in Soil Science, Russian Academy of Sciences, Pushchino, 142290 Russia*

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

Received June 25, 2018

Revised August 28, 2018

Accepted October 2, 2018

Abstract—Polyphyly of three genera of green microalgae, *Chlorococcum*, *Deasonia*, and *Neosporangiococcum*, was confirmed. Some *Chlorococcum* species, together with the type species *C. infusionum*, formed a true clade *Chlorococcum* within the macroclade *Moewusinia*. Its members were characterized by extremely long ITS2 regions with unusual secondary structure. Other species were found to belong to the *Stephanosphaeria* macroclade, and should be reclassified accordingly. The research of authentic strains resulted in revised and enhanced morphological descriptions of *N. gelatinosum*, *C. diplobionticum*, *C. isabellense*, and *C. sphacosum*. Proposals on taxonomic revision are based on morphological similarity, 18S rRNA distances, presence of compensatory base changes in ITS2 conserved regions, differences in the secondary structure of the spacer, and differences of the Helix III conserved motif.

Keywords: identification, morphology, molecular taxonomy, 18S rRNA, ITS2, green algae, *Chlorophyta*

Для бесплатного ознакомления

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ПРОИСХОЖДЕНИЕ α -ГЛЮКОЗИДАЗ MAL И IMA
МЕЖДУНАРОДНОЙ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ЛИНИИ
SACCHAROMYCES CEREVISIAE S288C

© 2019 г. Г. И. Наумов^a, А. Н. Боровкова^{a, b}, А. В. Шнырева^b, Е. С. Наумова^{a, *}

^aГосударственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов
Национального исследовательского центра "Курчатовский институт", Москва, 125412, Россия

^bМосковский государственный университет имени М.В. Ломоносова, кафедра микробиологии и альгологии,
Москва, 119991, Россия

*e-mail: lena_naumova@yahoo.com

Поступила в редакцию 18.07.2018 г.

После доработки 27.08.2018 г.

Принята к публикации 02.10.2018 г.

Принимая во внимание общепринятую концепцию полной дупликации генома (ПДГ) у дрожжей рода *Saccharomyces*, проведен сравнительный анализ множественных α -глюкозидаз MAL и IMA генетической линии *Saccharomyces cerevisiae* S288C и α -глюкозидаз протоплоидных (геномы которых не прошли дупликации) дрожжей родов *Kluyveromyces* и *Lachancea*. Показано, что только некоторые изоформы MAL и IMA дрожжей *Kluyveromyces* и *Lachancea* находятся в близком филогенетическом родстве с α -глюкозидазами MAL12, MAL32 и IMA1–IMA4 дрожжей *S. cerevisiae* S288C, тогда как другие более близки дивергентной IMA5. Полученные результаты согласуются с концепцией ПДГ, согласно которой дрожжи *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* и *Lachancea* возникли от общего протоплоидного предка и поэтому могут иметь общие близкородственные α -глюкозидазы MAL и IMA. Уровень сходства аминокислотных последовательностей изомалятаз IMA1–IMA4 дрожжей *S. cerevisiae* S288C и изомалятаз *L. dasiensis*, *L. fantastica*, *L. fermentati*, *L. lanzarotensis*, *L. meyersii*, *L. quebecensis*, *L. thermotolerans* составляет 75–100%, мальтазы MAL этих же видов идентичны на 75–99%. При этом α -глюкозидазы MAL и IMA независимо дивергировали в каждом роде, виде и даже штамме.

Ключевые слова: *Saccharomyces cerevisiae*, гены MAL и IMA, дупликация генома, изомалятаза, мальтаза, протоплоид, филогения α -глюкозидаз

DOI: 10.1134/S0026365619010075

Генетическая линия *Saccharomyces cerevisiae* S288C была первым эукариотическим организмом, у которого определили полную нуклеотидную последовательность генома (Goffeau et al., 1996), который в настоящее время является международным ресурсом (*Saccharomyces* Genome Database, SGD <http://www.yeast-genome.org>). Гены, представленные в геноме этих дрожжей, приняты в качестве референсных для распознавания и изучения генов различных эукариотических организмов.

Генетика ферментации α -глюкозида мальтозы, важной для производства хлеба, кваса, пива, пищевого и технического спирта, имеет большое фундаментальное и прикладное значение. Так, у эукариотических микроорганизмов опероноподобная структура впервые была обнаружена на примере мальтозных полимерных (множественных) локусов MAL, состоящих из одного регуляторного и двух структурных генов: пермеазы

мальтозы и α -глюкозидазы мальтазы (Needleman et al., 1984; Наумов, Юркевич, 1985).

Биохимический и генетический анализы показали, что существуют два типа родственных α -глюкозидаз у дрожжей *S. cerevisiae* (семейство GH13, международная классификация CAZy <http://www.cazy.org>). Один тип (мальтаза, К.Ф. 3.2.1.20) отвечает за гидролиз и ферментацию α -1,4-глюкозидов (мальтозы и туранозы), а второй (изомалятаза/ α -метилглюкозидаза, К.Ф. 3.2.1.10) — за гидролиз и ферментацию α -1,6-глюкозидов (α -метилглюкозида и изомалятозы) (Наумов, Наумов, 2012; Deng et al., 2014). Оба фермента имеют также общие субстраты: сахарозу и паранитрофенил- α -D-глюкопиранозид. Международный проект (Goffeau et al., 1996) по секвенированию и аннотированию генома генетической линии *S. cerevisiae* S288C позволил обнаружить, наряду с известными мальтазными генами MAL12 и MAL32, новое близкородственное им семейство

изомальтазных генов *IMA1–IMA5* (Наумов, Наумов, 2010; Brown et al., 2010; Teste et al., 2010). Уровень идентичности аминокислотных последовательностей известных мальтаз MAL12, MAL32, MAL62 и изомальтаз IMA1–IMA4 не превышает, соответственно, 99 и 92%, а между собой они имеют 71% идентичных аминокислотных остатков. Изомальтаза IMA5 имеет только 60–66% идентичных аминокислотных остатков с представителями обоих типов α -глюкозидаз.

В литературе имеются только неполные данные об эволюции α -глюкозидаз, депонированных в международных генетических базах (Наумов, Наумов, 2010; Naumoff, 2010; Brown et al., 2010; Teste et al., 2010). Цель нашего сообщения – установить происхождение α -глюкозидаз IMA и MAL дрожжей *S. cerevisiae* S288C.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изученные штаммы дрожжей и их происхождение приведены в табл. 1. Поиск гомологичных α -глюкозидаз (мальтаз и изомальтаз) у изученных видов дрожжей проводили в базе данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) с помощью программы BLAST. В качестве запроса использовали полную аминокислотную последовательность мальтазы MAL12 (регистрационный номер в GenBank YGR292W) дрожжей *S. cerevisiae* S288C длиной 589 а.о. Частичные последовательности белков не использовали.

Для определения генетического родства изученных видов дрожжей был применен филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей домена D1/D2 26S рДНК (600 п.н.). Множественные выравнивания изученных нуклеотидных и аминокислотных последовательностей проводили вручную, используя программу BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). Филогенетические деревья строили методом ближайших соседей (Neighbor-Joining) в программе MEGA 6 (Tamura et al., 2013).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Обнаружение множественных родственных α -глюкозидаз IMA и MAL позволило изучать их филогенетику. Была определена суммарная копияность этих генов в геномах различных дрожжей: *S. cerevisiae* – 8, *Lachances (Saccharomyces) kluyveri* – 5, *Schefferomyces (Pichia) stipitis* – 5, *Lachancea (Kluyveromyces) thermotolerans* – 4, *Kluyveromyces lactis* – 3, *Debaryomyces hansenii* – 2, *Candida albicans* – 2 и *Schizosaccharomyces pombe* – 1 (Brown et al., 2010; Naumoff, 2010; Teste et al., 2010). У различных штаммов *S. cerevisiae* в разном количестве и комбинациях были идентифицированы пять мальтазных генов: MAL12, MAL22, MAL32, MAL42 и MAL62 (Needleman et al., 1984).

Филогенетическое родство α -глюкозидаз дрожжей *L. thermotolerans* и *L. kluyveri*, наиболее важных и близких *S. cerevisiae*, не было изучено. Показано только, что одна и две α -глюкозидазы, соответственно, *L. thermotolerans* и *L. kluyveri*, содержат в субстрат-специфичном диагностическом сайте трипептид Val216-Gly-Ser (Teste et al., 2010). Последний характерен для изомальтаз, тогда как для мальтаз – Thr-Ala-Gly (Наумов, Наумов, 2010; Yamamoto et al., 2004). Сайт-направленный мутагенез подтвердил важность остатка Val216 для субстратной специфичности дрожжевой изомальтазы (Yamamoto et al., 2004).

На рис. 1 представлено построенное нами филогенетическое древо аминокислотных последовательностей α -глюкозидаз MAL и IMA. Для сравнительного анализа мы взяли известные мальтазы MAL12 (регистрационный номер в GenBank YGR292W), MAL32 (YBR299W) и изомальтазы IMA1–IMA5 (соответственно, YGR287C, YOL157C, YIL172C, YIL221C, YJL216C) дрожжей *S. cerevisiae* S288C, а также α -глюкозидазы их ближайших и дальних родственников. Диагностические сайты Val216-Gly-Ser и Thr-Ala-Gly позволили дифференцировать изомальтазы и мальтазы всех изученных дрожжей, кроме дивергентных мальтаз, которые представлены у *Schi. pombe* (NP_595063.1) и *D. hansenii* (DEHA2E00528p). Филогенетический анализ аминокислотных последовательностей α -глюкозидаз продемонстрировал существование нескольких изолированных кластеров (рис. 1). Отдельное положение на древе занимают мальтазы представителей неблизкородственных *S. cerevisiae* родов дрожжей: *Schi. pombe*, *D. hansenii* и *Schef. stipitis*. Обратим внимание, что *D. hansenii* обладает двумя дивергентными мальтазами: 46% идентичности. Уровень сходства аминокислотных последовательностей мальтазы DEHA2A13882p с мальтазами дрожжей *Schef. stipitis* составляет 70–72%, тогда как мальтаза DEHA2E00528p более сходна с мальтазой филогенетически неродственных дрожжей *Schi. pombe*.

α -Глюкозидазы *S. cerevisiae*, *K. lactis*, *K. dozhzhanskii* и десяти видов *Lachancea* образовали отдельный кластер со 100%-ной достоверностью. Среди α -глюкозидаз этих дрожжей выделяется хорошо обособленный кластер (бутстреп 98%), который включает два субкластера также с высокими поддержками (100%). Первый объединяет изомальтазы IMA1–IMA4 дрожжей *S. cerevisiae* S288C и изомальтазы *L. dasiensis*, *L. fantastica*, *L. fermentati*, *L. lanzarotensis*, *L. meyersii*, *L. quebecensis*, *L. thermotolerans*, уровень сходства аминокислотных последовательностей которых составляет 75–100%. Во втором субкластере объединились мальтазы MAL этих 7 видов и *L. mirantina*, идентичные на 75–99%. Сходство указанных изомальтаз и мальтаз ниже: 68–72%.

Таблица 1. Происхождение изученных штаммов дрожжей

Штамм	Вид	Источник выделения	α -Глюкозидазы (IMA, MAL)	Название белка или регистрационный номер в GenBank
<i>Saccharomyces</i>				
S288C	<i>S. cerevisiae</i>	Генетическая линия	IMA1	YGR287C
			IMA2	YOL197C
			IMA3	YIL172C
			IMA4	YJL221C
			IMA5	YJL216C
			MAL32	YBR299W
			MAL12	YGR292W
<i>Kluyveromyces</i>				
NRRL Y-1140	<i>K. lactis</i>	Сливки, США	MAL	KLLA0D00231p
			MAL	KLLA0_B00242g
CBS 2104	<i>K. dobzhanskii</i>	<i>Drosophila pseudoobscura</i> , США	MAL	CDO93416.1
<i>Lachancea</i>				
CBS 10888	<i>L. dassiensis</i>	Листья папоротника <i>Angiopteris godiiifolia</i> , Тайвань	IMA	LADA_0G16754g1_1
			IMA	LADA_0F00320g1_1
			MAL	LADA_0G16688g1_1
			MAL	LADA_0H04346g1_1
CBS 6924	<i>L. fantastica</i>	Почва, Южная Африка (Претория)	IMA	Lafa_0F00782g1_1
			MAL	Lafa_0E00188g1_1
			MAL	Lafa_0D17568g1_1
CBS 6772	<i>L. fermentati</i>	Безалкогольные напитки, Южная Корея	IMA	LAFE_0G01134g1_1
			IMA	LAFE_0A00254g1_1
			MAL	LAFE_0G01090g1_1
CBS 3082	<i>L. kluyveri</i>	<i>Drosophila pinicola</i> , США	IMA	SAKL0A00154p
			IMA	SAKL0C00176p
			MAL	SAKL0A05698p
			MAL	SAKL0A05654p
			MAL	SAKL0C02112p
CBS 6340	<i>L. thermotolerans</i>	Кондитерские изделия, консервы Мирабель, Россия	IMA	KLTH0B00308p
			MAL	KLTH0E17006p
			MAL	KLTH0G19470p
			MAL	KLTH0H05324p
CBS 8951	<i>L. meyersii</i>	Морская вода (мангровые заросли), Багамские острова	IMA	LAME_0A00232g1_1
			MAL	LAME_0D11342g1_1
			MAL	LAME_0C08394g1_1
CBS 11611	<i>L. nothofagi</i>	Сокоотечение <i>Nothofagus</i> , Аргентина	IMA	LANO_0G18272g1_1
			MAL	LANO_0F01354g1_1

Таблица 1. Окончание

Штамм	Вид	Источник выделения	α -Глюкозидазы (IMA, MAL)	Название белка или регистрационный номер в GenBank
CBS 11717	<i>L. mirantina</i>	Кашаса ("Бразильский ром"), Бразилия	IMA	LAMI_0F07580g1_1
			MAL	LAMI_0B00122g1_1
			MAL	LAMI_0F07646g1_1
CBS 12615	<i>L. lanzarotensis</i>	Виноград, Канарские острова, Испания	IMA	LALA0_S01e00672g
			MAL	LALA0_S01e19174g
			MAL	LALA0_S13e02894g
CBS 14138	<i>L. quebecensis</i>	Кора клена, Канада	IMA	LAQU0S17e02674g1_1
			MAL	LAQU0S06e05864g1_1
			MAL	LAQU0S02e00122g1_1
			MAL	LAQU0S02e11166g1_1
<i>Debaryomyces</i>				
CBS 767	<i>D. hansenii</i>	Неизвестно	MAL	DEHA2A13882p
			MAL	DEHA2E00528p
<i>Scheffersomyces</i>				
CBS 6054	<i>Schef. stipitis</i>	Фруктовые деревья, личинки насекомых, Франция	IMA	ABN65252.1
			MAL	ABN67312.1
			MAL	ABN67767.1
			MAL	ABN66628.1
			MAL	ABN64883.1
<i>Schizosaccharomyces</i>				
CBS 7264	<i>Schi. pombe</i>	Виноградный сок, Швеция	MAL	NP_595063.1

Примечание. Сокращенные названия коллекций: CBS – The Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Утрехт, Нидерланды; NRRL – USDA-ARS Culture Collection, National Center for Agricultural Utilization Research, Peoria, США. T – типовая культура.

В гетерогенной группе (бутстреп 55%), наряду с мальтазами MAL и изомальтазами IMA дрожжей *K. lactis*, *K. dobzhanskii*, *L. dasiensis*, *L. kluyveri*, *L. lanzarotensis*, *L. meyersii*, *L. mirantina*, *L. nothofagi*, *L. quebecensis*, и *L. thermotolerans*, мы обнаруживаем изомальтазу IMA5 дрожжей *S. cerevisiae* S288C. В целом, уровень идентичности входящих в эту группу α -глюкозидаз значительно ниже, чем в первом кластере (57–88%). Наибольшее сходство имеют изомальтазы (SAKL0A00154p, SAKL0C00176p) и мальтазы (SAKL0A05698p, SAKL0A05698p и SAKL0C02112p) дрожжей *L. kluyveri*, соответственно, 88 и 73–79%. Сравнимый уровень сходства имеет также изомальтаза IMA5 *S. cerevisiae* и две изомальтазы *L. kluyveri*: 70–72%. Наиболее дивергентными оказались изомальтазы LADA_0F00320g1_1 дрожжей *L. dasiensis*, *L. nothofagi* (LANO_0G18272g1_1) и *L. mirantina* (LAMI_0F07580g1_1), аминокислотные последовательности которых идентичны на 73–83%,

а уровень сходства с остальными α -глюкозидазами этого кластера составил 57–64%. Необходимо отметить, что у первых двух изомальтаз в диагностическом триплете Val216-Gly-Ser произошла замена Ser на Gly: Val216-Gly-Gly, тогда как у LAMI_0F07580g1_1 – произошла замена Gly на Ala: Val216-Ala-Gly. Следует отметить, что все обнаруженные α -глюкозидазы *L. fantastica* попали в первый кластер, тогда как α -глюкозидазы *L. kluyveri*, *L. nothofagi*, *K. lactis* и *K. dobzhanskii* обнаружены только во втором. α -Глюкозидазы остальных восьми изученных видов *Lachancea* распределились между двумя кластерами.

Современная классификация аскомицетовых дрожжей основана на филогенетическом анализе ряда молекулярных маркеров, прежде всего домена D1/D2 гена 26S рДНК (около 600 п.н.). Обширная компьютерная база данных GenBank по нуклеотидным последовательностям домена D1/D2

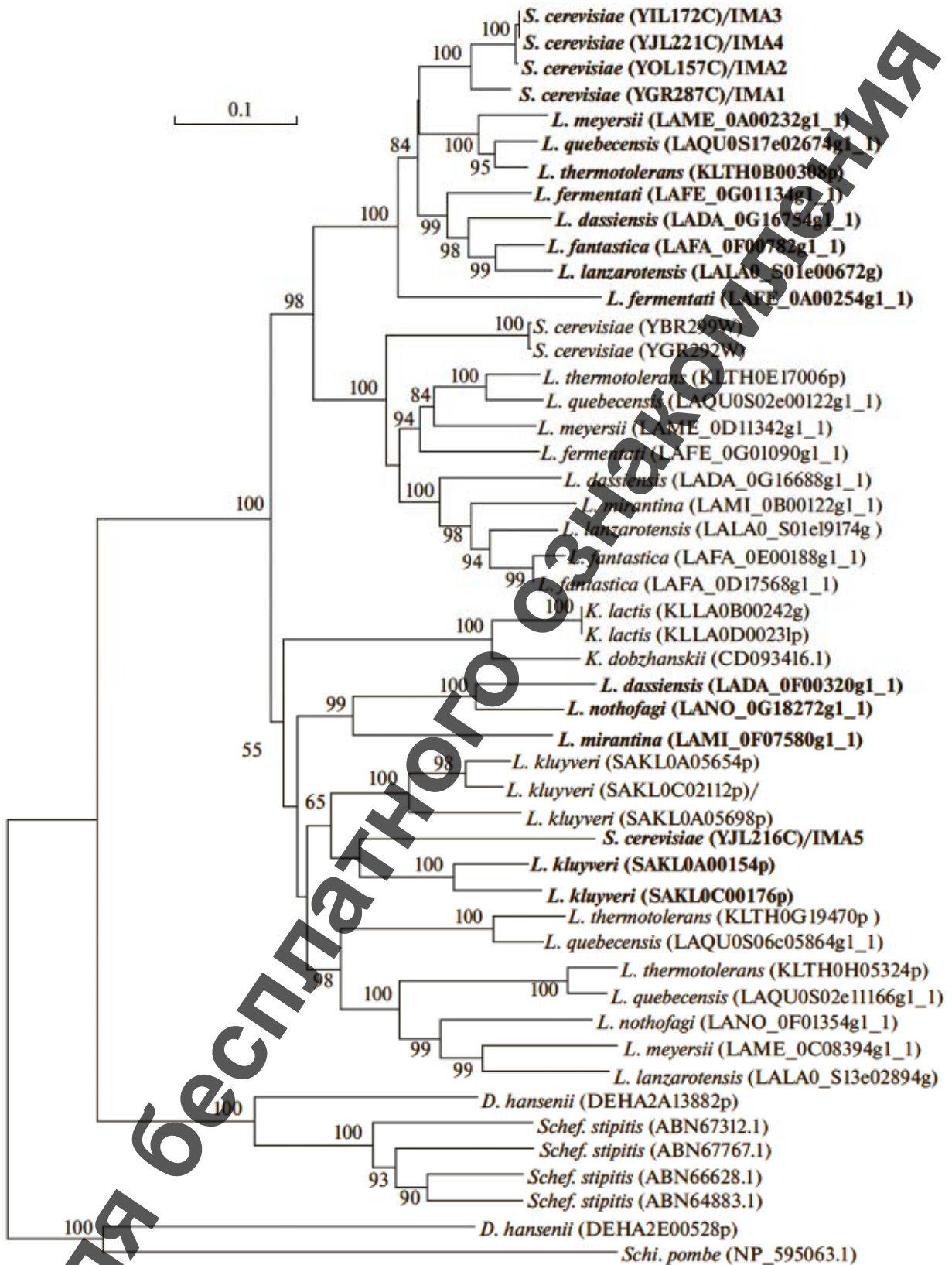


Рис. 1. Филогенетическое древо α -глюкозидаз дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* S288C и родственных им видов родов *Lachnospiza* (*L.*) и *Kluyveromyces* (*K.*). Приводятся значения бутстрепа не менее 50%. Шкала соответствует 100 заменам на 1000 аминокислотных остатков. В скобках указан регистрационный номер α -глюкозидаз в GenBank. Изомальтазы, в отличие от мальтаз, помечены жирным шрифтом. В качестве внешней группы использованы мальтазы дрожжей *Debaryomyces hansenii* и *Schizosaccharomyces pombe*.

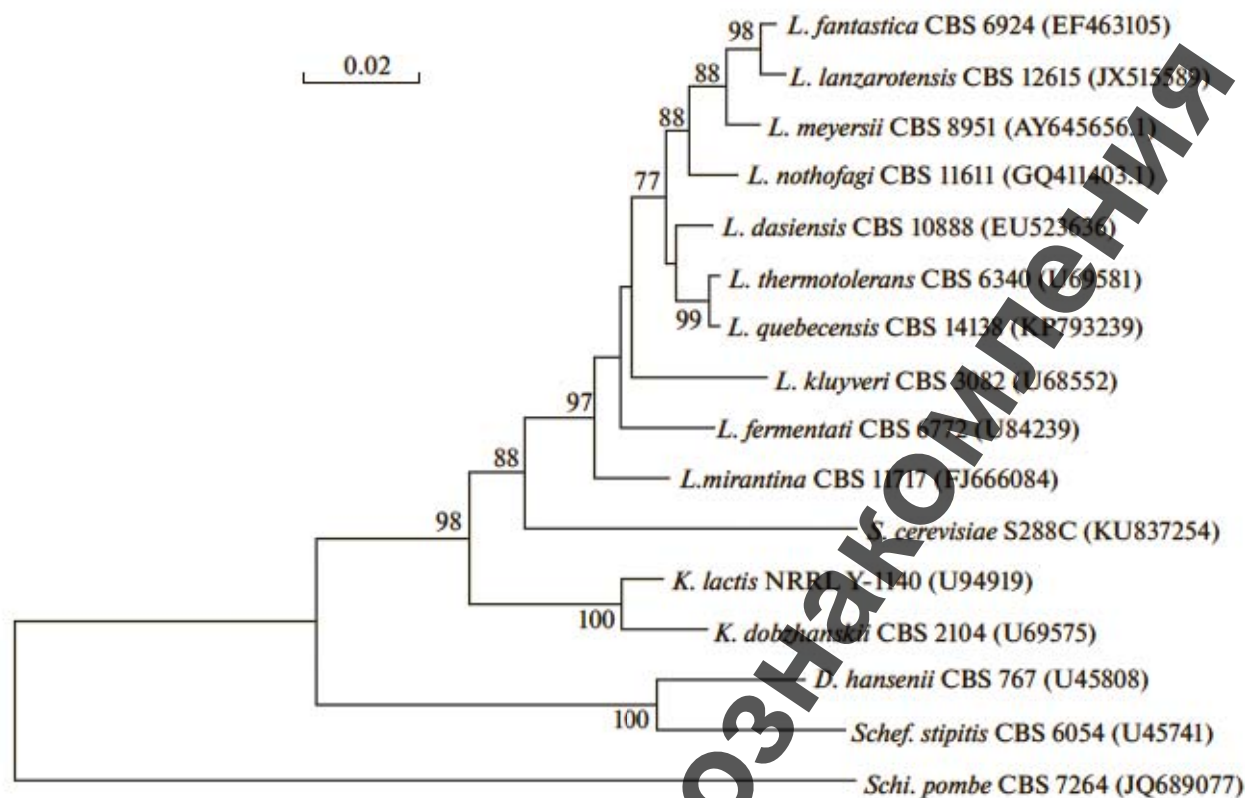


Рис. 2. Филогенетическое древо нуклеотидных последовательностей домена D1/D2 26S рДНК дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* S288C и родственных их родов *Lachancea* (*L.*) и *Kluyveromyces* (*K.*). Приводятся значения бутстрепа не менее 70%. Шкала соответствует 20 заменам на 1000 нуклеотидных остатков. В скобках указан регистрационный номер D1/D2-последовательностей в GenBank. В качестве внешней группы использованы дрожжи *Schizosaccharomyces pombe*.

широко используется для определения таксономического положения новых штаммов. На рис. 2 представлено филогенетическое древо нуклеотидных последовательностей домена D1/D2 26S рДНК анализируемых дрожжей. Со 100%-ой достоверностью выделяется кластер, объединяющий дрожжи *S. cerevisiae* S288C и 10 видов рода *Lachancea*, *K. lactis* NRRL Y-1140 и *K. dobzhanskii* CBS 2104. Их дальние родственники, *Schi. pombe*, *D. hansenii* и *Schef. stipitis*, занимают отдельное положение на филогенетическом древе. Следует отметить, что топологии деревьев, построенных на основании аминокислотных последовательностей α -глюкозидаз и нуклеотидных последовательностей домена D1/D2 хорошо согласуются (рис. 1 и 2).

Ранее был показан природный межвидовой перенос пектиназных генов *PGU* из *S. cerevisiae* в *S. bayanus*, из *S. paradoxus* в *S. cerevisiae* (Наумов и соавт., 2016), а также генов *SUC*, *MAL*, *RTM* и Y'-последовательности из *S. cerevisiae* в *S. bayanus* (Naumova et al., 2005, 2011). Кроме того, было обнаружено перемещение генов *PGU* у родственных дрожжей *Galactomyces citri-aurantii*, *Geotrichum klebahnii* и *Galactomyces candidus* (Шаламитский, Наумов, 2017). Возможность межвидовых переносов

генов, очевидно, обусловлена наличием общей системы типов спаривания у видов одного рода, позволяющей им скрещиваться в любой комбинации (Наумов и соавт., 2009; Наумов, 2015). В нашем случае такой механизм передачи генов *MAL* и *IMA* у представителей разных родов исключается. Виды разных родов не могут скрещиваться, а их геномы рекомбинировать. Известно только феромонное межродовое взаимодействие дрожжей разных родов, например, между *S. cerevisiae* и *L. kluyveri* (McCullough, Herskowitz, 1979; Наумов, Пишкур, 1999).

Таким образом, нахождение близкородственных α -глюкозидаз у представителей разных родов дрожжей, очевидно, можно объяснить только общим происхождением соответствующих родов дрожжей. В настоящее время хорошо обоснована концепция полной дубликации геномов в ходе эволюции некоторых родов дрожжей, в том числе видов рода *Saccharomyces*, тогда как у видов протоплоидных родов *Lachancea* (viz. *L. kluyveri*, *L. dasiensis*, *L. fantastica*, *L. fermentati* и *L. thermotolerans*) и *Kluyveromyces* (viz. *K. lactis*) она не проходила (Kellis et al., 2004; Scannell et al., 2007; Souciet et al., 2009; Dujon, Louis, 2017). Причем, полная дубликация восьми предковых хромосом у дрож-

жей *S. cerevisiae* произошла уже после их расхождения с дрожжами *Lachancea* (Souciet et al., 2009; Dujon, Louis, 2017). Гаплоидное число хромосом у дрожжей *Saccharomyces* равно 16, тогда как у видов *Lachancea* равно восьми. Полученные нами результаты указывают на то, что изомальтазы и мальтазы образовались у общего протоплоидного предка дрожжей родов *Saccharomyces*, *Lachancea* и *Kluveromyces*, т.е. до их расхождения и до полной дупликации генома *Saccharomyces*. Затем в каждом роде, виде и даже штамме происходила дивергенция своих α -глюкозидаз, имеющих как IMA, так и MAL активности.

Созданные и идентифицированные изогенные генетические линии дрожжей *S. cerevisiae* (Mortimer, Johnston, 1986; Наумов и соавт., 1994) до сих пор обеспечивают проведение исследований по генетике, геномике и эволюции дрожжей рода *Saccharomyces*, а также являются основой изучения других аскомицетовых дрожжей.

Авторы признательны Д.Г. Наумову за помощь в работе. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 17-04-00309).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Наумов Г.И. Дрожжи *Komagataella* – генетический род согласно межвидовой гибридизации // Микробиология. 2015. Т. 84. № 4. С. 449–455.
- Naumov G.I. The yeast *Komagataella*: a genetic genus in accordance with interspecies hybridization // Microbiology (Moscow). 2015. V. 84. P. 538–543.
- Наумов Д.Г., Наумов Г.И. Обнаружение нового семейства α -глюкозидазных генов IMA у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* // ДАН. 2010. Т. 432. № 4. С. 549–551.
- Naumoff D.G., Naumov G.I. Discovery of novel family of α -glucosidase genes IMA genes in yeast *Saccharomyces cerevisiae* // Dokl. Biochem. Biophys. 2010. V. 432. № 1. P. 114–116.
- Наумов Г.И., Наумов Д.Г. Молекулярно-генетическая дифференциация α -глюкозидаз дрожжей: мальтазы и изомальтазы // Микробиология. 2012. Т. 81. № 3. С. 301–305.
- Naumov G.I., Naumoff D.G. Molecular genetic differentiation of yeast α -glucosidases: maltases and isomaltases // Microbiology (Moscow). 2012. V. 81. P. 278–282.
- Наумов Г.И., Кондратьева В.И., Наумова Е.С. Таксономическая генетика дрожжей рода *Zygowillipsis* // Генетика. 2009. Т. 45. № 12. С. 1609–1615.
- Naumov G.I., Kondrat'eva V.I., Naumova E.S. Taxonomic genetics of *Zygowillipsis* yeasts // Russian J. Genet. 2009. V. 45. P. 1422–1427.
- Наумов Г.И., Никоненко Т.А., Кондратьева В.И. Таксономическая идентификация сахаромицетов Дрожжевого генетического центра Калифорнийского университета // Генетика. 1994. Т. 30. № 1. С. 45–48.
- Naumov G.I., Nikonenko T.A., Kondrat'eva V.I. Taxonomic identification of *Saccharomyces* from the yeast genetic stock center of the University of the California // Russian J. Genet. 1994. V. 30. P. 38–41.
- Наумов Г.И., Пишкур Ю. О феромонной активности музейных штаммов дрожжей *Saccharomyces sensu lato* // Микробиология. 1999. Т. 68. № 6. С. 860–863.
- Naumov G.I., Piskur J. Pheromone activity of collection strains of *Saccharomyces sensu lato* yeasts // Microbiology (Moscow). 1999. V. 68. P. 759–762.
- Наумов Г.И., Шаламитский М.Ю., Мартыненко Н.Н., Наумова Е.С. Молекулярная филогения пектиназных генов PGU дрожжей рода *Saccharomyces* // Микробиология. 2016. Т. 85. № 6. С. 703–712.
- Naumov G.I., Shalamitskiy M.Yu., Martynenko N.N., Naumova E.S. Molecular phylogeny of pectinase genes PGU in the yeast genus *Saccharomyces* // Microbiology (Moscow). 2016. V. 85. P. 734–743.
- Наумов Г.И., Юркевич Е.В. Опероноподобная система дрожжей // Вест. Моск. ун-та. Сер. 16. Биология. 1985. Т. 40. № 3. С. 40–42.
- Шаламитский М.Ю., Наумов Г.И. Филогенетический анализ пектиназ аскомицетных дрожжей // Биотехнология. 2017. Т. 33. № 6. С. 28–36.
- Shalamitskiy M.Yu., Naumov G.I. Phylogenetic analysis of pectinases of ascomycetous yeasts // Appl. Biochem. Microbiol. (Moscow). 2018. V. 54. № 7.
- Brown C.A., Murray A.W., Verstepe K.J. Rapid expansion and functional divergence of subtelomeric gene families in yeast // Curr. Biol. 2010. V. 20. P. 895–903.
- Deng X., Petitjean M., Teste M.-A., Kooli W., Tranier S., Francois J.M., Parrou J.L. Similarities and differences in the biochemical and enzymological properties of the four isomaltases from *Saccharomyces cerevisiae* // FEBS Open Bio. 2014. V. 4. P. 200–212.
- Dujon B.A., Louis E.J. Genome diversity and evolution in the budding yeasts (*Saccharomycotina*) // Genetics. 2017. V. 206. № 2. P. 717–750.
- Goffeau A., Barrell B.G., Bussey H., Davis R.W., Dujon B., Feldmann H., Galibert F., Hoheisel J.D., Jacq C., Johnston M., et al. Life with 6000 genes // Science. 1996. V. 274. № 5287. P. 546–567.
- Kellis M., Birren B.W., Lander E.S. Proof and evolutionary analysis of ancient genome duplication in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* // Nature. 2004. V. 428. P. 617–624.
- McCullough J., Herskowitz I. Mating pheromones of *Saccharomyces kluyveri*: pheromone interactions between *Saccharomyces kluyveri* and *Saccharomyces cerevisiae* // J. Bacteriol. 1979. V. 138. P. 146–154.
- Mortimer R.K., Johnston J.R. Genealogy of principal strains of the yeast genetic stock center // Genetics. 1986. V. 113. P. 35–43.
- Naumoff D.G. Sequence-based classification of yeast glycoside hydrolases: CAZy vs. Génolevures // III Межд. Конф. “Математическая биология и биоинформатика”. Пушкино (10–15 октября 2010 г.). М.: Макс-Пресс, 2010. С. 139–140.
- Naumova E.S., Naumov G.I., Masneuf-Pomarède I., Aigle M., Dubourdieu D. Molecular genetic study of introgression between *Saccharomyces bayanus* and *S. cerevisiae* // Yeast. 2005. V. 22. P. 1099–1115.
- Naumova E.S., Naumov G.I., Michailova Y.V., Martynenko N.N., Masneuf-Pomarède I. Genetic diversity study of the yeast *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* reveals introgressed subtelomeric *Saccharomyces cerevisiae* genes // Res. Microbiol. 2011. V. 162. P. 204–213.

Needleman R.B., Kaback D.B., Dubin R.A., Perkins E.L., Rosenberg N.G., Sutherland A., Forrest D.B., Michels C.A. MAL6 of *Saccharomyces*: a complex genetic locus containing three genes required for maltose fermentation // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1984. V. 81. P. 2811–2815.

Scannell D.R., Butler G., Wolfe K.H. Yeast genome evolution – the origin of the species // Yeast. 2007. V. 24. P. 929–942.

Souciet J.-L., Dujon B., Gaillardin C. et al. Comparative genomics of protoploid *Saccharomycetaceae* // Genome Res. 2009. V. 19. P. 1696–1709. doi 10.1101/gr.091546.109

Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipiński A., Kumar S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. // Mol. Biol. Evol. 2013. V. 30. P. 2725–2729.

Teste M.-A., François J.M., Parrou J.-L. Characterization of a new multigene family encoding isomaltases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, the IMA family // J. Biol. Chem. 2010. V. 285. P. 26815–26824.

Yamamoto K., Nakayama A., Yamamoto Y., Tabata S. Val 216 decides the substrate specificity of α -glucosidase in *Saccharomyces cerevisiae* // Eur. J. Biochem. 2004. V. 271. № 16. P. 3414–3420.

Phylogenetic Origin of the MAL and IMA α -Glucosidases MAL of the International Genetic Line of *Saccharomyces cerevisiae* S288C

G. I. Naumov^{1,†}, A. N. Borovkova^{1,2}, A. V. Shnyreva², and E. S. Naumova^{1,*}

¹State Research Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, NRC “Kurchatov Institute”, Moscow, 117545 Russia

²Department of Mycology and Algology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: lena_naumova@yahoo.com

Received 18 July, 2018

Revised August 27, 2018

Accepted October 2, 2018

Abstract—Taking into account the accepted concept of the ancient whole genome duplication (WGD) in the yeast genus *Saccharomyces*, comparative analysis of the multiple α -glucosidases MAL and IMA of the genetic line *Saccharomyces cerevisiae* S288C and α -glucosidases of protoploid yeasts *Kluyveromyces* and *Lachancea*, which have not experienced genome duplication, was carried out. Only certain MAL and IMA isoforms of the latter two genera were shown to be in a close phylogenetic relationship to α -glucosidases MAL12, MAL32, and IMA1–IMA4 of *S. cerevisiae* S288C, while others were closer to the divergent IMA5. These results are consistent with the WGD concept, according to which the yeast *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, and *Lachancea* originated from the common protoploid ancestor and may therefore have common closely related α -glucosidases MAL and IMA. The identity of amino acid sequences of the IMA1–IMA4 isomaltases of *S. cerevisiae* S288C to those of *L. dasiensis*, *L. fantastica*, *L. fermentati*, *L. lanzarotensis*, *L. meyersii*, *L. quebecensis*, and *L. thermotolerans* was 75–100%, while identity of the MAL maltases of the same species was 75–99%. Importantly, the MAL and IMA α -glucosidases diverged independently in each genus, species, and even strain.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, the MAL and IMA genes, genome duplication, isomaltase, maltase, protoploid, phylogeny of α -glucosidases

ХАРАКТЕРИСТИКА И ОСОБЕННОСТИ C₁-МЕТАБОЛИЗМА НОВОГО
ГРАМПОЛОЖИТЕЛЬНОГО ФАКУЛЬТАТИВНОГО МЕТИЛОТРОФА
RHODOCOCCLUS WRATISLAVIENSIS© 2019 г. Е. Н. Капаруллина^а*, Ю. А. Троценко^а, Н. В. Доронина^а^аИнститут биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина Российской академии наук, Пуццино, Россия

*e-mail: lenokap80@gmail.com

Поступила в редакцию 24.04.2018 г.

После доработки 10.09.2018 г.

Принята к публикации 02.10.2018 г.

Из прибрежной зоны Азовского моря выделен факультативно метилотрофный штамм 2AzMo (ВКМ Ас-2782). Изолят представлен аэробными грамположительными неподвижными палочками. Оптимально растет при 1% NaCl, 28°C и pH 7.5 с 1% CH₃OH или 0.3% метиламина в качестве источников углерода и энергии. Использует также широкий спектр полурасщепленных субстратов. Секвенирование гена 16S рРНК штамма 2AzMo выявило сходство с представителями рода *Rhodococcus*: 99.9% с *R. wratislaviensis* IEGM 1112^T (=NCIMB 13082^T), 99.4% с *R. imtechensis* IEGM 940^T (=RKJ300^T) и 99.2% с *R. koreensis* IEGM 962^T (=DNP505^T). Уровень ДНК–ДНК гомологии штамма 2AzMo с *R. wratislaviensis* IEGM 1112^T (=NCIMB 13082^T) составил 76%, что указывает на его принадлежность к данному виду. Однако в отличие от нашего изолята, типовой штамм *R. wratislaviensis* IEGM 1112^T, а также другие родококки (*R. imtechensis* IEGM 940^T, *R. koreensis* IEGM 962^T, *R. opacus* IEGM 716^T), не растут на метаноле и метиламине. Окисление метанола у *Rhodococcus wratislaviensis* 2AzMo катализируется алкогольдегидрогеназой, использующей в качестве искусственного акцептора электронов 4-нитрозо-N,N-диметиланилин, тогда как метиламин окисляется метиламиндегидрогеназой и посредством системы ферментов N-метилглутаматного пути. Ассимиляция образующегося формальдегида осуществляется во фруктозобисфосфатальдозаальном варианте рибулозозомонофосфатного пути C₁-метаболизма. Аммоний ассимилируется восстановительным аминированием α-кетоглутарата и посредством глутаматного цикла.

Ключевые слова: *Rhodococcus*, метилотроф, метаболизм, метанол, метиламин

DOI: 10.1134/S0026365618060101

Наземные и морские экосистемы – источники метанола, метиламина и других C₁-соединений, которые являются субстратами для специализированной группы аэробных метилотрофных бактерий (Троценко и соавт., 2010). Метанол – широко распространенное соединение, которое образуется в результате деметилирования пектина клеточных стенок при активном росте клеток растений и является основным летучим органическим метаболитом растений, поскольку его эмиссия в атмосферу составляет более 100 Тг/год (Федоров и соавт., 2011). Метанол выделяется при сжигании биомассы, деградации лигнина, в гидротермальных системах морского дна и при вулканической деятельности (Dorokhov et al., 2015). Кроме того, метанол образуется метанотрофными бактериями при окислении метана и является одним из метаболитов архей (Троценко, Хмельникова, 2008; Chistoserdova, Lidstrom, 2013; Chistoserdova, Kaluzhnaya, 2018; Enzmann et al., 2018). Способностью к метилотрофии обладают не

только грамтрицательные, но и грамположительные прокариоты родов *Amicilatopsis*, *Arthrobacter*, *Mycobacterium*, *Bacillus*. Известно несколько путей окисления метанола. У большинства грамтрицательных бактерий ключевую роль в окислении метанола до формальдегида играют PQQ-кальций зависимые этанол/метанолдегидрогеназы (*MxaFI*) (Троценко и соавт., 2010). Однако недавно обнаружены метилотрофы, имеющие лантанидсодержащую метанолдегидрогеназу (*XoxF*) (Vu et al., 2016; Chu, Lidstrom, 2016). У грамположительных факультативных метилотрофов окисление метанола осуществляется либо НАД⁺-зависимой формой этого фермента (*Bacillus methanolicus* C1) (Dijkhuizen, Arfman, 1990; Hektor et al., 2002), либо метанол: 4-нитрозо-N,N-диметиланилин (НДМА) оксидоредуктазами (никотинпротеиновыми метанолдегидрогеназами), как у *Amicilatopsis methanolica*, *Mycobacterium gastris* MB19 (Van Ophem et al., 1993; Bystrykh et al., 1993). Известно, что у представителей рода *Rhodococcus*,

растущих на этаноле, также функционируют НАД(Ф)⁺- и НДМА-зависимые алкогольдегидрогеназы (Van Ophem et al., 1993; Schenkels, Duine, 2000), причем НДМА-зависимые ферменты родококков способны окислять как этанол, так и метанол (Пириг и соавт., 2008).

Среди широкого спектра C₁-соединений биогенного и абиогенного происхождения можно выделить также метилированные амины – восстановленные формы органического азота, которые образуются в природе как побочные продукты разложения белков, аминокислот, некоторых алкалоидов, азотсодержащих пестицидов, присутствуют в растительных и животных тканях как естественные продукты азотного обмена. В морской среде метиламин высвобождается при деградации четвертичных аминов, таких как бетаин, карнитин, холин и N-оксид триметиламина, которые используются в качестве осмолитов многими морскими организмами (Nayak et al., 2015; Suleiman et al., 2016). Метиламин может использоваться путем прямого окисления до формальдегида с помощью метиламиндегидрогеназы – (МАДГ) или метиламинооксидазы – (МАО), или через опосредованные пути, включающие перенос метильных групп на аминокислоты (глутамат, аланин или их кетоаналоги) с последующим окислением соответствующих N-метилированных аминокислот. Этот двустадийный механизм получил название N-метилглутаматного (N-МГ) пути (Троценко и соавт., 2010).

Недавно из прибрежной зоны Азовского моря нами был выделен новый факультативный метилотроф, отнесенный к роду *Rhodococcus*. Метилотрофные представители рода *Rhodococcus* до сих пор были неизвестны, хотя родококки распространены повсеместно, и уже валидно описаны 63 вида (<http://www.bacterio.cict.fr/qr/rhodococcus.htm>). Детальное исследование путей метаболизма метанола и метиламина у нового метилотрофного родококка представляется актуальным.

Цель работы – таксономическая и метаболическая характеристика нового грамположительного факультативного метилотрофа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования. Штамм 2AzMo (VKM Ac-2782) был выделен из песка прибрежной зоны Азовского моря (Крым, Россия) (45°27'25.1" с.ш., 36°27'59.7" в.д.). Навеску песка (5 г) помещали в колбу Эрленмейера (750 мл) с 200 мл среды “К” и 0.5% (об./об.) метанола. Среда “К” содержала (г/л): KH₂PO₄ – 2.0; (NH₄)₂SO₄ – 2.0; NaCl – 0.5; MgSO₄ · 7H₂O – 0.1; FeSO₄ · 7H₂O – 0.002; pH 7.4. Накопительную и чистую культуру получали, как описано ранее (Kaparullina et al., 2017). Чистоту культуры проверяли световой микроскопией, а

также по однородности колоний на агаризованных средах “К” с метанолом и Лурия-Бертани. В качестве референтных использовали типовые культуры родококков (*R. wratislaviensis* IEGM 1112^T = NCIMB 13082^T, *R. imtechensis* IEGM 940^T = RKJ300^T, *R. koreensis* IEGM 962^T = DNP505^T, *R. opacus* IEGM 716^T), любезно предоставленные руководителем коллекции, академиком РАН И.Б. Ившиной (Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН г. Пермь).

Изучение культуральных и физиолого-биохимических свойств изолята. Для изучения морфологии и подвижности клеток штамм 2AzMo выращивали на агаризованных средах “К” и Лурия-Бертани (2% агар “Difco”, США). Наличие оксидазы определяли, используя 1% (в./об.) раствор тетраметил-*p*-фенилендиамина дигидрохлорида. Активность каталазы выявляли, нанося 3%-ый раствор перекиси водорода на штрих культуры, выращенной на агаризованной среде.

Температурный диапазон роста определяли, выращивая культуру в жидкой среде “К” с метанолом в герметично закрытых флаконах на качалке (120 об./мин) при температуре 4–43°C. Рост изолята при различных значениях концентрации метанола (0.1–7.0%, об./об.), солёности (0–7% NaCl) и pH исследовали на среде “К”. Значения pH устанавливали добавлением 1 M NaOH и 5 n HCl, оптимум pH определяли по удельной скорости роста штамма при исходных значениях pH 5.0–10.0 среды.

При изучении способности изолята использовать различные органические соединения в качестве источника углерода и энергии в минеральную среду вместо метанола вносили 0.05–0.3% (в./об.) испытуемого вещества, инокулировали ночной культурой и инкубировали 14 сут на качалке при оптимальной температуре. Все летучие вещества вносили в количестве 0.5% по объёму среды.

Для определения спектра используемых субстратов и выявления некоторых биохимических свойств исследуемого штамма использовали также API тесты (API 20E, API 20NE; “Biomegieux”, Франция), следуя инструкции производителя. Рост в атмосфере метана, дихлорметана или H₂/CO₂/O₂ и чувствительность к антибиотикам анализировали, как описано ранее (Kaparullina et al., 2017). Образование индола из L-триптофана анализировали с реактивом Сальковского (Gordon, Weber, 1951). Калибровочную кривую строили со стандартными растворами индолилуксусной кислоты.

Микроскопия. Изучение морфологии и подвижности клеток в режиме фазового контраста проводили с помощью оптического микроскопа Nikon Eclipse Ci (“Nikon”, Япония), оснащенного камерой ProgRes SpeedXT core5 (“Jenoptik”, Германия).

Энзимологический анализ проводили в бесклеточном экстракте, как описано ранее (Доронина и соавт., 2018). Активность никопротеиновой метанолдегидрогеназы определяли спектрофотометрически по восстановлению 4-нитрозо-N,N-диметиланилина при 440 нм с метанолом в качестве донора электронов (Van Ophemmet et al., 1993). Активность ферментов выражали в наномолях потребленного субстрата или образованного продукта за 1 мин в пересчете на 1 мг белка. Количественное определение белка проводили методом Лоури (Lowry et al., 1951).

RAPD-анализ (метод случайной амплификации полиморфной ДНК) проводили, используя праймеры OPQ1, OPQ6 (Balachandar et al., 2008).

MALDI-TOF/MS анализ. Для получения MALDI спектров бактериальных экстрактов использовали MALDI-TOF Autoflex Speed масс-спектрометр ("Bruker Daltonik GmbH", Германия), согласно ранее описанной методике (Horneffer et al., 2004).

Выделение и анализ ДНК. ДНК выделяли с использованием набора ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep ("Zymo Research", США) в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя. Ген 16S рРНК амплифицировали ПЦР, используя универсальные для прокариот праймеры 27f и 1492r (Lane, 1991). Продукты реакции разделяли методом электрофореза в 1%-ом агарозном геле. Выделение и очистку фрагментов ДНК из легко плавкой агарозы проводили на колонках с использованием набора ZymoClean Gel DNA Recovery Kit ("Zymo Research", США), согласно инструкции фирмы-производителя. Секвенирование ПЦР-фрагментов проводили с помощью набора реактивов CEQ Dye Terminator Cycle Sequencing kit ("Beckman Coulter", США) на анализаторе CEQ2000 XL ("Beckman Coulter", США). Определение Г + Ц состава ДНК и ДНК-ДНК гибриризации проводили, как описано ранее (Doronina et al., 2013).

Филогенетический анализ. Предварительный анализ сходства последовательностей гена 16S рРНК проводили по базе данных GeneBank [NCBI] с помощью пакета программ BLAST [http://ncbi.nlm.nih.gov]. Для более точного определения филогенетического положения изолята нуклеотидные последовательности гена 16S рРНК выравнивали с последовательностями референтных штаммов с помощью программы CLUSTAL W (Thompson et al., 1997). Филогенетический анализ выполнен при помощи программы MEGA 5 (Tamura et al., 2011). Филогенетические деревья (филограммы) строили методом присоединения соседей ("neighbor-joining") (Saitou, Nei, 1987). Статистическую достоверность ветвления оценивали с помощью "bootstrap-анализа" 100 альтернативных филограмм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Морфологические, культуральные и физиолого-биохимические свойства изолята. Штамм 2AzMo представлен грамположительными, неподвижными прямыми или ветвящимися палочками (рис. 1). На агаризованной минеральной среде с метанолом колонии желто-коричневые (на среде Лурия-Бертани – кремовые), дочерные, с выпуклым профилем, неровным краем и шероховатой поверхностью. Штамм 2AzMo рос в жидкой среде "К" с метанолом или Лурия-Бертани без агрегации клеток и образования пигмента. Строгий аэроб, каталазо- и оксидазоположительный, в витаминах не нуждается. Не рос в атмосфере H₂/O₂/CO₂, метана и дихлорметана. Рост наблюдался на средах с сахарозой, раффинозой, маннитом, аланином, цитратом, инозитом, фруктозой, мальтозой, глюкозой, ацетатом, фенилацетатом, цитратом, глутаматом, сукцинатом, глюконатом, лактозой, маламатом, α-кетоглутаратом, пируватом, метиламином, диметиламином, метанолом, этанолом, диметилсульфоксидом, глицерином, формальдегидом, ацетоном, Tween 20, пропанолом, бензолом, гептаном, толуолом. Однако штамм 2AzMo не использовал серин, арабинозу, ксилозу, формиат, ацетамид и триметиламин. Исследуемый штамм не способен к нитратредукции. Не имел активностей лизин- и орнитиндекарбоксилаз, аргининдигидролазы, β-глюко- и β-галактозидазы. Не гидролизировал желатин, не образовывал сероводород и ацетон. Уреазаположителен. Синтезировал 6 ± 1 мкг/мл индолпроизводных из L-триптофана. Рос в диапазоне температур 4–37°C и при pH 4.0–9.0, оптимально при 28°C и pH 7.5 в присутствии 0.5–1% метанола и 1% NaCl, но ингибировался 7% NaCl. Чувствителен к гентамицину, стрептомицину, линкомицину, неомицину, тетрациклину, новобиоцину, пенициллину, канамицину, хлорамфениколу, эритромицину и устойчив к оксациллину и налидиксовой кислоте.

Генотипическая характеристика. Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК показал, что исследуемый штамм 2AzMo имел наибольшее сходство с представителями рода *Rhodococcus*: 99.9% с *R. wratislaviensis* IEGM 1112^T, 99.4% с *R. imtechensis* IEGM 940^T и 99.2% с *R. koreensis* IEGM 962^T (рис. 2). Поскольку выявлен высокий уровень сходства по 16S рРНК, для определения генотипических различий между штаммом 2AzMo и *R. wratislaviensis* IEGM 1112^T использовали также метод случайно амплифицируемой полиморфной ДНК (RAPD-анализ). Результаты RAPD-анализа показали, что штаммы имеют различные паттерны продуктов амплификации, однако результаты, полученные с использованием MALDI-TOF/MS, выявили идентичность белковых профилей. Наряду с этим,

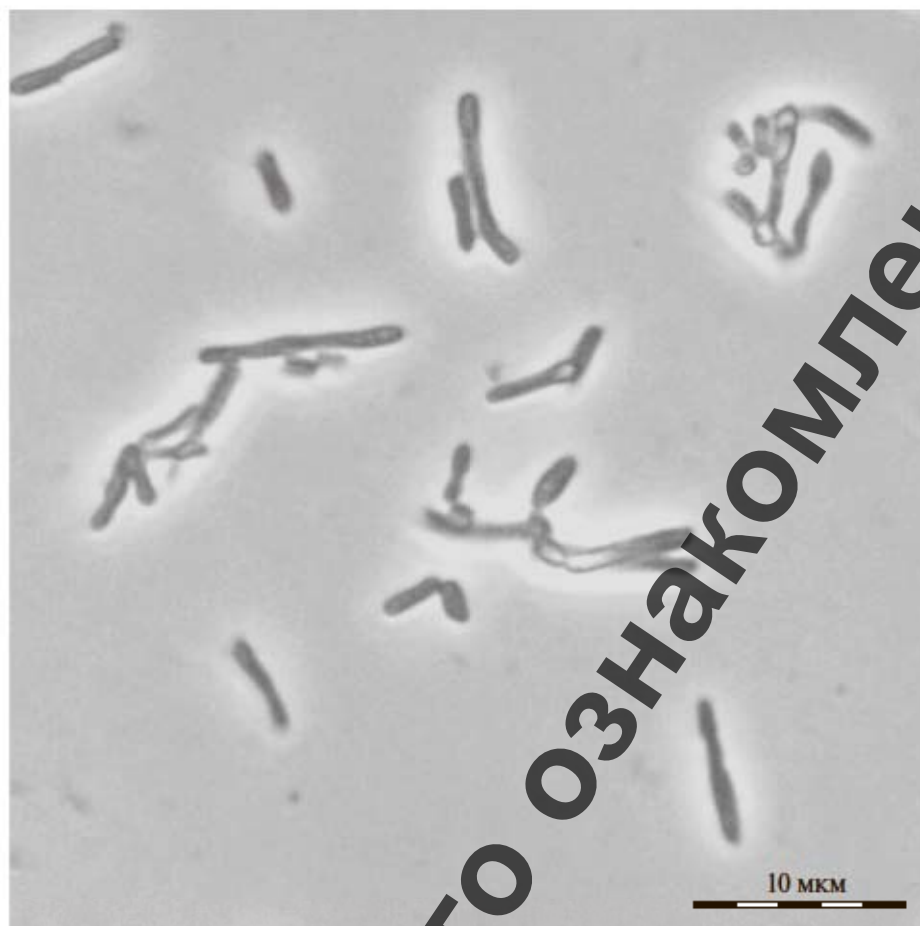


Рис. 1. Морфология клеток штамма 2AzMo, выращенного на метаноле. Фазовый контраст, длина масштабной метки 10 мкм.

ДНК-ДНК гомология между штаммом 2AzMo и *R. wratislaviensis* IEGM 1112^T составила 76%, что дало основание отнести наш изолят к данному виду.

Метаболическая характеристика. Результаты энзимологического анализа путей первичного и промежуточного метаболизма клеток *R. wratislaviensis* 2AzMo, выращенных на метаноле, представлены в табл. 1. В экстрактах клеток не были обнаружены активности классической PQQ-зависимой и НАД⁺-зависимой метанолдегидрогеназ (МДГ). Вместе с тем выявлено, что исследуемый штамм окисляет метанол до формальдегида НДМА-зависимой алкогольдегидрогеназой, использующей в качестве искусственного акцептора электронов НДМА, что, по-видимому, является отличительной чертой этих ферментов у актинобактерий. Однако на основании анализа генома типовой штамм *R. wratislaviensis* NBRC 100605^T (NZ_BAWF01000000) установлено наличие в нем НДМА-зависимой МДГ (WP_037244517). Нами показано, что *R. wratislaviensis* NBRC 100605^T, *R. imtechensis* IEGM 940^T, *R. koreensis* IEGM 962^T,

R. opacus IEGM 716^T не росли на метаноле и метиламине. По аминокислотным последовательностям НДМА-зависимая метанолдегидрогеназа *R. wratislaviensis* NBRC 100605^T идентична более чем на 90% с таковым ферментом у представителей родов *Rhodococcus*, *Mycobacterium* и только на 66% ферментом у *Amycolatopsis methanolica* (AAF21473). У исследуемого нами штамма 2AzMo выявлены высокие активности дегидрогеназ формальдегида и формиата с искусственным акцептором электронов феназинметосульфатом (ФМС). Энзимологический анализ показал, что в экстрактах клеток отсутствовали активности специфических ферментов серинового и рибулозо-бисфосфатного путей, хотя в геномах некоторых родококков обнаружены последовательности большой субъединицы рибулозо-1,5-бисфосфат-карбоксилазы. Исследуемый штамм реализовал рибулозомонофосфатный путь C₁-метаболизма, о чем свидетельствовало наличие активности ключевого фермента этого пути – гексулозофосфатсинтазы (ГФС). Идентичность аминокислотных последовательностей ГФС типовой штамма

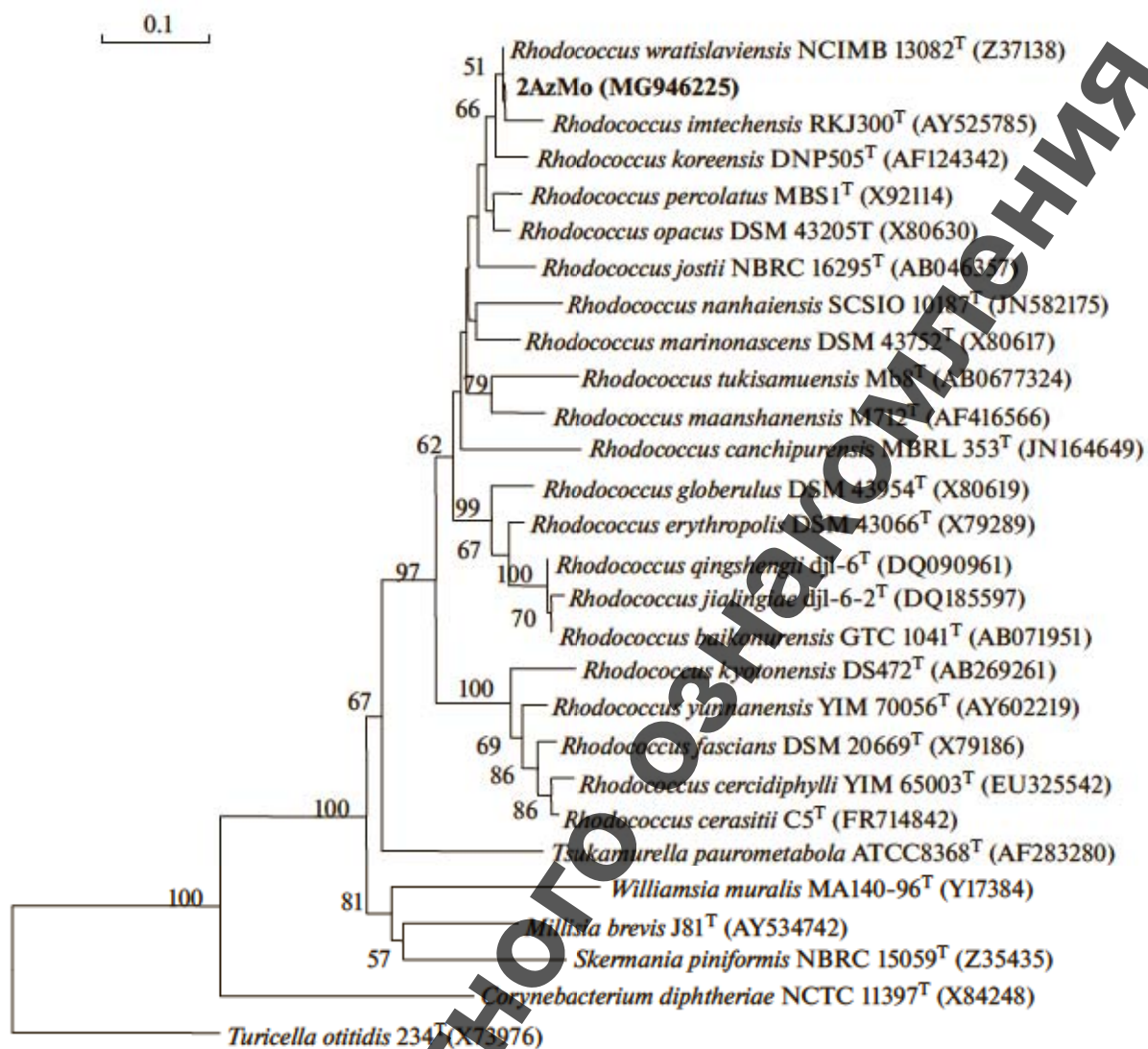


Рис. 2. Филограмма, показывающая положение штамма 2AzMo среди представителей рода *Rhodococcus* и близких родов актинобактерий, по результатам сравнения нуклеотидных последовательностей 16S рРНК. Масштаб соответствует 10 нуклеотидным заменам на каждые 100 нуклеотидов (эволюционным расстоянием). Корень определен включением последовательности *Turicella otitidis* 234^T (X73976) в качестве внешней группы. Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления, определенная с помощью "bootstrap"-анализа 100 альтернативных деревьев.

R. wratislaviensis NBRC 100605^T (WP_037231807) составляла более 90% от таковых у штаммов *R. opacus* (WP_005242427.1), *R. jostii* (WP_011600601), *R. koreensis* (WP_072949731) и *Rh. erythropolis* (WP_094617027). Штамм 2AzMo имел гексокиназу, активную с АТФ и ферменты окислительного пентозофосфатного пути (глюкозо-6-фосфат- и 6-фосфоглюколатдегидрогеназы). Активность альдозазы 2-кето-3-деокси-6 фосфоглюконата (путь Энтнера-Дудорова) отсутствовала. Обнаружена активность альдозазы фруктозо-1,6-бисфосфата, следовательно, данный штамм реализовал фруктозобисфосфатальдозазный вариант РМФ-пути. Штамм 2AzMo ассимилировал аммоний восстановительным аминированием α -кето-

глутарата и посредством функционирования ферментов глутаматного цикла.

Другим C₁-соединением, играющим важную биосферную роль, является метиламин. Результаты энзимологического анализа активностей ферментов путей первичного метаболизма метиламина у исследуемого штамма, выращенного на метиламине, а также на метаноле, представлены в табл. 2. Показано, что *R. wratislaviensis* 2AzMo реализовал прямой путь окисления метиламина до формальдегида, поскольку имел ФМС-зависимую МАДГ, активность которой в 1.5 раза выше у клеток, выращенных на метиламине, чем на метаноле. Активность другого фермента – оксидазы метиламина – была крайне слабой, что, вероятно,

Таблица 1. Активности ферментов первичного и промежуточного метаболизма в экстрактах клеток штамма *R. wratislaviensis* 2AzMo, выращенного на метаноле

Фермент	Кофактор	Активность, нмоль/мин · мг белка*
Метанолдегидрогеназа	НДМА**	26
	ФМС***	0
Формальдегиддегидрогеназа	НАД ⁺	0
	ФМС	25
Формиатдегидрогеназа	НАД ⁺	20
	ФМС	57
Гидроксипируватредуктаза	НАД ⁺	11
	НАДН	0
Серин-глиоксилатаминотрансфераза	НАДФН	0
	НАДН	0
Гексулозофосфатсинтаза	НАДН	0
	НАДФН	0
Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа	НАД ⁺	112
6-Фосфоглюконатдегидрогеназа	НАД ⁺	7
	НАДФ ⁺	118
2-Кето-3-дезоксиглюко-6-фосфоглюконатальдолаза	НАД ⁺	3
	НАДФ ⁺	103
Фруктозо-1,6-бисфосфатальдолаза		0
Рибулозобисфосфаткарбоксилаза		10
Гексокиназа		0
Изоцитратдегидрогеназа	АТФ	103
	НАД ⁺	41
Глутаматдегидрогеназа	НАДФ ⁺	9
	НАДН	0
Глутаматсинтаза	НАДФН	5
	НАДН	0
Глутаминсинтаза	НАДФН	19
	АТФ, Мп ²⁺	12

* Средние значения результатов трех независимых экспериментов (стандартная ошибка не превышала $\pm 5\%$).

** ФМС – феназинметосульфат.

***НДМА – 4-нитрозо-N,N-диметиламин.

исключает существенный вклад этого пути в окисление метиламина у исследуемого штамма. В геномах некоторых родококков нами выявлены аминдегидрогеназы, аминокислотные последовательности которых лишь на 30–42% идентичны МАДГ метилотрофных представителей родов *Methylophila* и *Methylobacterium*. Обнаружено, что активность НДМА-зависимой алкогольдегидрогеназы с этанолом в клетках, выращенных как на метаноле, так и на метиламине вдвое превышает активность фермента с метанолом (табл. 2). Активность другого фермента метаболизма метиламина, N-метилглутаматдегидрогеназы, катализирующей окислительный распад N-метилглу-

тамата до глутамата и формальдегида, была выше с ФМС, чем с НАД⁺. Также обнаружена активность N-метилглутаматоксидазы наиболее активной в клетках, выращенных на метиламине. У исследуемого штамма выявили активность γ -глутамилметиламидлиазы, которая катализирует превращение γ -глутамилметиламида до формальдегида и глутамата. Кроме того, обнаружили высокие активности γ -глутамилметиламидсинтазы (ГМАС) и N-метилглутаматсинтазы, что свидетельствовало о реализации N-метилглутаматного пути. Поиск гена ГМАС в геномах представителей рода *Rhodococcus* показал, что, скорее всего, этот фермент аннотирован как глутамат-

Таблица 2. Активности ферментов в экстрактах клеток штамма *R. wratislaviensis* 2AzMo, выращенного на метилamine (1) или метаноле (2)

Фермент	Кофактор	Активность*, нмоль/мин·мг белка	
		1	2
Метиламиндегидрогеназа	ФМС	45	27
N-метилглутаматдегидрогеназа	ФМС	79	57
	НАД ⁺	3	1
Никотинопротеин-метанол дегидрогеназа	НДМА	21	26
Никотинопротеин-этанол дегидрогеназа	НДМА	55	60
Метиламинооксидаза		5	1
N-метилглутаматоксидаза		37	11
γ-Глутамилметиламидлиаза	Mn ²⁺	50	Н.о.
γ-Глутамилметиламидсинтетаза	АТФ, Mg ²⁺	110	Н.о.
N-метилглутаматсинтаза	НАД ⁺	321	Н.о.

* Средние значения результатов трех независимых экспериментов (стандартная ошибка не превышала ± 5%). Н.о. – не определяли.

аммоний лигаза III типа и имеет 43–45% идентичности по белку ГМАС с представителями рода *Methylobacterium*. В геноме *R. jostii* RHA1 обнаружены ферменты ассимиляции триметиламина и

диметиламина, а также N-метилглутаматсинтаза, однако непонятно, каким образом может происходить дальнейшее превращение N-метилглутамата у данного штамма. На основании результатов на-

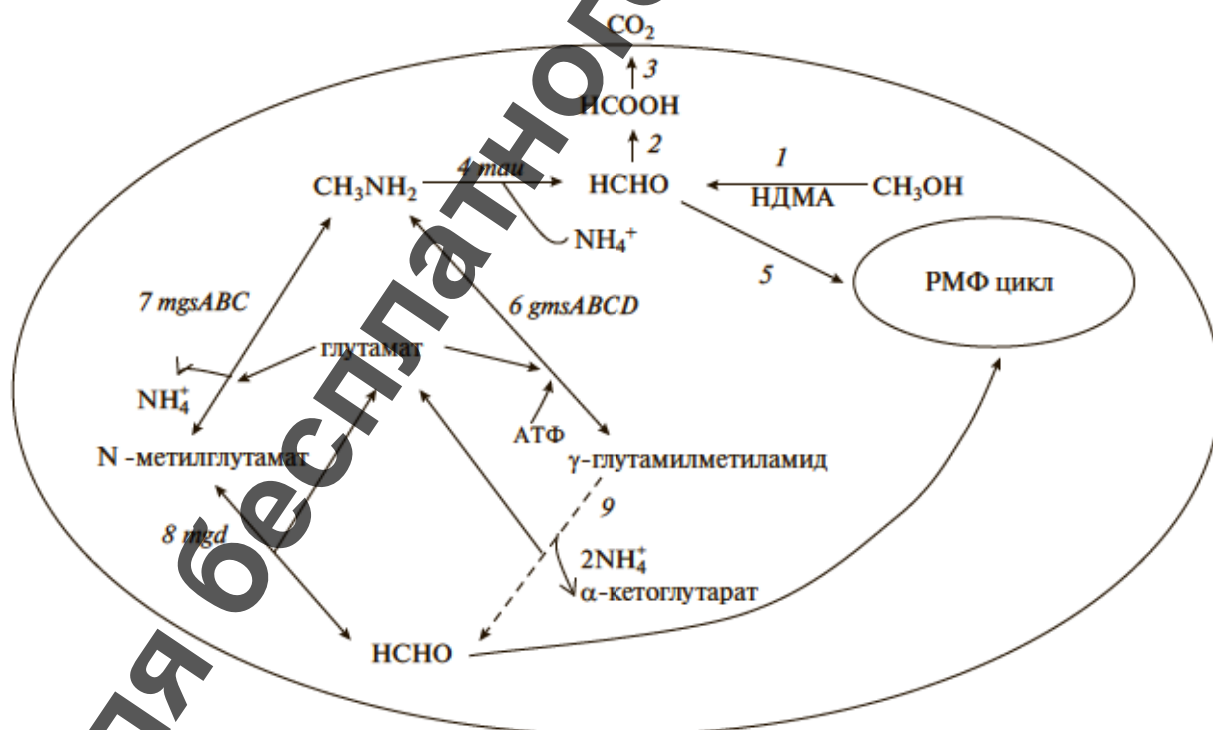


Рис. 3. Схема окисления метанола и метиламина у *Rhodococcus wratislaviensis* 2AzMo. 1 – НДМА метанолдегидрогеназа; 2 – формальдегиддегидрогеназа; 3 – формиатдегидрогеназа; 4 – моноаминооксидаза или метиламиндегидрогеназа; 5 – гексозофосфатсинтаза; 6 – γ-глутамилметиламидсинтетаза; 7 – N-метилглутаматсинтаза; 8 – N-метилглутаматдегидрогеназа; 9 – γ-глутамилметиламидлиаза.

ших исследований представлена схема метаболизма метанола и метиламина у *R. wratislaviensis* 2AzMo (рис. 3).

Таким образом, нами впервые представлено доказательство способности родококков к метилотрофии. Исследованные пути метаболизма метанола и метиламина у метилотрофного представителя рода *Rhodococcus* позволяют раскрыть важную биосферную роль этого микроорганизма и его перспективность в будущем для применения в различных биотехнологиях, в том числе для создания биофильтров и биосенсоров для разложения и детекции поллютантов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Доронина Н.В., Капаруллина Е.Н., Чемодурова А.А., Троценко Ю.А. *Paracoccus simplex* sp. nov. — новый факультативный метилотроф, использующий метиламин // Микробиология. 2018. Т. 87. № 5. (в печати).
- Doronina N.V., Kaparullina E.N., Chemodurova A.A., Trotsenko Yu.A. *Paracoccus simplex* sp. nov. — a new facultative methylotroph, utilizing methylamine // Microbiology (Moscow). 2018. V. 87. (In press).
- Пирог Т.П., Корж Ю.В., Шевчук Т.А., Тарасенко Д.А. Особенности C₂-метаболизма и интенсификация синтеза поверхностно-активных веществ у штамма *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1, растущего на этаноле // Микробиология. 2008. Т. 77. № 6. С. 749–757.
- Pirog T.P., Korzh Yu.V., Shevchuk T.A., Tarasenko D.A. Peculiarities of C₂ metabolism and intensification of the synthesis of surface-active substances in *Rhodococcus erythropolis* EK-1 grown in ethanol // Microbiology (Moscow). 2008. T. 77. C. 665–673.
- Троценко Ю.А., Хмеленина В.Н. Экстремофильные метанотрофы. Отв. ред.: Гальченко В.Ф. Пушино: ОНТИ ПНЦ РАН, 2008. 205 с.
- Троценко Ю.А., Доронина Н.В., Торгонская М.А. Аэробные метилотрофы. Отв. ред. Гальченко В.Ф. Пушино: ОНТИ ПНЦ РАН, 2010. 325 с.
- Федоров Д.Н., Доронина Н.В., Троценко Ю.А. Фитосимбиоз аэробных метилотрофов: новые факты и гипотезы // Микробиология. 2011. Т. 80. № 4. С. 435–446.
- Fedorov D.N., Doronina N.V., Trotsenko Y.A. Phytosymbiosis of aerobic methylotrophs: New facts and views // Microbiology (Moscow). 2011. T. 80. C. 443–454.
- Balachandar D., Raja P., Sundaram S.P. Genetic and metabolic diversity of pink-pigmented facultative methylotrophs in phyllosphere of tropical plants // Braz. J. Microbiol. 2008. V. 39. P. 68–75.
- Bystrykh L.V., Vonck J., Van Bruggen E.F., van Beeumen J, Samyn B., Govorukhina N.I., Arfman N., Duine J.A., Dijkhuizen L. Electron microscopic analysis and structural characterization of novel NADP(H)-containing methanol: N,N'-dimethyl-4-nitrosoaniline oxidoreductases from the gram-positive methylotrophic bacteria *Amycolatopsis methanolica* and *Mycobacterium gastri* MB19 // J. Bacteriol. 1993. V. 175. P. 1814–1822.
- Chistoserdova L., Lidstrom M.E. Aerobic methylotrophic prokaryotes // The Prokaryotes / Eds. Rosenberg E., DeLong E.F., Lory S., Stackebrandt E., Thompson F. Berlin, Heidelberg: Springer, 2013. P. 267–285.
- Chistoserdova L., Kalyuzhnaya M.G. Current Trends in Methylotrophy // Trends Microbiol. 2018. pii: S0966-842X(18)30023-4. doi 10.1016/j.tim.2018.01.011
- Chu F., Lidstrom M.E. XoxF acts as the predominant methanol dehydrogenase in the type I methanotroph *Methylomicrobium buryatense* // J. Bacteriol. 2016. V. 198. P. 1317–1325.
- Dijkhuizen L., Arfman N. Methanol metabolism in thermotolerant methylotrophic *Bacillus* sp. // Microbial growth on C₁-compounds / Eds. Andreasen J.R., Bowien B. FEMS Microbiol. Rev. 1990. V. 87. P. 215–219.
- Dorokhov Y.L., Shindyapina A.Y., Sheshukova E.V., Komarova T.V. Metabolic methanol: molecular pathways and physiological roles // Physiol. Rev. 2015. V. 95. P. 603–644.
- Doronina N.V., Kaparullina E.N., Trotsenko Y.A. *Methylomicrobium musalis* sp. nov., an aerobic facultatively methylotrophic bacterium isolated from banana fruit // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2013. V. 63. P. 1847–1852.
- Enzmann F., Mayer F., Rother M., Holtmann D. Methanogens: biochemical background and biotechnological applications // AMB Express. 2018. V. 8. P. 1–22.
- Gordon S.A., Weber R.P. Colorimetric estimation of indoleacetic acid // Plant Physiol. 1951. V. 26. P. 192–195.
- Hektor H.J., Kloosterman H., Dijkhuizen L. Identification of a magnesium-dependent NAD(P)(H)-binding domain in the nicotinoprotein methanol dehydrogenase from *Bacillus methanolicus* // J. Biol. Chem. 2002. V. 277. P. 46966–46973.
- Hornegger V., Haverkamp J., Janssen H.G., Steeg P.F., Notz R. MALDI-TOF-MS analysis of bacterial spores: wet heat treatment as a new releasing technique for biomarkers and the influence of different experimental parameters and microbiological handling // J. Am. Soc. Mass. Spectrom. 2004. V. 15. P. 1444–1454.
- <http://www.bacterio.cict.fr/qr/rhodococcus.htm>
- Kaparullina E.N., Trotsenko Y.A., Doronina N.V. *Methylomicrobium methanolivorans* sp. nov., a novel non-pigmented obligately methylotrophic bacterium // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2017. V. 67. P. 425–431.
- Lane D.J. 16S/23S rRNA sequencing in nucleic acid techniques in bacterial systematics // Eds. Stackebrandt E., Goodfellow M. Chichester: John Wiley and Sons, 1991. P. 115–175.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. 1951. V. 193. P. 265–275.
- Nayak D.D., Marx C.J. Experimental horizontal gene transfer of methylamine dehydrogenase mimics prevalent exchange in nature and overcomes the methylamine growth constraints posed by the sub-optimal N-methylglutamate pathway // Microorganisms. 2015. V. 3. P. 60–79.
- Saitou N., Nei M. The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees // Mol. Biol. Evol. 1987. V. 4. P. 405–425.
- Schenkels P., Duine J.A. Nicotinoprotein (NADH-containing) alcohol dehydrogenase from *Rhodococcus erythropolis* DSM 1069: an efficient catalyst for coenzyme-independent oxidation of broad spectrum of alcohols and interconversion of alcohols and aldehydes // Microbiology (SGM). 2000. V. 146. P. 775–785.

Suleiman M., Zecher K., Yücel O., Jagmann N., Philipp B. Interkingdom cross-feeding of ammonium from marine methylamine-degrading bacteria to the diatom *Phaeodactylum tricornutum* // Appl. Environ. Microbiol. 2016. V. 82. P. 7113–7122.

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

Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin, F., Higgins D.G. The ClustalX windows interface: flexible strat-

egies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools // Nucl. Acids Res. 1997. V. 25. P. 4876–4882.

Van Ophem P.W., van Beeumen J., Duine J.A. Nicotinoprotein (NAD(P)-containing) alcohol/aldehyde oxidoreductases. Purification and characterization of a novel type from *Amycolatopsis methanolica* // Eur. J. Biochem. 1993. V. 212. P. 819–826.

Vu H N., Subuyuj G.A., Vijayakumar S., Good N.M., Martinez-Gomez N.C., Skovran E. Lanthanide-dependent regulation of methanol oxidation systems in *Methylobacterium extorquens* AM1 and their contribution to methanol growth // J. Bacteriol. 2016. V. 198. P. 1250–1259.

Characterization of *Rhodococcus wratislaviensis*, a New Gram-Positive Facultative Methylotroph, and Properties of Its C₁ Metabolism

E. N. Kaparullina^{1,*}, Yu. A. Trotsenko¹, and N. V. Doronina¹

¹Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia

*e-mail: lenokap80@gmail.com

Received April 24, 2018

Revised September 10, 2018

Accepted October 2, 2018

Abstract—A facultative methylotroph, strain 2AzMo (VKM Ac-2782), was isolated from the coastal zone of the Sea of Azov. The cells of the isolate are aerobic gram-positive nonmotile rods. Optimal growth occurs at 1% NaCl, 28°C, and pH 7.5 with 1% CH₃OH or 0.3% methylamine as the carbon and energy sources. A broad spectrum of polycarbon substrates is also utilized. Sequencing of the 16S rRNA gene of the strain revealed its similarity to *Rhodococcus* species: 99.9% to *R. wratislaviensis* IEGM 1112^T (=NCIMB 13082^T), 99.4% to *R. imtechensis* IEGM 940^T (=RKJ300^T), and 99.2% to *R. koreensis* IEGM 962^T (=DNP505^T). The level of DNA–DNA homology of strain 2AzMo with *R. wratislaviensis* IEGM 1112^T (=NCIMB 13082^T) was 76%, supporting its identification as a strain of this species. However, unlike strain 2AzMo, the type strain *R. wratislaviensis* IEGM 1112^T, as well as other members of this genus (*R. imtechensis* IEGM 940^T, *R. koreensis* IEGM 962^T, and *R. opacus* IEGM 716^T), do not grow on methanol and methylamine. Methanol oxidation by *R. wratislaviensis* 2AzMo is catalyzed by alcohol dehydrogenase, which uses 4-nitroso-N,N-dimethylaniline as an artificial electron acceptor. Methylamine is oxidized by methylamine dehydrogenase and the enzymes of the N-methylglutamate pathway. Formaldehyde is then assimilated via the fructose bisphosphate aldolase variant of the ribulose monophosphate pathway of C₁ metabolism. Ammonium is assimilated by α-ketoglutarate reductive amination and via the glutamate cycle.

Keywords: *Rhodococcus*, methylotroph, metabolism, methanol, methylamine

ВЛИЯНИЕ КОНСТИТУТИВНОЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА *rapA1* НА ОБРАЗОВАНИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫХ БИОПЛЕНОК И РОСТОСТИМУЛИРУЮЩУЮ АКТИВНОСТЬ РИЗОБИЙ

© 2019 г. З. Р. Вершинина^а, Л. Р. Хакимова^а, А. М. Лавина^а, Л. Р. Каримова^а, Э. Р. Сербаева^б,
В. И. Сафронова^с, А. И. Шапошников^с, Ан. Х. Баймиев^а, Ал. Х. Баймиев^а, *

^аИнститут биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение ФГБНУ
Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, Россия

^бФГБОУ ВО Башкирский государственный университет, Уфа, Россия

^сФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт
сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург, Россия

*e-mail: baymiev@mail.ru

Поступила в редакцию 26.06.2018 г.

После доработки 03.09.2018 г.

Принята к публикации 02.10.2018 г.

Штаммы ризобий *R. leguminosarum* Pvu5, VSy12, Thy2, Trg4 и *R. galegae* 0702 были трансформированы векторной конструкцией pJN105TurboRapA1GFP, обеспечивающей конститутивную экспрессию генов *rapA1* и *gfp* для исследования влияния белка RapA1 на ростостимулирующую активность, образование биопленок и колонизацию корней растений. Показано, что конститутивная экспрессия гена *rapA1* повышает эффективность образования биопленок ризобиями на инертных поверхностях и способствует формированию микроколоний на поверхности корней растений. Проведенный анализ выработки ауксинов исходными и трансформированными штаммами показал, что у всех трансформированных штаммов, кроме *R. leguminosarum* Thy2, наблюдается снижение количества синтезированных ауксинов. Ростостимулирующая активность исходных и трансформированных штаммов не коррелирует с количеством ауксинов, продуцируемых бактериями *in vitro*.

Ключевые слова: клубеньковые бактерии, RapA1, агглютинация, биопленка, ауксин

DOI: 10.1134/S0026365619010105

Клубеньковые бактерии (ризобии), известные как азотфиксирующие микросимбионты бобовых растений, широко используются в качестве основы биопрепаратов в сельском хозяйстве. Огромную роль в выживании этих бактерий в почве и эффективном образовании клубеньков играет способность ризобий колонизировать корни и образовывать биопленки на поверхности корней растений (Fujishige et al., 2006; Amaya-Gómez et al., 2015). Успешное формирование биопленок клубеньковыми бактериями обусловлено целым рядом биотических и абиотических факторов, в том числе ризобиальными экзополисахаридами и Nod-факторами, корневыми экссудатами, pH, температурой и влажностью почвы и другими (Rinaudi, Giordano, 2010). Несомненно, важную роль на начальных стадиях формирования биопленок играют бактериальные адгезины, которые прикрепляют ризобии к корням. Это позволяет бактериям размножиться в условиях достаточного количества питательных веществ, поставляемых корневыми экссудатами растений. Кроме того, бакте-

риальные адгезины впоследствии обеспечивают стабильность образуемых биопленок (Dardanelli et al., 2003; Russo et al., 2006; Rinaudi, Giordano, 2010).

Адгезин RapA1, впервые описанный у *Rhizobium leguminosarum*, относится к внеклеточным белкам, связывающим кальций, и непосредственно принимает участие в колонизации корней растений (Ausmees et al., 2001; Mongiardini et al., 2008; Mongiardini et al., 2009). Ранее было показано, что высокий уровень белков Rap, включая RapA1, в штамме *R. leguminosarum* 3841 усиливает адгезию этого микросимбионта к корням гороха и способствует повышению числа клубеньков (Frederix et al., 2014). Аналогичные исследования были проведены на растениях фасоли. Было обнаружено, что усиление экспрессии *rapA1* в клетках *R. leguminosarum* Pvu5 способствует агрегации бактерий, положительно влияет на образование клубеньков на корнях и, соответственно, на эффективность фиксации азота в целом (Нигматуллина и соавт., 2015). Кроме того, было показано, что тройная

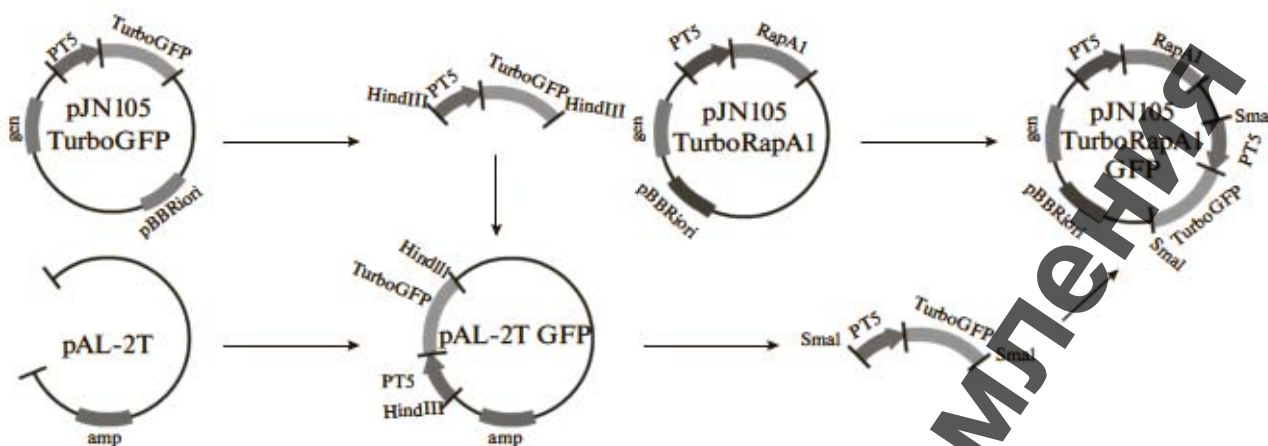


Рис. 1. Получение векторной конструкции pJN105TurboRapA1GFP.

симбиотическая система, включающая симбиотрофное растение, его микросимбионт, а также штамм-продуцент белка RapA1, может быть использована при создании эффективных биоудобрений (Хакимова и соавт., 2017).

Хотя ризобии общеизвестны как азотфиксирующие микросимбионты бобовых растений, они могут вступать в ассоциативные взаимоотношения и с небобовыми культурами, такими как рапс, томат, пшеница, рис, подсолнечник, спаржа, колонизируя корни без образования клубеньков и способствуя повышению урожайности за счет различных механизмов, в том числе, защищая растения от фитопатогенных грибов (Вершинина и соавт., 2015).

Для растений томата грибковые заболевания являются основным фактором потери урожая. Благодаря возможности использования ризобий в качестве фунгистатических агентов, их ассоциативным взаимодействиям с растениями томата посвящено достаточно много исследований (Siddiqui et al., 2001; Santillana et al., 2005; Garcia-Fraile et al., 2012; Вершинина и соавт., 2015). Одним из определяющих факторов для формирования успешных симбиотических ассоциаций томата с ризобиями является эффективная (с образованием биопленок) колонизация корней микросимбионтами (Вершинина и соавт., 2015).

Целью работы было получить штаммы ризобий с повышенной экспрессией гена *rapA1*, изучить их ростостимулирующие свойства на небобовых культурах, исследовать эффективность формирования данными штаммами биопленок на инертных поверхностях и колонизацию корней растений томата обыкновенного сорта Белый налив (*Lycopersicon esculentum*).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты и материалы исследования. Для получения рекомбинантных штаммов клубеньковых

бактерий была использована векторная конструкция pJN105TurboRapA1GFP, созданная на основе полученных ранее векторов pAL-2TGFP и pJN105TurboRapA1 (Нигматуллина и соавт., 2015; Лавина и соавт., 2017). Для этого из плазмиды pAL-2TGFP с помощью рестриктазы SmaI была вырезана последовательность ДНК, содержащая конститутивный промотор фага T5 и ген GFP. Затем эта последовательность ДНК была клонирована в вектор pJN105TurboRapA1 по сайту рестрикции SmaI (рис. 1).

В качестве объектов были использованы штаммы *Rhizobium* и *Neorhizobium* из коллекции клубеньковых и ризосферных бактерий "Симбионт" ИБГ УФИЦ РАН (в скобках указаны растения, из клубеньков которых данные штаммы были выделены):

1. *R. leguminosarum* Pvu5 (фасоль обыкновенная – *Phaseolus vulgaris*);
2. *R. leguminosarum* VSy12 (горошек лесной – *Vicia sylvatica*);
3. *R. leguminosarum* Thy2 (клевер розовый, гибридный – *Trifolium hybridum*);
4. *R. leguminosarum* TPr4 (клевер луговой – *Trifolium pratense*);
5. *N. galegae* (*R. galegae*) 0702 (козлятник восточный – *Galega orientalis*).

Филогенетическое положение бактерий было определено с помощью анализа нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК с использованием программы "MegaBlast".

Работа с ДНК. Выделение бактериальной ДНК, подготовка компетентных клеток и их трансформация, а также электрофорез фрагментов ДНК проводили по Sambrook et al. (1989). Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) осуществляли на приборе Терцик MC2 ("ДНК-технология", Россия) с использованием стандартных наборов для амплификации ДНК ("ДНК-технология",

Россия). Для поиска гена *rapA1* были использованы универсальные олигонуклеотидные праймеры, подобранные к кодирующей части гена: rapF (5'-atggctgttcacgcaaccgacgat-3') и rapR (5'-gcggcggg-cgtgtttttgattg-3').

Выделение белков из клеток бактерий и Вестерн-блот анализ. Для выделения белков из культуры бактериальных клеток был использован метод, описанный в работе Mongiardini et al. (2008). Перенос белков на PVDF мембрану ("BIO-RAD", США) для Вестерн-блот анализа проводили согласно методике Towbin et al. (1979) в приборе Mini Trans-Blot® Module 170-3924EDU ("Bio-Rad", США) при 4°C в течение 1 ч при напряжении 100 V и силе тока 18–22 мА. Для обнаружения белка RapA1 были использованы поликлональные кроличьи антитела, полученные к синтезированной аминокислотной последовательности, соответствующей нуклеотидной последовательности гена *rapA1* НПФ "Верта" (Россия). Детекцию первичных связанных с антигеном антител на мембране проводили с помощью вторичных кроличьих антител, меченных пероксидазой хрена HRP Jackson ("Immuno-Research Laboratorie", США). В качестве хромогена для диагностики был использован DAB ("Cell Marque Corporation", США).

Оценка накопления биомассы биопленок на инертных поверхностях. Биопленки, которые образуют штаммы на инертных поверхностях, исследовали с применением 96-луночных пластиковых планшетов. Для этого жидкую культуру ризобактерий выращивали в течение 2 сут в стеклянных колбах в жидкой среде YM (масс. % в водном растворе: маннитол – 1, дрожжевой экстракт – 0.04, NaCl – 0.01, MgSO₄ – 0.01, K₂HPO₄ · 3H₂O – 0.05) на качалке при 28°C и 140 об./мин до концентрации 10⁸ КОЕ/мл. Затем пипеткой отбирали 10 мкл жидкой культуры, разбавляли 1 : 10 свежей средой YM и помещали в одну из лунок 96-луночного пластикового планшета (полистирол). Планшеты герметизировали лентой Parafilm и инкубировали при 28°C и 140 об./мин в течение 7 сут. После инкубации с помощью пипетки удаляли питательную среду и планктонные клетки. Биопленки промывали стерильной дистиллированной водой и окрашивали 0.1% раствором генциана фиолетового. После инкубации в течение 10–15 мин при комнатной температуре краситель удаляли из лунки. Не связавшийся краситель тщательно смывали дистиллированной водой. Планшеты переворачивали на фильтровальную бумагу и высушивали. Окрашенные лунки микроскопировали с помощью флуоресцентного микроскопа Axio Imager M1 ("Carl Zeiss", Германия). Для оценки биомассы бактерий связавшийся с биопленками краситель растворяли, добавляя в каждую лунку по 200 мкл этанола. Далее растворы красителя пе-

реносили в новый планшет и измеряли оптическую плотность образцов при A590 ($l = 0.5$ см).

Исследование влияния ризобактерий на развитие корневой системы проростков растений. Ростостимулирующая активность ризобий была исследована на корнях растений томата обыкновенного сорта Белый налив (*Lycopersicon esculentum*), огурца обыкновенного сорта Апрельский (*Cucumis sativus*), моркови посевной сорта Тушон (*Daucus carota* subsp. *Sativus*) и амаранта багряного сорта Казанский (*Amaranthus cruentus*). Семена растений стерилизовали в течение 1 мин в 70% спирте, а затем в течение 20 мин в 5% растворе гипохлорита натрия. Далее семена 5 мин выдерживали в суспензии ризобий (1 мл бактериальной суспензии, доведенной до концентрации 10⁵ КОЕ/мл, на 1 г семян). Затем инокулированные семена раскладывали на влажную фильтровальную бумагу в чашки Петри. Часть семян оставили неинокулированными в качестве контроля. Неделю инкубировали при комнатной температуре.

Для определения ростостимулирующего эффекта ризобактерий на корневую систему проростков измеряли длину корня опытных проростков и сравнивали с длиной контрольных проростков.

Оценка способности ризобактерий продуцировать ауксины. Исходные и трансформированные штаммы культивировали в течение 7 сут в жидкой питательной среде MSMN (конечная концентрация бактерий на 7 сут ~10⁹ КОЕ/мл) с добавлением триптофана в качестве предшественника ауксинов согласно методу, описанному в статьях (Jiang et al., 2012; Belimov et al., 2015). Для выделения ауксинов культуральные жидкости и исходные стерильные среды экстрагировали этилацетатом, подкисленным 0.4 N HCl до pH 3.0. Полученные экстракты выпаривали при 35°C на вакуумном ротормном испарителе и растворяли в 0.5 мл 18% ацетонитрила с последующей фильтрацией через нейлоновый мембранный фильтр Spin-X с диаметром пор 0.2 мкм ("Corning", США). Анализ ауксинов в пробах проводили с помощью системы Waters ACQUITY UPLC H-класса ("Waters", США) на колонке с обращенной фазой Waters ACQUITY UPLC BEH Shield RP18 ("Waters", США) с флуоресцентным детектором. Ауксины разделяли 5 мин в линейном градиенте буфера ацетонитрил–вода–уксусная кислота от (1 : 99 : 0.1) до (18 : 82 : 0.1) с последующей 3-минутной изократической элюцией и 3-минутной промывки колонки при соотношении компонентов буфера 80 : 20 : 0.1. Скорость подачи буфера – 0.3 мл/мин.

Исследование характера колонизации бактериями корней растений. Семена томата стерилизовали, как описано выше, и проращивали в течение 1 нед. на влажной фильтровальной бумаге в чашках Петри. Инокуляцию растений проводили согласно методу, описанному в статье Шелудько и соавт.

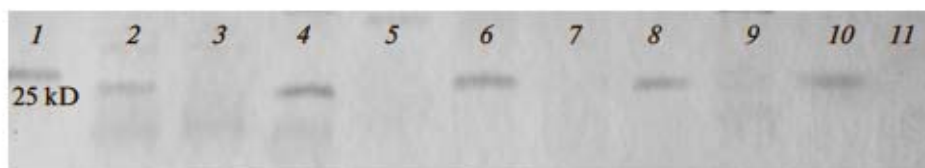


Рис. 2. Вестерн-блот анализ продукции белка RapA1 исходными и трансформированными штаммами бактерий: 1 – маркер; 2 – *R. leguminosarum* Pvu5 + pJN105TurboRapA1GFP; 3 – *R. leguminosarum* Pvu5; 4 – *R. leguminosarum* VSy12 + pJN105TurboRapA1GFP; 5 – *R. leguminosarum* VSy12; 6 – *R. leguminosarum* Thy2 + pJN105TurboRapA1GFP; 7 – *R. leguminosarum* Thy2; 8 – *R. leguminosarum* TPr4 + pJN105TurboRapA1GFP; 9 – *R. leguminosarum* TPr4; 10 – *R. galegae* 0702 + pJN105TurboRapA1GFP; 11 – *R. galegae* 0702.

(2010) с небольшими модификациями. Проростки выдерживали при покачивании (25 об./мин) в суспензии ризобий (10^5 КОЕ/мл) в 50 мМ фосфатно-солевом буфере (PBS, pH 7.2). Для приготовления суспензий использовали 2-сут культуры бактерий, выращенных в жидкой среде YM и отмытых от среды PBS. Через 3 ч проростки промывали стерильным PBS и помещали в пробирки, содержащие 10 мл жидкой среды MS (масс. % в водном растворе: соли MS – 0.47, сахароза – 3%, инозитол – 0.01; pH 5.8). Растения выращивали 7 сут при 25°C и естественном освещении. Затем проростки три раза промывали PBS (по 5 мин при покачивании 25 об./мин) и корни нарезали на фрагменты длиной 10–15 мм. Для определения количества адгезированных бактерий фрагменты корней взвешивали и гомогенизировали в 50 мкл жидкой среды YM. Полученный объем разбавляли в 1000 раз. 50 мкл этой суспензии рассеивали на агаризованную YM (агар-агар 1.5%) и выращивали в термостате при 28°C в течение 2 сут. Количество адгезированных бактерий определяли по числу выросших колоний. Образование биопленок на поверхности корневых волосков растений определяли с использованием флуоресцентного микроскопа Axio Imager M1 (“Carl Zeiss”, Германия).

Статистическая обработка результатов. Во всех случаях проводили не менее пяти независимых экспериментов как минимум в пяти повторностях. Оценку биомассы биопленок каждого штамма выполняли не менее десяти раз. Каждый раз окрашивали биопленки, сформированные в десяти ячейках полистирольных планшетов. Результаты обрабатывали с использованием пакета Microsoft Office Excel 2010, доверительные интервалы определяли для 95% уровня значимости.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получение трансформированных штаммов ризобий и образование биопленок на инертных поверхностях. Методом ПЦР с использованием специфичных праймеров ген *rapA1* был выявлен во всех исходных штаммах *R. leguminosarum* и не обнаружен у *N. galegae* 0702. Это согласуется с данными работы (Ausmees et al., 2001), где ген *rapA1*

обнаруживался только у небольшой группы ризобий: *R. leguminosarum* и *R. etli*.

В дальнейшем все исследуемые штаммы: *R. leguminosarum* Pvu5, *R. leguminosarum* VSy12, *R. leguminosarum* Thy2, *R. leguminosarum* TPr4 и *N. galegae* 0702 были трансформированы векторной конструкцией pJN105TurboRapA1GFP, обеспечивающей конститутивную экспрессию генов *rapA1* и *gfp*. У трансформированных штаммов не было выявлено никаких изменений фенотипа по сравнению с исходными штаммами, кроме наличия зеленой флуоресцентной метки. Вестерн-блот анализ показал наличие белка RapA1 в трансформированных штаммах и его отсутствие в исходных штаммах (рис. 2). Возможно, отсутствие положительного результата в случае исходных штаммов, содержащих в геноме *rapA1*, объясняется регулируемой экспрессией данного гена и малым количеством наработки белка, в отличие от конститутивной экспрессии, обеспечиваемой вектором pJN105TurboRapA1GFP.

Ранее нами было показано, что трансформированные геном *rapA1* микросимбионты *R. leguminosarum* Pvu5 показывают более высокую адгезию к корням макросимбионта – фасоли, способствуют повышению числа образованных азотфиксирующих клубеньков и, как следствие, способствуют увеличению урожайности растений (Нигматуллина и соавт., 2015). Аналогичные результаты были получены на растениях козлятника восточного при трансформации его микросимбионта *N. galegae* 0702 геном *rapA1* (Хакимова и соавт., 2017).

Однако трансформация микросимбионтов *R. leguminosarum* bv. *trifolii* R200 и *R. etli* LP 1003S геном *rapA1* не приводила к увеличению количества клубеньков на корнях клевера красного и фасоли обыкновенной соответственно, хотя и увеличивала количество адсорбированных на поверхности корней ризобий. Последнее наблюдалось не только на корнях растений-хозяев, но и в случае использования в экспериментах сои и люцерны. При этом образование биопленок на инертных поверхностях (пластиковых планшетах в частности) для исходных и трансформированных штаммов было одинаковым (Mongiardini et al., 2008).

В нашей работе исследование образования биопленок на инертных поверхностях показало, что все трансформированные штаммы образуют более выраженные биопленки по сравнению с дикими штаммами. Различия в относительном количестве биомассы в биопленках показаны на рис. 3. Наибольшую биомассу показал штамм *R. leguminosarum* TPr4 + *rapA1*, а наименьшую *R. leguminosarum* VSy12 + *rapA1*. Последнее связано с тем, что даже исходный штамм *R. leguminosarum* VSy12 слабо образует биопленки, в отличие от остальных штаммов. Удивителен тот факт, что *rapA1* усиливает образование биопленок *N. galegae* 0702, хотя данный ген выделен из штаммов *R. leguminosarum*. Несмотря на результаты более ранних работ, показавших, что *rapA1* можно использовать для повышения эффективности образования клубеньков *N. galegae* (Хакимова и соавт., 2017), тот факт, что конститутивная экспрессия *rapA1* в *N. galegae* приводит к более эффективному формированию биопленок, открывает новые перспективы для использования этого штамма при создании искусственных симбиотических систем с небобовыми растениями.

Возможно, положительные результаты по образованию биопленок на инертных поверхностях, полученные в настоящей работе, объясняются использованием вектора широкого круга хозяев pJN105 и сильного конститутивного промотора фага T5. Ранее в работах, где не было получено значимых различий в формировании биопленок на инертных поверхностях между исходными и трансформированными *rapA1* штаммами, были использованы плазмиды pRK404A и лактозный оперон (Ausmees et al., 2001; Mongiardini et al., 2008).

Исследование влияния ризобактерий на развитие корневой системы проростков растений. Штаммы *R. leguminosarum* Pvu5, VSy12, Thy2, TPr4 и *N. galegae* 0702 изначально были отобраны из коллекции "Симбионт", как обладающие выраженной ростостимулирующей активностью. При постановке экспериментов в рамках настоящей работы все исходные штаммы стимулировали рост корней проростков огурца. При этом *R. leguminosarum* VSy12 стимулировал также рост корней проростков томата и амаранта, а *R. leguminosarum* Pvu5 и *N. galegae* 0702 – только амаранта; и ни один штамм не проявил ростостимулирующую активность по отношению к корням моркови (рис. 4).

Влияние конститутивной экспрессии гена *rapA1* в трансформированных штаммах на стимуляцию роста корней растений оказалось неоднозначным. В частности, трансформированный *N. galegae* оказался в два раза эффективнее, чем исходный штамм, для проростков растений огурца. Небольшое усиление роста корней этого растения наблюдалось также при использовании

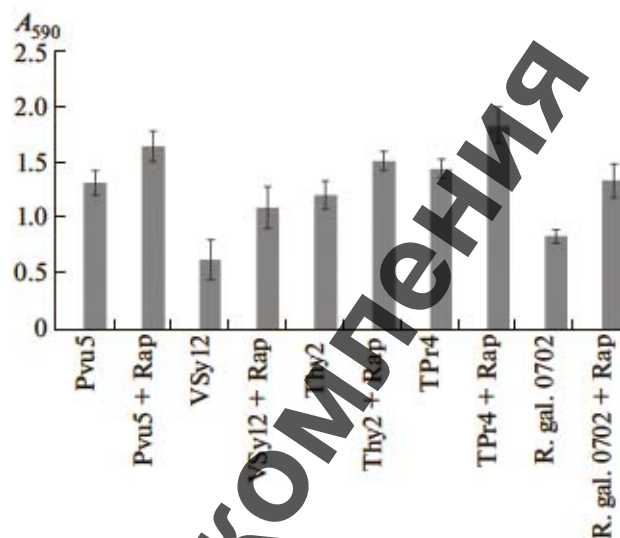


Рис. 3. Относительная биомасса биопленок исходных и трансформированных штаммов бактерий после 7 сут культивирования. A_{590} – оптическая плотность кристаллического фиолетового, десорбированного после окрашивания биопленок, образованных на пластиковых планшетах.

трансформированного штамма *R. leguminosarum* Pvu5. В экспериментах с проростками томата проявили ростостимулирующую активность по отношению к корням растений трансформированные *rapA1* штаммы *R. leguminosarum* Thy2, *R. leguminosarum* TPr4, *R. leguminosarum* Pvu5, хотя в исходных штаммах подобной активности не наблюдалось. Штамм *R. leguminosarum* TPr4 + *rapA1* единственный проявил ростостимулирующую активность по отношению к корням растений моркови. Однако наблюдались и отрицательные результаты, когда трансформированные штаммы проявляли себя хуже, чем исходные: например, *R. leguminosarum* TPr4 на растениях томата и *R. leguminosarum* Thy2, *R. leguminosarum* Pvu5, *N. galegae* 0702 на растениях амаранта.

Известна способность многих штаммов ризобий синтезировать ауксины, в частности индолилуксусную кислоту (ИУК), индолилмасляную кислоту (ИМК) и индолилкарбоную кислоту (ИКК), что непосредственно может стимулировать развитие корневой системы растений, вызывая увеличение массы и размера корней, а также количества боковых отростков (Dazzo, Yanni, 2006). Например, было показано, что инокуляция риса бактериями *R. leguminosarum* bv. *trifolii* повышает сухую массу растений и количество зерен, увеличивает содержание N, P, K, и Fe в растительных тканях. Все эти эффекты связаны с аккумуляцией в ризосфере ИУК, физиологическими изменениями в корневой системе и последующим улучшением питания (Biswas et al., 2000).

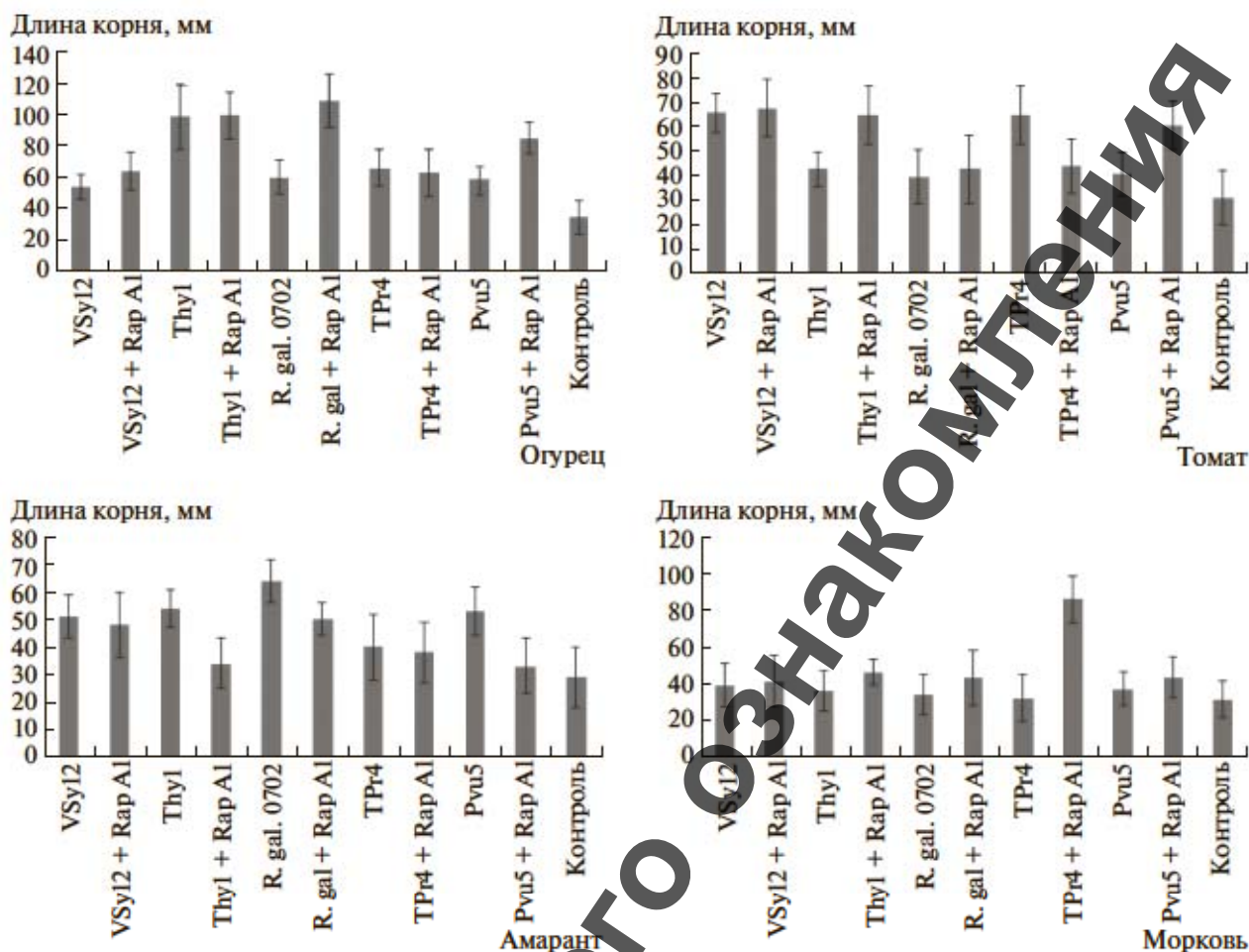


Рис. 4. Исследование влияния исходных и трансформированных штаммов бактерий на рост корней растений (мм).

В настоящей работе были проведены эксперименты по определению способности исходных и трансформированных штаммов продуцировать ауксины. Результаты этих экспериментов пред-

ставлены в табл. 1. Стоит отметить, что практически все штаммы продуцируют небольшое количество ауксинов, что, вероятнее всего, оказывает влияние на результаты экспериментов по их ро-

Таблица 1. Продуцирование ауксинов исходными и трансформированными штаммами

Штамм	Продукция фитогормонов, нг/мл		
	ИМК	ИКК	ИУК
<i>R. leguminosarum</i> VSy12	4.05 ± 0.25	55.20 ± 3.90	34.55 ± 2.65
<i>R. leguminosarum</i> Thy1	12.20 ± 1.20	60.55 ± 1.35	26.40 ± 0.70
<i>R. leguminosarum</i> Pvu5	9.65 ± 0.75	89.85 ± 4.45	64.50 ± 3.30
<i>R. leguminosarum</i> TPr4	4.45 ± 0.55	92.40 ± 2.30	25.50 ± 1.20
<i>R. galegae</i> 0702	24.80 ± 2.80	56.40 ± 3.70	77.95 ± 3.05
<i>R. leguminosarum</i> VSy12 pJN105TurboRapA1GFP	3.75 ± 0.75	54.30 ± 4.10	37.65 ± 2.35
<i>R. leguminosarum</i> Thy2 pJN105TurboRapA1GFP	14.35 ± 1.75	96.20 ± 5.40	28.15 ± 1.25
<i>R. leguminosarum</i> Pvu5 pJN105TurboRapA1GFP	3.25 ± 0.45	14.25 ± 3.25	30.90 ± 3.10
<i>R. leguminosarum</i> TPr4 pJN105TurboRapA1GFP	11.05 ± 1.95	96.00 ± 8.10	9.35 ± 0.45
<i>R. galegae</i> 0702 pJN105TurboRapA1GFP	2.05 ± 0.25	0.45 ± 0.45	31.55 ± 0.95

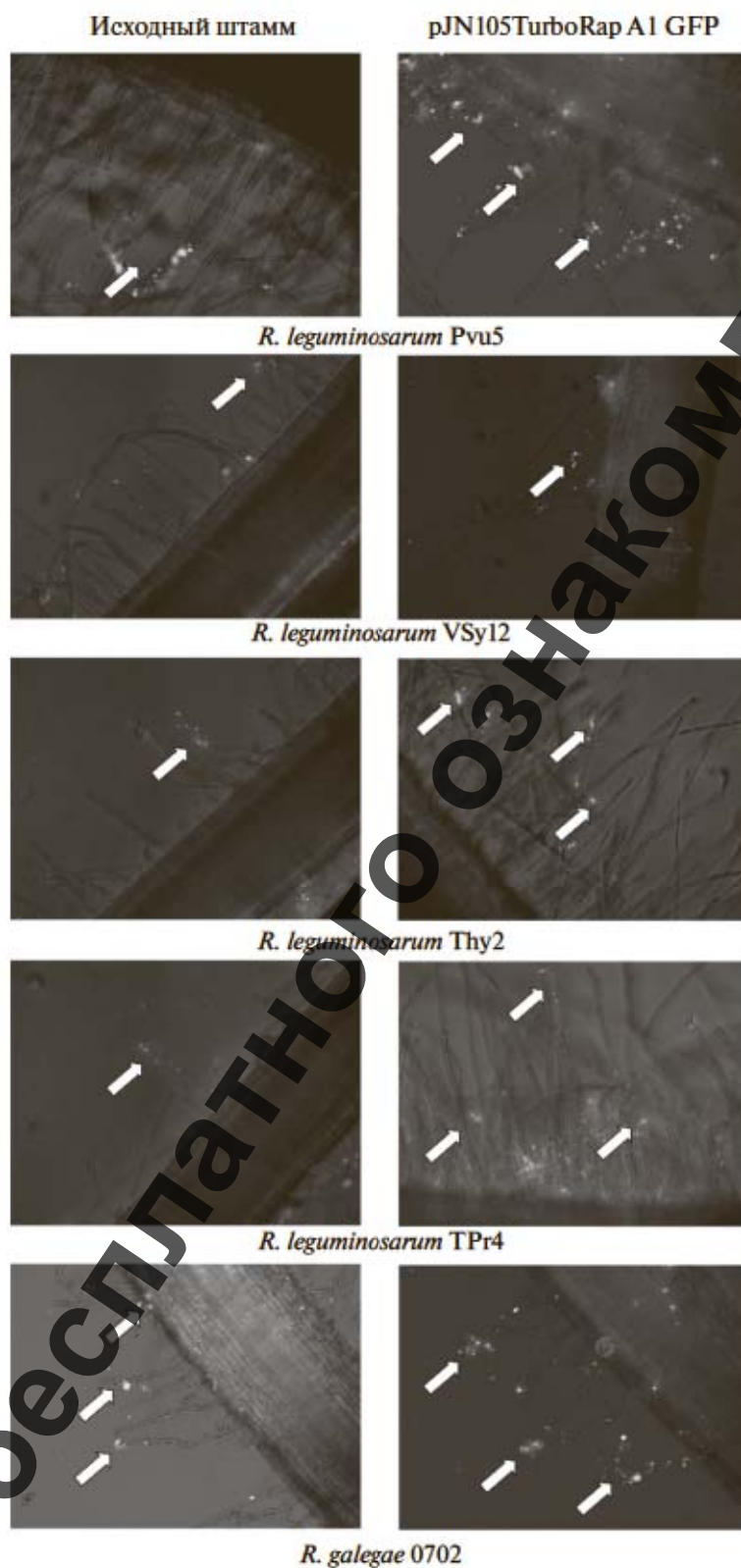


Рис. 5. Иммунофлуоресцентная микроскопия корней проростков томата после обработки исходными и трансформированными штаммами ризобий (стрелками показаны микроколонии и клеточные агрегаты).

стостимулирующей активности. Однако в случае трансформированных штаммов эксперименты показали снижение выработки ауксинов. Наиболее отчетливо оно проявляется для штаммов *N. galegae* 0702 и *R. leguminosarum* Pvu5, чем, вероятно, объясняется ухудшение ростостимулирующей активности данных бактерий после трансформации по отношению к корням проростков амаранта. Возможно, снижение биосинтеза ауксинов связано с метаболическими потерями, которые вызваны генетическими манипуляциями с бактериями. Повышение ростостимулирующей активности этих штаммов после трансформации по отношению к корням проростков огурца и томата, вероятно, не связано с ауксинами и требует дальнейшего изучения. Единственным штаммом, у которого после трансформации усилилась выработка ауксинов, был *R. leguminosarum* Thy2, чем, возможно, объясняется появление *de novo* ростостимулирующей активности по отношению к корням проростков томата.

Исследование характера колонизации бактериями корней растений. В выбранных условиях эксперимента не было выявлено статистически значимых различий в количестве клеток исходных и трансформированных штаммов, адгезированных на поверхности корней растений. Однако трансформированные *rapA1* штаммы ризобий образовывали на корнях растений томата клеточные агрегаты и микроколонии, что в случае исходных штаммов наблюдалось реже (рис. 5). Наименее эффективно трансформация геном *rapA1* повлияла на характер колонизации растений штаммами *N. galegae* 0702 и *R. leguminosarum* VSy12. Последний образует биопленки медленнее, чем остальные штаммы. Что касается *N. galegae* 0702, то даже исходный штамм отличался способностью образовывать микроколонии на поверхности корней томата. Видимо, в данном случае сыграла роль факторы растительного происхождения, в частности, лектины растений, имеющие средство к поверхности бактерий (Verashina et al., 2012). Наиболее ярко выраженная колонизация корней наблюдалась для трансформированных *rapA1* штаммов *R. leguminosarum* TPt4 и *R. leguminosarum* Pvu5, что согласуется с результатами, полученными на пластиковых планшетах.

Ранее было показано, что белки Rap не только участвуют на ранних этапах прикрепления ризобий к корням растений-хозяев (Нигматуллина и соавт., 2015), но также могут влиять на выработку и состав внеклеточных капсульных и свободных полисахаридов, способствуя формированию более плотной структуры биопленки (Voza et al., 2016). Существует достаточно много работ, характеризующих кальций-связывающие лектины, подобные Rap, участвующие в колонизации бактериями различных поверхностей и образовании биопленок, с предположением наличия у данных

веществ ферментативной активности (Borlee et al., 2010; Berk et al., 2012; Park et al., 2015). Наличие подобной активности у белков Rap в комплексе с содержанием одного или более участков, ответственных за связывание полисахаридов, позволяет бактериям адаптироваться к меняющимся условиям окружающей среды, модулируя состав и строение бактериальной биопленки (Voza et al., 2016).

Таким образом, впервые в проведенном исследовании были получены штаммы ризобий, трансформированные векторной конструкцией pJN105TurboRapA1GFP, обеспечивающей конститутивную экспрессию генов *rapA1* и *gfp*. Был проведен сравнительный анализ ростостимулирующей активности исходных и трансформированных штаммов и выработки ими ауксинов. Показано, что конститутивная экспрессия *rapA1* в штаммах ризобий не только повышает эффективность образования биопленок на инертных поверхностях, но и способствует формированию микроколоний на корнях растений. Полученные данные позволяют сделать вывод, что изучение и использование бактериальных адгезинов открывает новые перспективы для создания искусственных симбиотических систем между ризобиями и небобовыми растениями.

Работа была выполнена с привлечением приборного парка ЦКП "Биомика" Института биохимии и генетики УФИЦ РАН в рамках госзадания (тема № АААА-А16-116020350028-4) при финансовой поддержке грантов Российского фонда фундаментальных исследований № 16-04-00902 А и № 18-34-00033 мол_а. Анализ содержания ауксинов в культуральных жидкостях бактерий выполнен при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 16-16-00080).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Вершинина З.Р., Благова Д.К., Нигматуллина Л.Р., Лавина А.М., Баймиев А.Х., Чемерис А.В. Ассоциативный симбиоз трансгенных томатов с ризобиями повышает устойчивость растений к *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* // Биотехнология. 2015. № 3. С. 42–53.
- Кулуев Б.Р., Сафиуллина М.Г. Регуляция роста клеток растяжением в растениях // Успехи современной биологии. 2015. Т. 135. № 2. С. 148–163.
- Лавина А.М., Хакимова Л.Р., Вершинина З.Р., Баймиев А.Х. Получение рекомбинантных по генам *pssA* и *rosR* ризобияльных штаммов, меченных флуоресцентным белком GFP // Вестник Оренбургского гос. ун-та. 2017. № 9 (209). С. 76–81.
- Нигматуллина Л.Р., Лавина А.М., Вершинина З.Р., Баймиев А.Х. Вклад бактериального адгезина RapA1 в эффективность формирования симбиоза *Rhizobium leguminosarum* с растениями фасоли // Микробиология. 2015. Т. 84. № 6. С. 705–711.
- Nigmatullina L.R., Lavina A.M., Verashina Z.R., Baymiev A.K. Role of bacterial adhesin RapA1 in formation of efficient sym-

- biosis of *Rhizobium leguminosarum* with bean plants // Microbiology (Moscow). 2015. V. 84. P. 804–810.
- Хакимова Л.Р., Лавина А.М., Вершинина З.Р., Баймиев А.Х. Использование штаммов-продуцентов адгезина RapA1 из *Rhizobium leguminosarum* для создания бинарных биоудобрений // Прикл. биохимия и микробиология. 2017. Т. 53. № 4. С. 400–405.
- Khakimova L.R., Lavina A.M., Vershinina Z.R., Baymiev A.Kh. Usage of strain-producers of adhesin RapA1 from *Rhizobium leguminosarum* for the creation of binary biofertilizers // Appl. Biochem. Microbiol. 2017. V. 53. P. 453–457.
- Шелудько А.В., Широков А.А., Соколова М.К., Соколов О.И., Петрова Л.П., Матора Л.Ю., Кацы Е.И. Колонизация корней пшеницы бактериями *Azospirillum brasilense* с различной подвижностью // Микробиология. 2010. Т. 79. № 5. С. 696–704.
- Sheludko A.V., Shirokov A.A., Sokolova M.K., Sokolov O.I., Petrova L.P., Matora L.Y., Katsy E.I. Wheat root colonization by *Azospirillum brasilense* strains with different motility // Microbiology (Moscow). 2010. V. 79. P. 688–695.
- Amaya-Gómez C.V., Hirsch A.M., Soto M.J. Biofilm formation assessment in *Sinorhizobium meliloti* reveals interlinked control with surface motility // BMC Microbiol. 2015. V. 15. P. 58.
- Ausmees N., Jacobsson K., Lindberg M. A unipolarly located, cell-surface-associated agglutinin RapA belongs to a family of *Rhizobium*-adhering proteins (Rap) in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* // Microbiology (SGM). 2001. V. 147. P. 549–559.
- Belimov A.A., Dodd I.C., Safronova V.I., Shaposhnikov A.I., Azarova T.S., Makarova N.M., Davies W., Tikhonovich I.A. Rhizobacteria that produce auxins and contain 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase decrease amino acid concentrations in the rhizosphere and improve growth and yield of well-watered and water-limited potato (*Solanum tuberosum*) // Ann. Appl. Biol. 2015. V. 167. P. 11–25.
- Berk V., Fong J.C., Dempsey G.T., Develioglu O.N., Zhuang X., Liphardt J., Chu S. Molecular architecture and assembly principles of *Vibrio cholerae* biofilms // Science. 2012. V. 337 (6091) P. 236–239.
- Biswas J.C., Ladha J.K., Dazzo F.B., Yanni Y.G., Rolfe B.G. Rhizobial inoculation influences seedling vigor and yield of rice // Agron. J. 2000. V. 92. P. 880–886.
- Borlee B.R., Goldman A.D., Murakami K., Samudrala R., Wozniak D.J., Parsek M.R. *Pseudomonas aeruginosa* uses a cyclic-di-GMP-regulated adhesin to reinforce the biofilm extracellular matrix // Mol. Microbiol. 2010. V. 75. P. 827–842.
- Dardanelli M., Angelini J., Fabra A. A calcium-dependent bacterial surface protein is involved in the attachment of rhizobia to peanut roots // Can. J. Microbiol. 2003. V. 49. P. 576–582.
- Dazzo F.B., Yanni Y.G. The natural rhizobium-cereal crop association as an example of plant-bacterial interaction // Biological Approaches to Sustainable Soil Systems / Eds. Uphoff N., Ball A., Fernandes E., Herren H., Hussion O., Laing M., Palm C., Pretty J., Sanchez P., Sanginga N., Thies J. Boca Raton: CRC Press, 2006. Ch. 8. P. 109–127.
- Frederix M., Edwards A., Swiderska A., Stanger A., Karunakaran R., Williams A., Abbruscato P., Sanchez-Contreras M., Poole P.S., Downie J.A. Mutation of *praR* in *Rhizobium leguminosarum* enhances root biofilms, improving nodulation competitiveness by increased expression of attachment proteins // Mol. Microbiol. 2014. V. 93. P. 464–478.
- Fujishige N.A., Kapadia N.N., De Hoff P.L., Hirsch A.M. Investigations of *Rhizobium* biofilm formation // FEMS Microbiol. Ecol. 2006. V. 56. P. 195–206.
- García-Fraile P., Carro L., Robledo M., Ramírez-Bahena M.H., Flores-Félix J.D., Fernández M.T., Peix A. Rhizobium promotes non-legumes growth and quality in several production steps: towards a biofertilization of edible raw vegetables healthy for humans // PLoS One. 2012. V. 7. № 5. e38122.
- Jiang F., Chen L., Belimov A.A., Shaposhnikov A.I., Gong F., Meng X., Hartung W., Jeschke D.W., Davies W.J., Dodd I.C. Multiple impacts of the plant growth promoting rhizobacterium *Variovorax paradoxus* 5C-2 on nutrient and ABA relations of *Pisum sativum* // J. Exp. Bot. 2012. V. 63. P. 6421–6430.
- Mongiardini E.J., Perez-Gimenez J., Althabegoiti M.J., Covelli J., Quelas J.I., Lopez-Garcia S.L., Lodeiro A. Overproduction of the rhizobial adhesin RapA1 increases competitiveness for nodulation // Soil Biol. Biochem. 2009. V. 41. P. 2017–2020.
- Mongiardini E.J., Ausmees N., Perez-Gimenez J. The rhizobial adhesion protein RapA1 is involved in adsorption of rhizobia to plant roots but not in nodulation // FEMS Microbiol. Ecol. 2008. V. 65. P. 279–288.
- Park J.H., Cho Y., Jang S.Y., Kwon H., Irie Y., Parsek M.R., Cho S.H. The *cabABC* operon essential for biofilm and rugose colony development in *Vibrio vulnificus* // PLoS Pathogens. 2015. V. 11. № 9. e1005192.
- Rinaudi L.V., Giordano W. An integrated view of biofilm formation in rhizobia // FEMS Microbiol. Lett. 2010. V. 304. P. 1–11.
- Russo D.M., Williams A., Edwards A., Posadas D.M., Finnie C., Dankert M., Downie J.A., Zorreguieta A. Proteins exported via the PrsD-PrsE type I secretion system and the acidic exopolysaccharide are involved in biofilm formation by *Rhizobium leguminosarum* // J. Bacteriol. 2006. V. 188. P. 4474–4486.
- Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989. 1626 p.
- Santillana N., Arellano C., Zúñiga D. Capacidad del *Rhizobium* de promover el crecimiento en plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Miller) // Ecología Aplicada. 2005. V. 4. P. 47–51.
- Siddique I.A., Ehteshamul-Haque S., Zaki M.J., Gaffar A. Effect of benlate on the efficacy of *Bradyrhizobium* sp. in the control of root rot disease of crop plants // Pakistan J. Sci. Ind. R. 2001. V. 44. № 3. P. 156–158.
- Towbin H., Staehelin T., Gordon J. Biochemistry electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1979. V. 76. P. 4350–4354.
- Vershinina Z.R., Baymiev An.K., Blagova D.K., Chubukova O.V., Baymiev Al.K., Chemeris A.V. Artificial colonization of non-symbiotic plants roots with the use of lectins // Symbiosis. 2012. V. 56. P. 25–33.
- Vozza N.F., Abdian P.L., Russo D.M., Mongiardini E.J., Lodeiro A.R., Molin S., Zorreguieta A. A *Rhizobium leguminosarum* CHDL-(C adherin-Like-) lectin participates in assembly and remodeling of the biofilm matrix // Front. Microbiol. 2016. V. 7. P. 1608.

Effect of Constitutive Expression of the *rapA1* Gene on Formation of Bacterial Biofilms and Growth-Stimulating Activity of Rhizobia

Z. R. Verшинina¹, L. R. Khakimova¹, A. M. Lavina¹, L. R. Karimova¹, E. R. Serbaeva², V. I. Safronova³, A. I. Shaposhnikov³, An. Kh. Baimiev¹, and Al. Kh. Baimiev¹, *

¹Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Center, Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia

²Bashkir State University, Ufa, Russia

³All-Russian Research Institute of Agricultural Microbiology, St.-Petersburg, Russia

*e-mail: baymiev@mail.ru

Received June 26, 2018

Revised September 3, 2018

Accepted October 2, 2018

Abstract—In order to investigate the effect of the RapA1 protein on growth-stimulating activity, biofilm formation, and root colonization by rhizobia, strains *Rhizobium leguminosarum* Pvu5, VSy12, Thy2, TPr4 and *R. galegae* 0702 were transformed with the pJN105TurboRapA1GFP vector, providing for constitutive expression of the *rapA1* and *gfp* genes. Constitutive expression of the *rapA1* gene was shown to result in more efficient biofilm formation on inert surfaces and to promote microcolony formation on plant root surfaces. Analysis of auxin production by original and transformed strains revealed decreased auxin synthesis in all transformed strains, except for *R. leguminosarum* Thy2. Growth-stimulating activity of the original and transformed strains did not correlate with the amount of auxins produced *in vitro*.

Keywords: root nodule bacteria, RapA1, agglutination, biofilm, auxin

ПОДАВЛЕНИЕ “КВОРУМ СЕНСИНГА” *CHROMOBACTERIUM VIOLACEUM*
ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ КОМБИНАЦИЙ АМИКАЦИНА
С АКТИВИРОВАННЫМ УГЛЕМ ИЛИ МАЛЫМИ
МОЛЕКУЛАМИ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ
(ПИРОГАЛЛОЛОМ И КУМАРИНОМ)

© 2019 г. К. С. Инчагова^а, Г. К. Дускаев^а, Д. Г. Дерябин^{а, *}

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

*e-mail: dgderyabin@yandex.ru

Поступила в редакцию 08.11.2018 г.

После доработки 03.12.2018 г.

Принята к публикации 10.12.2018 г.

Целью исследования был поиск эффективных подходов к подавлению системы “кворум сенсинга” (QS) у модельной бактерии *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532 на основе комбинированного использования соединений, реализующих различные механизмы анти-QS активности. Предварительно охарактеризованные механизмы их действия включали: 1) подавление синтеза аутоиндуктора (C₆-АГЛ) субингибиторными концентрациями аминогликозидного антибиотика амикацина; 2) сорбцию уже синтезированного C₆-АГЛ на частицах активированного угля; 3) снижение чувствительности бактериальных клеток к аутоиндуктору под действием низкомолекулярных соединений растительного происхождения – пирогаллола или кумарина. Одновременное присутствие амикацина и активированного угля в среде культивирования *C. violaceum* не увеличивало, но, напротив, парадоксально снижало их совместную анти-QS активность. Это объясняется частичным связыванием антибиотика на частицах сорбента, тогда как поэтапное использование антибиотика и сорбента обеспечивало развитие аддитивного эффекта, формирующегося за счет последовательного уменьшения внеклеточной концентрации C₆-АГЛ. Совместное использование амикацина с пирогаллолом или кумарином приводило к наиболее выраженному анти-QS эффекту, при изоболографическом анализе, демонстрирующем признаки супераддитивности. Обсуждается возможность возникновения тестируемых композиций в естественных условиях обитания микроорганизмов, а также перспективность их использования для борьбы с бактериальными инфекциями, возбудители которых используют системы “кворум сенсинга” для индукции своего патогенного потенциала.

Ключевые слова: quorum sensing, *Chromobacterium violaceum*, амикацин, активированный уголь, пирогаллол, кумарин

DOI: 10.1134/S0026365619010142

Феномен “кворум сенсинга” (от англ. – quorum sensing; QS), представляющий собой систему плотно-зависимой коммуникации у прокариот с участием низкомолекулярных химических сигналов – аутоиндукторов, первоначально был описан на примере морских люминесцирующих бактерий (Greenberg et al., 1996). Однако достаточно быстро выяснилось, что стереотипно устроенные системы QS характерны и для большинства наземных свободно живущих и патогенных микроорганизмов, у которых они участвуют в регуляции разнообразных вариантов функциональной и морфологической дифференцировки (Waters, Bassler, 2005). В частности, под подобным контролем находятся такие важные процессы, как образование биопленок и синтез факторов

вирулентности, что определило взгляд на QS как перспективную мишень для создания антибактериальных средств нового принципа действия (Хмель, 2006).

Предложенные к настоящему времени варианты подавления систем плотно-зависимой коммуникации у бактерий включают: 1) внеклеточное связывание аутоиндукторов специфическими антителами или неспецифическими адсорбентами; 2) их ферментативную деградацию; 3) химическую интерференцию за связывание с соответствующими рецепторными белками (Remy et al., 2018). Принято считать, что обеспечиваемое подобными воздействиями подавление кворум-зависимого образования биопленок может повысить чувствительность образующих их бактерий к воздей-

ствию антибиотиков, что впервые было продемонстрировано на примере *Pseudomonas aeruginosa* с использованием антибиотика тобрамицина и растительных ингибиторов QS: аджоена (Jakobsen et al., 2012) и байкалина (Brackman et al., 2011). Недавним подтверждением такого механизма являются наблюдения о потенцировании активности тобрамицина и других аминогликозидных антибиотиков фитоалексином ресвератролом (Zhou, Chen et al., 2018) или растительным алкалоидом хордеином (Zhou, Hou et al., 2018).

Вместе с тем, сами антибиотики в субингибиторных концентрациях также проявляют способность к подавлению QS, что соответствует современному взгляду на них как на “информбиотики”, ориентированные не столько на угнетение роста бактерий-конкурентов, сколько на регуляцию профиля их генной экспрессии (Кожевин и соавт., 2014). Так хорошо документированной является анти-QS активность азитромицина (Swatton et al., 2016), цефтазидима и ципрофлоксацина (Skindersoe et al., 2008), а наиболее обширные доказательства получены в отношении антибиотиков из группы аминогликозидов. При этом в работе (Babic et al., 2010) и нашем недавнем исследовании (Дерябин, Инчагова, 2018) в качестве наиболее вероятного механизма их действия названа блокада биосинтеза аутоиндуктора, в условиях дефицита которого система “кворум сенсинга” перестает функционировать.

Целью настоящего исследования явилось исследование анти-QS активности антибиотика амикацина при его индивидуальном использовании и в комбинации с химическими соединениями, реализующими иные механизмы подавления системы “кворум сенсинга”. В качестве подобных соединений выбраны активированный уголь, демонстрирующий способность к эффективному связыванию аутоиндукторов (Инчагова и соавт., 2016), а также малые молекулы растительного происхождения – пирогаллол и кумарин, активность которых связана с блокадой внутриклеточных путей передачи регуляторного сигнала (Defoirdt et al., 2013; Zhang et al., 2016). Основной акцент в настоящей работе сделан на их совместном эффекте в отношении системы “кворум сенсинга” модельного микроорганизма *Chromobacterium violaceum* при действии субингибиторных концентраций действующих компонентов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Бактериальные штаммы. В качестве основного объекта исследования использован дикий штамм *C. violaceum* ATCC 31532 с двухкомпонентной системой QS, в которой образуемая под контролем гена *cviI* синтаза обеспечивает образование аутоиндуктора – N-гексаноил-L-гомосерин лактона (C₆-АГЛ), а кодируемый геном *cviR* рецепторный

белок участвует в его восприятии с последующей кворум-зависимой транскрипцией ряда целевых генов (Stauff, Bassler, 2011). В частности, под таким контролем находится *vioABEDC*-оперон, ответственный за образование сине-фиолетового пигмента виолацеина с максимумом поглощения при 585 нм, количество которого в бактериальной культуре позволяет прямо оценивать активность системы QS.

Для исследования влияния антибиотика амикацина на продукцию аутоиндуктора системы QS (C₆-АГЛ) культурой *C. violaceum* ATCC 31532, а также в ряде других экспериментов использовали штамм *C. violaceum* CV026 (NCTC 13274). Его отличием от дикого штамма *C. violaceum* ATCC 31532 является инсерция транспозона mini-Tn5 в ген *cviI*, приводящая к потере способности биосинтеза аутоиндуктора при сохранении способности восприятия C₆-АГЛ с участием функционального гена *cviR* (McClean et al., 1997). Дополнительным преимуществом штамма *C. violaceum* CV026 являлось присутствие в составе транспозона mini-Tn5 генетической детерминанты Km^r, контролирующей устойчивость к антибиотикам из группы аминогликозидов, что в проводимых экспериментах исключало возможность искажающего воздействия амикацина на результат детекции C₆-АГЛ.

В экспериментах, направленных на исследование механизмов анти-QS активности активированного угля, пирогаллола и кумарина, использован сенсорный штамм *Escherichia coli* JLD271 с плазмидой *pAL103; luxR+luxI_luxCDABE; TetR p15A* (Lindsay, Ahmer, 2006). Клонированный в ее составе ген *luxR* кодирует рецепторный белок, воспринимающий АГЛ с шестью атомами углерода в боковой цепи, и на этой основе обеспечивает дозозависимое развитие биолюминесценции как следствие транскрипции *luxCDABE*-оперона.

При исследовании сорбции амикацина на частицах активированного угля дополнительно использован штамм *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* FDA 209P (ATCC 6538P), проявляющий высокую чувствительность к широкому кругу антибиотиков и, в этой связи, рекомендуемый для оценки их биоактивности.

Химические соединения. При воздействии на систему плотно-зависимой коммуникации *C. violaceum* ATCC 31532 использована химически чистая субстанция антибиотика амикацина в виде амикацина сульфата (CAS 37517-28-5) (“Sigma”, США).

В качестве потенциального сорбента C₆-АГЛ использован фармакопейный препарат активированного угля (CAS 16291-96-6) производства ОАО “Фармстандарт-Лексредства” (Россия) с показателем зольности менее 1% и значением йодного индекса 800–900 мг/г. Перед проведением

исследований препарат измельчали с использованием электрической мельницы, отбирали гранулометрическую фракцию 130–250 мкм, которую высушивали до постоянной массы при 120°C.

Малые молекулы растительного происхождения – пирогаллол (1,2,3-тригидроксibenзол; CAS 87-66-1) и кумарин (2H-хромен-2он; CAS 91-64-5) были представлены их химически синтезированными аналогами производства компаний “TCI EUROPE N.V.” (ЕС) и “Enamine Ltd” (Украина).

Для контрольной индукции сенсорных штаммов *C. violaceum* 026 и *E. coli* JLD271 *pAL103*, а также в ряде других экспериментов использован химически синтезированный C_6 -АГЛ с чистотой $\geq 98\%$ (CAS 147852-83-3) (“Cayman Chemicals”, США).

Методы исследования анти-QS активности на модели *C. violaceum* ATCC 31532. Для определения анти-QS активности каждого из использованных соединений в LB-бульоне (“Sigma”, США) готовили двукратные разведения ($n \times 2$): 1) амикацина (0.05–100 мкг/мл); 2) активированного угля (1000–30000 мкг/мл); 3) пирогаллола (0.15–157.64 мкг/мл) или кумарина (1.43–1461.52 мкг/мл). Соответствующие объемы LB-бульона, не содержащие названных компонентов, использовали в качестве положительного (рост тест-штамма) и отрицательного (стерильного) контролей. В стеклянные емкости, содержащие по 2 мл приготовленных, как описано выше, опытных и контрольных проб, вносили по 20 мкл 1-сут культуры *C. violaceum* ATCC 31532 и подрачивали в статическом режиме при 27°C в течение суток. Оценку результатов проводили с использованием микрострипового фотометра STAT FAX 303 VIS+ (“Awareness Technology”, США), регистрируя: 1) оптическую плотность биомассы при 450 ± 5 нм (ОП₄₅₀) как показатель влияния исследуемых компонентов на рост бактерий; 2) количество пигмента виолацеина после его этанольной экстракции при 600 ± 5 нм (ОП₆₀₀) как показатель влияния на активность QS-системы. Значения поглощения отрицательного контроля вычитали. Антибактериальный эффект исследуемых компонентов выражали значениями МИК₁₀₀ и МИК₅₀ – минимальными ингибирующими концентрациями, вызывающими 100- и 50%-ое подавление роста тест-штамма относительно положительного контроля. Интенсивность подавления системы “кворум сенсинг” выражали величинами ЕС₁₀₀ и ЕС₅₀, соответствующими 100- и 50%-ому ингибированию биосинтеза пигмента виолацеина.

Для исследования комбинированного воздействия амикацина использовали: 1) панели стеклянных емкостей (8 × 12) при сочетании антибиотика с активированным углем или 2) пластиковые 96-луночные планшеты при сочетании антибиотика с пирогаллолом и кумарином. В ем-

кости или лунки вносили двукратные разведения тестируемых соединений в перпендикулярных друг другу направлениях, что обеспечивало их различные концентрационные соотношения. Пробами сравнения являлись ряды разведений, содержащие только одно из тестируемых соединений, а также положительный и отрицательный контроли. Дальнейшие инокуляции *C. violaceum* ATCC 31532, культивирование и учет результатов исследования проводили, как описано выше.

Биотесты на основе *C. violaceum* CV026. Для количественной оценки автоиндуктора системы QS (C_6 -АГЛ), синтезируемого штаммом *C. violaceum* ATCC 31532, бактериальные культуры, выросшие в присутствии субингибиторных концентраций амикацина и в контроле, центрифугировали (6000 g, 15 мин), после чего полученные супернатанты в объеме 100 мкл перенесли в ячейки 96-луночных планшетов. В лунки вносили по 20 мкл 1-сут культуры *C. violaceum* 026 и культивировали в статическом режиме при 27°C в течение сут, после чего определяли уровень биосинтеза виолацеина с использованием микрострипового фотометра при 600 ± 5 нм, как описано выше. Количество детектированного C_6 -АГЛ оценивали по калибровочным кривым, построенным для химически синтезированного C_6 -АГЛ в диапазоне концентраций от 10^{-4} до 10^{-8} М.

Аналогичным образом остаточное количество C_6 -АГЛ тестировали после последовательного воздействия на *C. violaceum* ATCC 31532 субингибиторных концентраций амикацина и последующей сорбции автоиндуктора из супернатанта с использованием активированного угля.

Биотесты на основе *E. coli* JLD271 *pAL103*. Сорбцию химически синтезированного C_6 -АГЛ на частицах активированного угля оценивали по остаточным концентрациям автоиндуктора, который определяли в тесте дозо-зависимого биолюминесцентного отклика *E. coli* JLD271 *pAL103* (Инчагова и соавт., 2016).

Оценку механизма анти-QS активности малых молекул растительного происхождения (относительно соответствующих контролей) проводили в 96-луночных планшетах из непрозрачного пластика Microlite 2+ (“Thermo”, США) в тесте подавления бактериальной биолюминесценции методом, описанным в работе (Дерябин и соавт., 2014). Два варианта экспериментов предусматривали внесение в культуру *E. coli* JLD271 *pAL103* пирогаллола в концентрациях 0.15–157.64 мкг/мл или кумарина 1.43–1461.52 мкг/мл с одновременным или последовательным добавлением C_6 -АГЛ в концентрации 10^{-6} М. Динамическую регистрацию развивающегося свечения проводили, помещая планшеты в термостатируемый измерительный блок биолюминометра LM 01T (“Immuno-tech”, Чехия).

Таблица 1. Действие амикацина, активированного угля, пирогаллола и кумарина (мкг/мл) на рост и QS-зависимый биосинтез пигмента виолацеина культурой *C. violaceum*

Действующие соединения	Характеристики антибактериальной активности, мкг/мл		Характеристики анти-QS активности, мкг/мл		Вероятный анти-QS механизм
	МИК ₁₀₀	МИК ₅₀	ЕС ₁₀₀	ЕС ₅₀	
Амикацин	25	11.6	12.5	8.24	Подавление синтеза С ₆ -АГЛ
Активированный уголь	—	—	20000	8534.67	Сорбция С ₆ -АГЛ
Пирогаллол	157.64	85.38	19.71	13.5	Нарушение восприятия С ₆ -АГЛ
Кумарин	365.38	182.69	182.69	136	

Статистическая обработка результатов исследования. Все эксперименты выполнены не менее чем в пяти повторностях. Полученные результаты обработаны методами вариационной статистики в программе Excel для Windows 10. Для определения характера взаимодействия соединений в составе предложенных композиций использован изоболографический анализ (Tallarida, 2006), проведенный на основе сравнения значений ЕС₅₀.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ эффектов амикацина, активированного угля и малых молекул растительного происхождения (пирогаллола и кумарина) в культуре *C. violaceum*. Культивирование *C. violaceum* ATCC 31532 в жидкой питательной среде LB в присутствии амикацина (в диапазоне концентраций 0.05–100 мкг/мл) с последующей раздельной оптической регистрацией значений оптической плотности (ОП₄₅₀) выросших культур и пигментообразования (ОП₆₀₀) позволило оценить воздействие антибиотика на рост и кворум-зависимый биосинтез виолацеина тестерного микроорганизма (рис. 1а). Полученные результаты характеризовали антибактериальную активность амикацина величинами МИК₅₀ = 11.6 мкг/мл и МИК₁₀₀ = 25 мкг/мл. При этом в широком диапазоне субингибиторных концентраций антибиотика было зафиксировано ингибирование кворум-зависимого биосинтеза виолацеина, которое характеризовалось величинами ЕС₁₀₀ = 12.5 мкг/мл и ЕС₅₀ = 8.24 мкг/мл, соответствующими полному или 50% подавлению синтеза пигмента в растущей культуре *C. violaceum* ATCC 31532 (табл. 1).

Продукция аутоиндуктора контрольной 24-ч культурой *C. violaceum* ATCC 31532, определенная в биотесте с использованием мутантного штамма *C. violaceum* 026, характеризовалась величиной 68.1 мкМ С₆-АГЛ на 1 ед. ОП₄₅₀. Воздействие субингибиторных концентраций амикацина в диапазоне от 0.1 до 6.25 мкг/мл прогрессивно снижало накопление С₆-АГЛ от 67.42 до 0.68 мкМ

на 1 ед. ОП₄₅₀, а в присутствии 12.5 мкг/мл антибиотика аутоиндуктор переставал детектироваться. Полученные результаты подтвердили вероятный механизм анти-QS активности амикацина, связав его с подавлением биосинтеза аутоиндуктора.

Другим исследованным соединением был активированный уголь, который вносили в среду культивирования модельного штамма *C. violaceum* ATCC 31532 в количестве от 1000 до 30000 мкг/мл (рис. 1б). Данное соединение не оказывало детектируемого воздействия на рост тестерного штамма, но в концентрации 8534.67 мкг/мл снижало продукцию виолацеина до 50% от контрольных значений, а в дозе 20000 мкг/мл полностью подавляло QS-зависимый биосинтез пигмента (табл. 1).

Механизмом биологической активности активированного угля является сорбция молекул С₆-АГЛ. Его остаточные количества после отделения частиц активированного угля с адсорбированным на них аутоиндуктором оценивались в биотесте с *E. coli* JLD271 *pAL103*. При этом четкий дозозависимый биолуминесцентный отклик данного тестерного штамма позволил рассчитать равновесные концентрации С₆-АГЛ при его сорбции на активированном угле и охарактеризовать его сорбционную емкость (*qE*) величиной $(11 \pm 0.9) \times 10^{-9}$ мг/мг.

Третьим объектом исследования были малые молекулы – пирогаллол и кумарин, ранее идентифицированные в составе растительных экстрактов с выраженной анти-QS активностью (Ni et al., 2008; Reen et al., 2018). Их внесение в культуры *C. violaceum* ATCC 31532 (рис. 1в, 1г) выявило рост-ингибирующий эффект пирогаллола (рис. 1в) со значениями МИК₅₀ = 85.38 мкг/мл и МИК₁₀₀ = 157.64 мкг/мл, а кумарина – МИК₅₀ = 182.69 мкг/мл и МИК₁₀₀ = 365.38 мкг/мл. Субингибиторные концентрации пирогаллола подавляли кворум-зависимую продукцию виолацеина на 50% в дозе 13.5 мкг/мл и приводили к полному угнетению пигментообразования в дозе 19.71 мкг/мл и выше (табл. 1). Аналогичный эффект

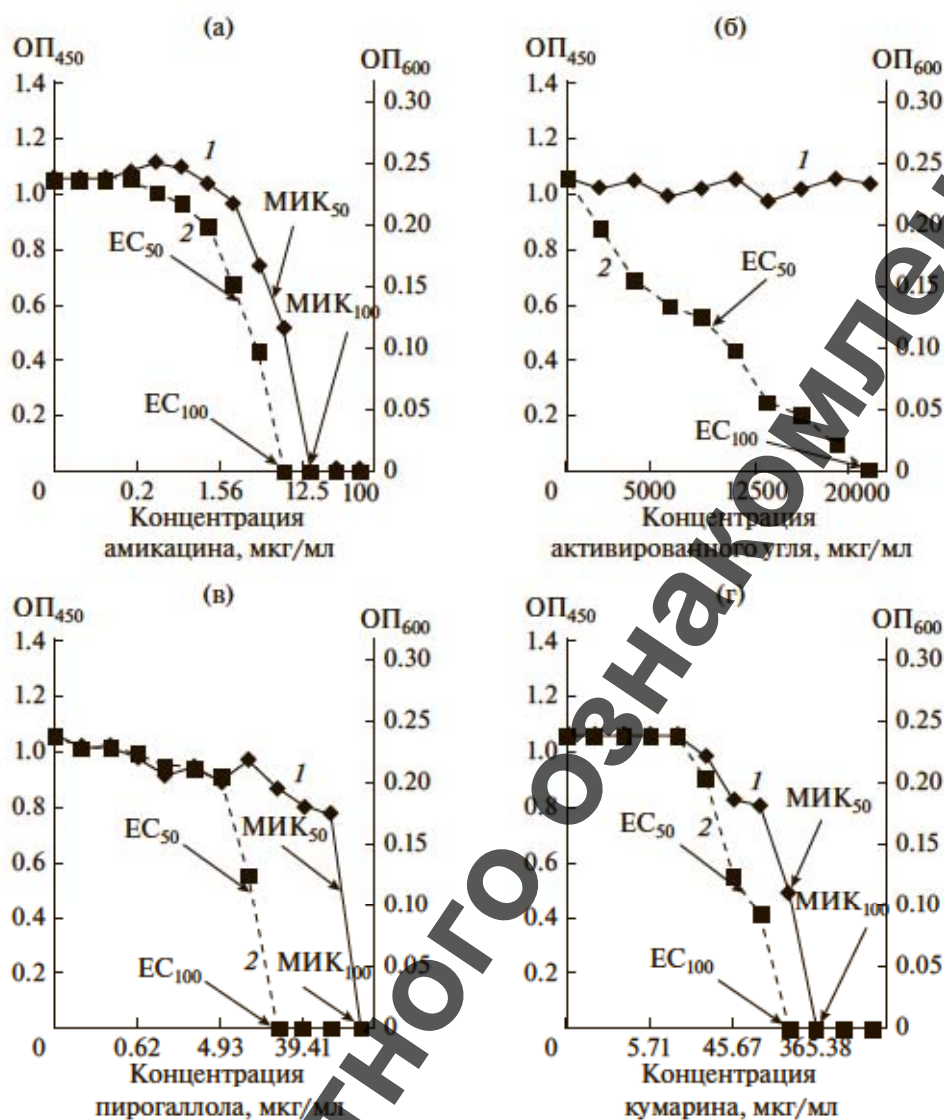


Рис. 1. Воздействие амикацина (а), активированного угля (б), пирогаллола (в) и кумарина (г) на рост и QS-зависимый биосинтез пигмента виолацеина в культуре *S. violaceum* ATCC 31532. Обозначения: по оси абсцисс – концентрации действующих соединений (мкг/мл); по оси ординат слева, сплошная линия на графиках (1) – оптическая плотность биомассы (OP₄₅₀); по оси ординат справа, пунктирная линия на графиках (2) – оптическая плотность пигмента (OP₆₀₀).

кумарина регистрировался в более узком концентрационном диапазоне, характеризуясь величинами EC₅₀ = 136.0 мкг/мл и EC₁₀₀ = 182.69 мкг/мл (табл. 1).

Анализ механизма анти-QS активности пирогаллола и кумарина был проведен с использованием сенсорного штамма *E. coli* JLD271 *pAL103* в двух вариантах исполнения. Первый из них, в котором в культуру тестерного штамма одновременно вносили C₆-АГЛ в концентрации 10⁻⁶ М и пирогаллол (в концентрациях от 157.64 до 0.15 мкг/мл) или кумарин (от 146.52 до 1.43 мкг/мл), не выявил достоверных эффектов тестируемых соединений на сроки индукции и уровень биолюминесцен-

ции *E. coli* JLD271 *pAL103*. Во втором варианте, предварительная 60-минутная инкубация тестерного штамма с пирогаллолом или кумарином в тех же концентрациях с последующей индукцией внесением C₆-АГЛ существенно снижала интенсивность люминесцентного отклика: при действии пирогаллола EC₅₀ = 7.08 мкг/мл и кумарина EC₅₀ = 365.38 мкг/мл. Отметим, что отсутствие структурного сходства C₆-АГЛ с тестируемыми малыми растительными молекулами свидетельствует против их возможной конкуренции за связывание со специфическим рецепторным участком белка LuxR. Вероятным механизмом регистрируемого анти-QS эффекта является неспецифиче-

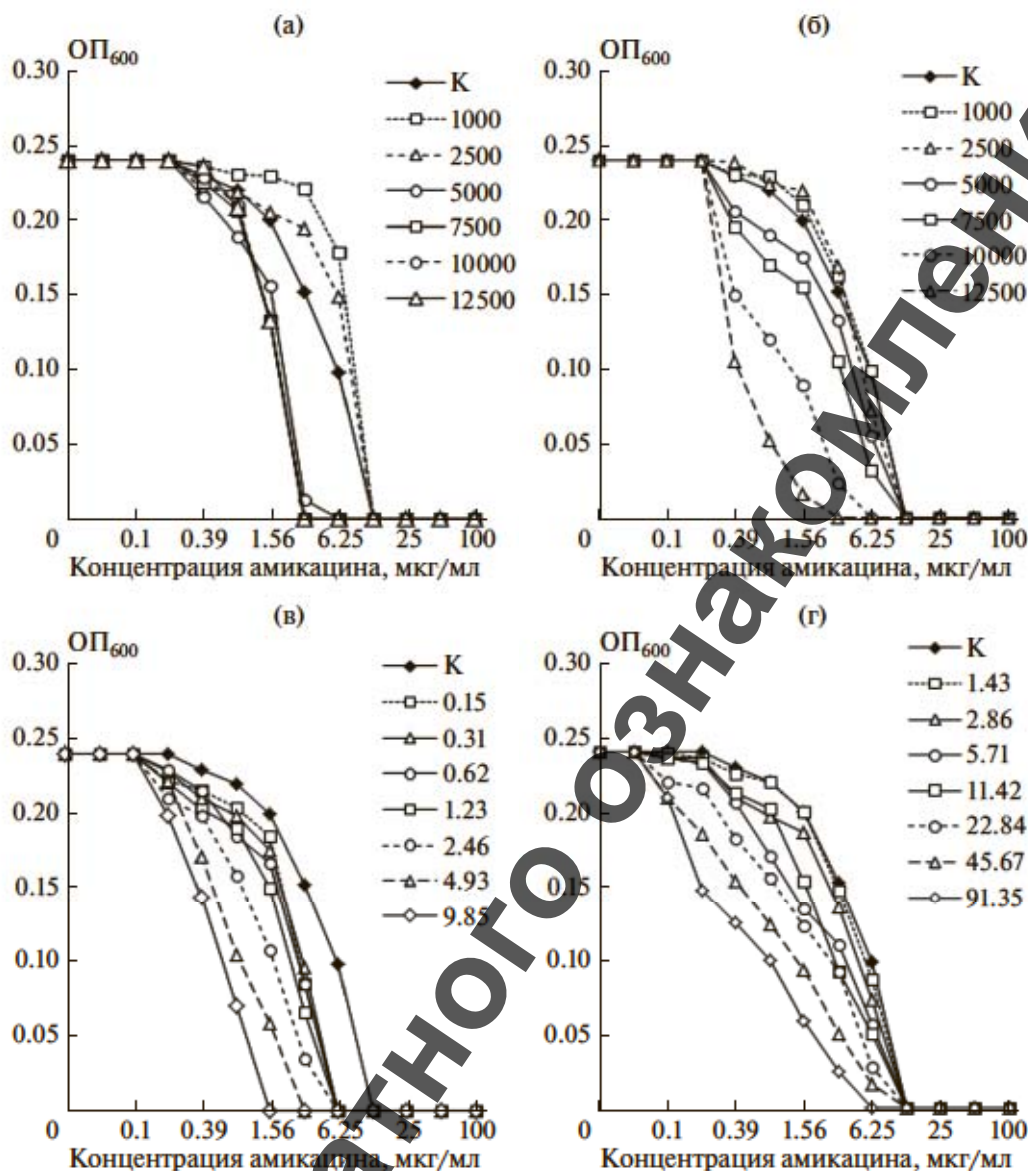


Рис. 2. Совместные эффекты амикацина с активированным углем (а – при одновременном; б – при последовательном использовании), пирогаллолом (в) и кумарином (г) в отношении QS-зависимого биосинтеза пигмента виолацеина у *C. violaceum*. Обозначения: по оси абсцисс – концентрации амикацина (мкг/мл); по оси ординат – оптическая плотность пигмента виолацеина (OP_{600}). Концентрации активированного угля, пирогаллола и кумарина, использованные в композициях с амикацином, и их обозначения на графиках приведены на полях рисунков.

ское понижение чувствительности бактериальных клеток к воздействию аутоиндуктора.

Оценка воздействия комбинации амикацина с активированным углем на кворум-зависимый биосинтез виолацеина у *C. violaceum*. Результаты исследований, проведенных в перекрестной матрице концентраций амикацина (в диапазоне 0.05–100 мкг/мл) и активированного угля (в диапазоне 1000–30000 мкг/мл) в растущих культурах *C. violaceum* ATCC 31532 заставили констатировать, что одновременное присутствие в среде культивирования антибиотика и сорбента неод-

нозначно сказывается на их совместной биологической активности.

Так эффект композиций с содержанием активированного угля 1000–2500 мкг/мл заключался в смещении кривых дозозависимого эффекта амикацина в сторону более высоких концентраций антибиотика, т.е. снижению анти-QS активности последнего (рис. 2а). В свою очередь комбинации с содержанием активированного угля от 5000 мкг/мл и более обеспечивали эффективное подавление кворум-зависимого биосинтеза виолацеина при более низких концентрациях амикацина в сравне-

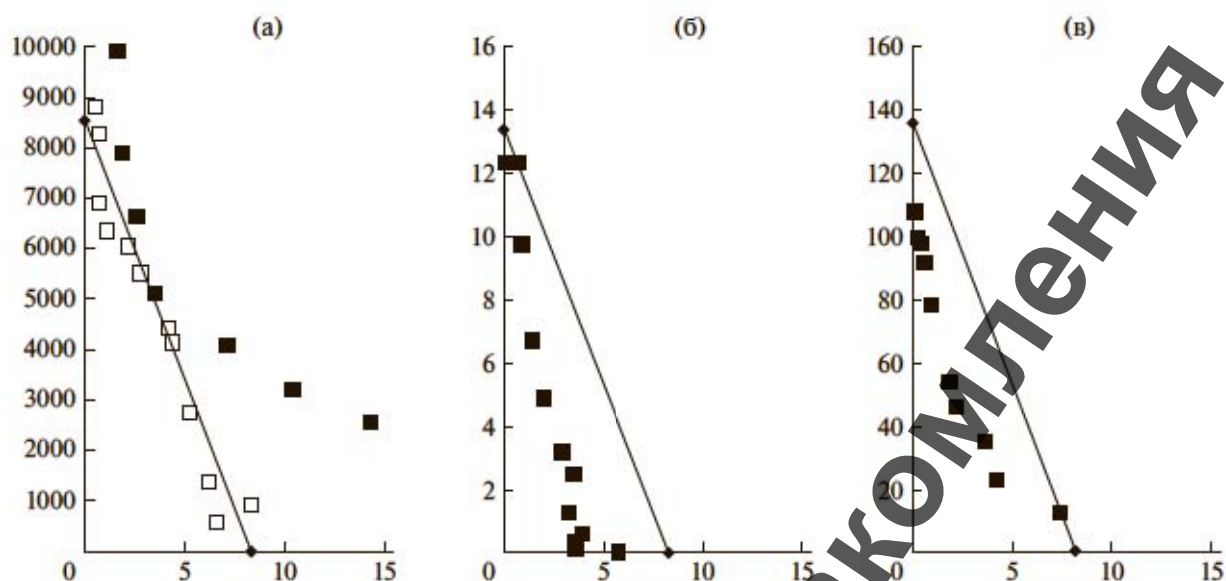


Рис. 3. Изоболографический анализ совместного воздействия комбинации амикацина с активированным углем (а), пирогаллолом (б) и кумарином (в) на QS-зависимый биосинтез пигмента виолацеина в культуре *C. violaceum*. Изоболы представлены в виде прямых линий, соединяющих концентрации каждого из соединений, вызывающих одинаковый биологический эффект (50% подавление биосинтеза виолацеина; EC_{50}). Результат совместного действия двух соединений показан путем нанесения на график точек с координатами, соответствующими концентрациям в композиции, обеспечивающим достижение EC_{50} . Комбинация характеризуется как аддитивная при расположении точек на изоболе, супераддитивная, если точка находится под изоболой и инфрааддитивная при координатах точки выше изоболы. Обозначения: черные квадраты – одновременное использование действующих компонентов; белые квадраты – последовательное использование (при тестировании композиции амикацина с активированным углем).

нии с соответствующим контролем. Интегральная оценка полученного результата с использованием изоболографического анализа (рис. 3а) показала смещение большинства индексов комбинированного воздействия выше прямой, соединяющей значения EC_{50} только для амикацина (8.24 мкг/мл) и активированного угля (8534.67 мкг/мл), что характеризовало действие этих компонентов как инфрааддитивное. На этом фоне единственным исключением являлась комбинация 3.54 мкг/мл антибиотика и 4738.52 мкг/мл сорбента, при изоболографическом анализе оцениваемая как аддитивная, когда действие компонентов суммируется, а индекс комбинированного воздействия расположен на линии изоболы.

При анализе причин обнаруженного эффекта рассмотрена возможность сорбции амикацина на частицах активированного угля, изменяющей биодоступную концентрацию антибиотика в среде культивирования. Дизайн соответствующего эксперимента предусматривал: 1) внесение исследуемых компонентов в жидкую питательную среду (как описано выше); 2) их совместную инкубацию (60 мин, 25°C); 3) разделение частиц активированного угля с сорбированным антибиотиком и супернатанта с остаточными количествами амикацина; 4) оценку антимикробной активности супернатанта в биотесте подавления роста *S. aureus* FDA 209P, проявляющего высокую чувствитель-

ность к амикацину ($MIC_{100} = 12.5$ мкг/мл). В результате проведенного исследования установлено, что степень сорбционного извлечения антибиотика из среды культивирования активированным углем достигала 50–75%, что соответствовало 2–4-кратному увеличению MIC_{100} амикацина в отношении *S. aureus* FDA 209P.

С учетом указанного обстоятельства, второй вариант комбинированного использования антибиотика и сорбента включал: 1) воздействие амикацина (0.05–100 мкг/мл) на дикий штамм *C. violaceum* ATCC 31532; 2) разделение биомассы и культуральной жидкости с накопленным в ней автоиндуктором; 3) 60-минутный контакт последней с навесками активированного угля (1000–30000 мкг/мл); 4) финальную оценку остаточных количеств автоиндуктора в биотесте с сенсорным штаммом *C. violaceum* 026, специфически отвечающим биосинтезом пигмента виолацеина на присутствие C_6 -АГЛ. В результате изменения дизайна эксперимента зарегистрировано смещение кривых дозозависимого эффекта в сторону более низких концентраций антибиотика (рис. 2б), а индексы его комбинированного использования с активированным углем расположились вдоль изоболы, соединяющей значения EC_{50} антибиотика и сорбента (рис. 3а), что характеризовало действие тестируемой композиции как аддитивное.

Оценка воздействия комбинации амикацина с малыми молекулами растительного происхождения (кумарином и пирогаллолом) на культуру *C. violaceum*. Проведение исследований в перекрестной матрице концентраций амикацина (в диапазоне 0.05–100 мкг/мл) с пирогаллолом (0.15–157.64 мкг/мл) или кумарином (1.43–1461.52 мкг/мл) выявило их повышенную биоактивность в тесте подавления QS-зависимого биосинтеза пигмента виолацеина, проявляющуюся в смещении кривых совместного дозозависимого эффекта относительно соответствующего контроля (рис. 2в, 2г). При этом изоболографический анализ (рис. 3б, 3в) свидетельствовал о супераддитивном характере действия подобных композиций, проявляющемся в расположении всех расчетных индексов комбинированного воздействия под прямой, соединяющей значения EC_{50} антибиотика и малых молекул растительного происхождения. Одновременно, на фоне принципиального сходства биоактивности тестируемых композиций, изоболографический анализ фиксировал и их некоторые особенности. Так в присутствии низких концентраций пирогаллола (0.154–12.5 мкг/мл) концентрация амикацина, необходимого для 50% подавления биосинтеза виолацеина, снижалась в 2–3 раза (рис. 3б), в то время как сам амикацин в минимальных концентрациях (0.11–7.5 мкг/мл) обеспечивал аналогичный эффект в отношении анти-QS активности кумарина (рис. 3в).

Кроме того, одновременное воздействие на тестерный штамм антибиотика и пирогаллола или кумарина обуславливало 2–4-кратное снижение MIC_{100} по амикацину, что позволяло говорить о потенцирующем действии использованных малых молекул в отношении его рост-ингибирующей активности на *C. violaceum* ATCC 31532.

ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенные исследования продемонстрировали анти-QS эффект достаточно разнородной по химическому строению и составу группы соединений, а также позволили охарактеризовать наиболее вероятные механизмы их действия на систему плотностно-зависимой коммуникации на примере тестерного штамма *C. violaceum* ATCC 31532, синтезирующего пигмент виолацеин под контролем QS системы.

Обнаруженное в присутствии субингибиторных концентраций антибиотика амикацина подавление кворум-зависимого образования пигмента виолацеина хорошо согласуется с аналогичными эффектами тобрамицина (Garske et al., 2004), канамицина и гентамицина (Дерябин, Инчагова, 2018), что позволяет говорить об универсальности этого типа биологической активности антибиотиков из группы аминогликозидов. По-

видимому, антибиотики этой группы имеют и общий механизм действия, а именно: нарушают биосинтез C_4 -АГЛ – автоиндуктора двухкомпонентной системы *rhlI/rhlR* у *Pseudomonas aeruginosa*, показанный ранее (Babic et al., 2010), а также подавляют образование C_6 -АГЛ – автоиндуктора аналогичным образом организованной системы *cviI/cviR* у *C. violaceum*, что показано в нашем настоящем и предшествующем (Дерябин, Инчагова, 2018) исследованиях.

Результаты исследования фармакопейного препарата активированного угля расширяют представления о нем как поливалентном физико-химическом антидоте, эффективно сорбирующем не только алкалоиды, гликозиды, производные фенола и разнообразные токсины (Senderovich, Vierhout, 2018), но и регуляторные молекулы бактериального происхождения, в том числе C_6 -АГЛ – автоиндуктор системы чувства кворума *C. violaceum*. Тем самым полученные данные согласуются с ранее описанным нами эффектом активированного угля в отношении N-(β -кетопролил)-L-гомосерин лактона (C_6 -оксо-АГЛ) – индуктора плотностно-зависимой биолюминесценции *Vibrio fischeri* (Инчагова и соавт., 2016). Химическая гомология названных лактонов и зарегистрированные в отношении них близкие значения сорбционной емкости объясняют происходящие процессы моделью мономолекулярной адсорбции на однородную поверхность (Лэнгмюра), происходящей по механизму физического закрепления молекул сорбата на поверхности сорбента при участии их гидрофобных фрагментов. В итоге активированный уголь может быть назван вторым (после алкиламин-модифицированного циклодекстрина; Moghoshi et al., 2013) неорганическим соединением, обеспечивающим эффективный “перехват” внеклеточных АГЛ.

Показанные в настоящем исследовании эффекты пирогаллола – компонента ряда растительных экстрактов с доказанной анти-QS активностью (Ni et al., 2008), развивают представления о фенольных соединениях растительного происхождения как регуляторах опосредованной гомосеринлактонами межклеточной коммуникации у *C. violaceum* и *P. aeruginosa* (Hossain et al., 2017). При этом, не исключается возможность анти-QS эффекта пирогаллола как дополнительного проявления его про-оксидантной активности (Defoirdt et al., 2013), что не противоречит показанному ранее снижению чувствительности бактериальных клеток к действию автоиндуктора под влиянием другой группы фенольных соединений растительного происхождения – алкилоксибензолов (Дерябин и соавт., 2014). Аналогичные эффекты кумарина хорошо согласуются с представлениями о нем как новом эффективном растительном ингибиторе “чувства кворума” у бактерий (Reen et al.,

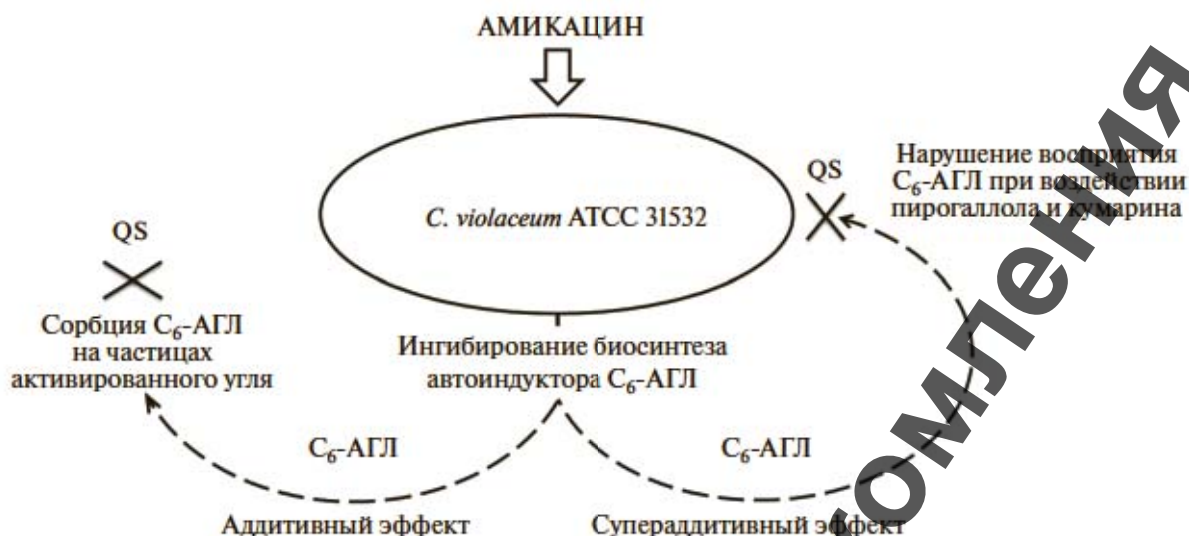


Рис. 4. Механизмы подавления системы аутоиндукции у *C. violaceum* ATCC 31532 при воздействии аминогликозидного антибиотика амикацина в комбинации с активированным углем (слева) и малыми молекулами растительного происхождения – пирогаллолом и кумарином (справа).

2018), механизм действия которого также связан со снижением чувствительности к природным и химически синтезированным аутоиндукторам у клеток *Vibrio splendidus* (Zhang et al., 2016), и как показано в настоящем исследовании – у *C. violaceum*. При этом тонким механизмом действия кумарина, вероятно, является ингибирование метаболизма циклического 3',5'-дигуанилата – внутриклеточного посредника, вовлеченного в регуляцию синтеза бактериальных экзополисахаридов, образования биопленок, адгезии и вирулентности (D Almeida et al., 2017).

Второй блок экспериментов планировался как экспериментальное исследование комбинаций “амикацин + активированный уголь” и “амикацин + пирогаллол или кумарин”, каждый из компонентов которых воздействует на обособленное звено системы плотно-зависимой коммуникации у *C. violaceum* ATCC 31532, что позволяло ожидать взаимного потенцирования итогового анти-QS эффекта.

Однако одновременное присутствие амикацина и активированного угля в среде культивирования *C. violaceum* ATCC 31532 не дало ожидаемого результата, но, напротив, привело к негативному эффекту, что объяснялось сорбцией молекул антибиотика на частицах активированного угля. Разрешением данного конфликта явилось последовательное использование амикацина, который в субингибиторных концентрациях подавлял продукцию аутоиндуктора в растущей культуре *C. violaceum* ATCC 31532, и затем – активированного угля, обеспечивающего сорбцию остаточных количеств C₆-АГЛ из среды культивирования (рис. 4, слева).

Более однозначные результаты были получены при исследовании композиций “амикацин + пирогаллол” и “амикацин + кумарин”, во всем диапазоне тестируемых субингибиторных концентраций действующих компонентов проявившихся выраженный супераддитивный анти-QS эффект. Механизм его формирования может быть объяснен подавлением образования C₆-АГЛ под действием антибиотика, остаточные количества которого оказываются неспособными к индукции кворум-зависимых реакций у бактериальных клеток, вследствие снижения их чувствительности к аутоиндуктору под действием малых молекул растительного происхождения (рис. 4, справа).

Обсуждая фундаментальный аспект полученного результата, следует отметить реальность формирования синергетических композиций “антибиотик + малые молекулы растительного происхождения” в природных экологических нишах, в частности – почвах, что определяется типичным присутствием бактерий, синтезирующих антибиотиков, в микробных сообществах ризосферы растений (Roomthongdee et al., 2015). Одним из вариантов биологической целесообразности таких синергетических композиций является совместное противодействие растительно-бактериальных симбиозов колонизации фитопатогенными микроорганизмами, использующими стереотипно устроенные системы плотно-зависимой коммуникации для индукции своего патогенного потенциала (Ansari, Ahmad, 2018).

Практически-ориентированный аспект проведенного исследования заключается в обосновании комбинированного использования амикацина (а в перспективе и других антибиотиков из

группы аминогликозидов) в сочетании с активированным углем и малыми молекулами растительного происхождения как средства борьбы с инфекционными агентами, использующими системы “кворум сенсинга” для образования биопленок и индукции своего патогенного потенциала. При этом на фоне принципиальной возможности разобщенного во времени применения антибиотика и активированного угля, более предпочтительным является использование комбинаций амикацина с пирогаллолом или кумарином, что определяет перспективу их дальнейшего доклинического и клинического исследования.

Исследования выполнены при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 16-16-10048).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Дерябин Д.Г., Инчагова К.С. Ингибирующий эффект аминогликозидов и тетрациклинов на систему “кворум сенсинга” *Chromobacterium violaceum* // Микробиология. 2018. Т. 87. № 1. С. 3–11.
- Deryabin D.G., Inchagova K.S. Inhibitory effect of aminoglycosides and tetracyclines on Quorum sensing in *Chromobacterium violaceum* // Microbiology (Moscow). 2018. V. 87. P. 1–8.
- Инчагова К.С., Строганова Е.А., Дерябин Д.Г. Сорбционные свойства активированного угля в отношении N-(бета-кетокaproил)-L-гомосерин лактона, оцененные с использованием индуцибельного бактериального lux-биосенсора // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2016. Т. 19. № 11. С. 11–15.
- Дерябин Д.Г., Камаева А.А., Толмачева А.А., Эль-Регистан Г.И. Влияние алкилоксибензолов на индуцируемые гомосеринлактонами проявления кворум сенсинга у бактерий // Прикл. биохимия и микробиология. 2014. Т. 50. № 4. С. 391–397.
- Deryabin D.G., Kamayeva A.A., Tolmacheva A.A., El-Registan G.I. The effects of alkylhydroxybenzenes on homoserine lactone-induced manifestations of quorum sensing in bacteria // Appl. Biochem. Microbiol. 2014. V. 50. P. 353–358.
- Кожевин П.А., Виноградова К.А., Булгакова В.Г. Природные функции антибиотиков как “информбиотиков” // Вестн. Московского ун-та. Сер. 17. Почвоведение. 2014. Т. 3. С. 3–9.
- Kozhevina P.A., Vinogradova K.A., Bulgakova V.G. Natural functions of antibiotics as “informatobiotics” // Moscow University Soil Science Bulletin. 2014. V. 69. № 3. P. 93–98.
- Хмель И.А. Quorum-sensing регуляция экспрессии генов: фундаментальные и прикладные аспекты, роль в коммуникации бактерий // Микробиология. 2006. Т. 75. № 4. С. 457–464.
- Khmel I.A. Quorum-sensing regulation of gene expression: Fundamental and applied aspects and the role in bacterial communication // Microbiology (Moscow). 2006. V. 75. P. 390–397.
- Ansari F.A., Ahmad I. Quorum sensing in phytopathogenic bacteria and its relevance in plant health. In: Kalia V. (eds) Biotechnological Applications of Quorum Sensing Inhibitors. Springer, Singapore. 2018, pp. 351–370.
- Babic F., Venturi V., Maravic-Vlahovick G. Tobramycin at subinhibitory concentration inhibits the Rhl/R Quorum sensing system in a *Pseudomonas aeruginosa* environmental isolate // BMC Infect. Diseases. 2010. V. 10. P. 148.
- Brackman G., Cos P., Maes L., Nelis H.J., Coenye T. Quorum sensing inhibitors increase the susceptibility of bacterial biofilms to antibiotics *in vitro* and *in vivo* // Antimicrob. Agents Chemother. 2011. V. 55. P. 2655–2661.
- D Almeida R.E., Molina R.D., Viola C.M., Luciardi M.C., Nieto Penalver C., Bardon A., Arena M.E. Comparison of seven structurally related coumarins on the inhibition of Quorum sensing of *Pseudomonas aeruginosa* and *Chromobacterium violaceum* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2017. V. 101. P. 3371–3378.
- Defoirdt T., Pande G.S., Barnuah K., Bossier P. The apparent quorum-sensing inhibitory activity of pyrogallol is a side effect of peroxide production // Antimicrob. Agents Chemother. 2013. V. 57. P. 2870–2873.
- Garske L.A., Beanson S.A., Leech A.J., Walsh S.L., Bell S.C. Sub-inhibitory concentrations of ceftazidime and tobramycin reduce the Quorum sensing signals of *Pseudomonas aeruginosa* // Pathology. 2004. V. 36. P. 571–575.
- Greenberg E.P., Winans S., Fuqua C. Quorum sensing by bacteria // Ann. Rev. Microbiol. 1996. V. 50. P. 727–751.
- Hossain M.A., Lee S.J., Park N.H., Mechesso A.F., Birhanu B.T., Kang J.W., Reza M.A., Suh J.W., Park S.C. Impact of phenolic compounds in the acyl homoserine lactone-mediated Quorum sensing regulatory pathways // Sci. Rep. 2017. V. 7. P. 10618.
- Jakobsen T.H., Gennip M., Phipps R.K., Shanmugham M.S., Christensen L.D., Alhede M., Skindersoe M.E., Rasmussen T.B., Friedrich K., Uthe F., Jensen P.O., Moser C., Nielsen K.F., Eberl L., Larsen T.O., Tanner D., Hoiby N., Bjarnsholt T., Givskov M. Ajoene, a sulfur-rich molecule from garlic, inhibits genes controlled by quorum sensing // Antimicrob. Agents Chemother. 2012. V. 56. P. 2314–2325.
- Lindsay A., Ahmer B.M.M. Effect of *sdiA* on biosensors of N-acylhomoserine lactones // J. Bacteriol. 2005. V. 187. P. 5054–5058.
- McClellan K.H., Winson M.K., Fish L., Taylor A. Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones // Microbiology (UK). 1997. V. 143. P. 3703–3711.
- Morohoshi T., Tokita K., Ito S., Saito Y., Maeda S., Kato N., Ikeda T. Inhibition of Quorum sensing in gram-negative bacteria by alkylamine-modified cyclodextrins // J. Biosci. Bioeng. 2013. V. 116. P. 175–179.
- Ni N., Choudhary G., Li M., Wang B. Pyrogallol and its analogs can antagonize bacterial quorum sensing in *Vibrio harveyi* // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2008. V. 18. P. 1567–1572.
- Poomthongdee N., Duangmal K., Pathom-aree W. Acidophilic actinomycetes from rhizosphere soil: diversity and properties beneficial to plants // J. Antibiot. (Tokyo). 2015. V. 68. № 2. P. 106–114.
- Reen F.J., Gutierrez-Barranquero J.A., Parages M.L., O Gara F. Coumarin: a novel player in microbial Quorum sensing and biofilm formation inhibition // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2018. V. 102. P. 2063–2073.

- Remy B., Mion S., Plener L., Elias M., Chabriere E., Daude D. Interference in bacterial Quorum sensing: a biopharmaceutical perspective // *Front. Pharmacol.* 2018. V. 9. P. 203.
- Senderovich H., Vierhout M.J. Is there a role for charcoal in palliative diarrhea management? // *Curr. Med. Res. Opin.* 2018. V. 34. P. 1253–1259.
- Skindersoe M.E., Alhede M., Phipps R., Yang L., Jensen P.O., Rasmussen T.B., Bjarnsholt T., Tölker-Nielsen T., Hoiby N., Givskov M. Effects of antibiotics on Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2008. V. 52. P. 3648–3663.
- Stauff D.L., Bassler B.L. Quorum sensing in *Chromobacterium violaceum*: DNA recognition and gene regulation by the CviR receptor // *J. Bacteriol.* 2011. V. 193. P. 3871–3878.
- Swatton J.E., Davenport P.W., Maunders E.A., Griffin J.L., Lilley K.S., Welch M. Impact of azithromycin on the quorum sensing controlled proteome of *Pseudomonas aeruginosa* // *PLoS One.* 2016. V. 11. P. e0147698.
- Tallarida R.J. An overview of drug combination analysis with isobolograms: perspectives in pharmacology // *Pharmacol. Exp. Ther.* 2006. V. 3. № 19. P. 1–7.
- Waters C.M., Bassler B.L. Quorum sensing: Cell-to-cell communication in bacteria // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2005. V. 21. P. 319–346.
- Zhang S., Liu N., Liang W., Han Q., Zhang W., Li C. Quorum sensing-disrupting coumarin suppressing virulence phenotypes in *Vibrio splendidus* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2016. V. 101. P. 3371–3378.
- Zhou J.W., Chen T.T., Tan X.J., Sheng J.Y., Jia A.Q. Can the quorum sensing inhibitor resveratrol function as an aminoglycoside antibiotic accelerant against *Pseudomonas aeruginosa*? // *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2018. V. 52. P. 35–41.
- Zhou J.W., Hou B., Liu G.Y., Jiang H., Sun B., Wang Z.N., Shi R.F., Xu Y., Wang R., Jia A.Q. Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm by hordenine: a combinatorial study with aminoglycoside antibiotics // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2018. P. 1–14.

Quorum Sensing Inhibition in *Chromobacterium violaceum* by Amikacin Combination with Activated Charcoal or Small Plant-Derived Molecules (Pyrogallol and Coumarin)

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

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

*e-mail: dgderabin@yandex.ru

Received November 8, 2018

Revised December 3, 2018

Accepted December 10, 2018

Abstract—The study was aimed to effective inhibition of quorum sensing (QS) in the model bacterium *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532 by combinations of compounds with different anti-QS activity mechanisms. These mechanisms were: (1) suppression of autoinducer (C₆-AHL) biosynthesis by subinhibitory concentrations of an aminoglycoside antibiotic amikacin; (2) sorption of synthesized C₆-AHL on activated charcoal particles; and (3) decreasing the bacterial cells sensitivity to the autoinducer by low-molecular weight compounds of plant origin: pyrogallol or coumarin. Simultaneous presence of amikacin and activated charcoal in the cultivation medium paradoxically decreased their combined anti-QS activity due to partial binding of the antibiotic to the sorbent particles, while two-step use of antibiotic first and then sorbent led to additive effect due to sequential decrease the of C₆-AHL extracellular concentration. Amikacin combinations with pyrogallol or coumarin resulted in a expressed anti-QS effect, with evidence of superadditivity showed by isobolographic analysis. Probable formation of the tested compositions in the natural environment is discussed, as well as their possible application against the bacterial infections, which use the QS system for induction of their pathogenic potential.

Keywords: quorum sensing, *Chromobacterium violaceum*, amikacin, activated charcoal, pyrogallol, coumarin

ДЕЙСТВИЕ НИЗКОЧАСТОТНОГО ИМПУЛЬСНОГО МАГНИТНОГО ПОЛЯ И НИЗКОИНТЕНСИВНОГО ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА АКТИВНОСТЬ ОКСИДОРЕДУКТАЗ И РОСТ МИКРОМИЦЕТОВ – АКТИВНЫХ ДЕСТРУКТОРОВ ПОЛИМЕРНЫХ МАТЕРИАЛОВ

© 2019 г. И. О. Макаров^a, Д. А. Клюев^a, В. Ф. Смирнов^{a,*},
О. Н. Смирнова^a, Н. А. Аникина^a, Н. В. Дикарева^a

^aНижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, г. Нижний Новгород, 603950, Россия

*e-mail: biodeg@mail.ru

Поступила в редакцию 13.02.2018 г.

После доработки 04.09.2018 г.

Принята к публикации 02.10.2018 г.

Исследовано действие низкочастотного импульсного магнитного поля и низкоинтенсивного лазерного излучения на мицелиальные грибы, активные биодеструкторы различных полимерных материалов. Установлено, что данные факторы по-разному действуют на споры и вегетативный мицелий грибов. Показано, что действие излучений может как стимулировать, так и ингибировать рост грибов. Исследуемые физические факторы имели дозозависимые эффекты на активность внеклеточных оксидоредуктаз грибов (каталазу, пероксидазу); отмечены как увеличение, так и снижение активности ферментов.

Ключевые слова: низкочастотное импульсное магнитное поле, низкоинтенсивное лазерное излучение, мицелиальные грибы, рост, активность оксидоредуктаз, каталаза, пероксидаза

DOI: 10.1134/S0026365619010063

Известно, что микроскопические грибы обладают системами высокоактивных окислительных, гидролитических и других ферментов, осуществляющих разнообразные химические превращения сложных субстратов как природного, так и синтетического происхождения, которые зачастую являются труднодоступными или недоступными для других микроорганизмов.

Деструктивной активности микромицетов придается большое значение в области прикладной микробиологии. Повышение уровня деструктивной активности грибов, особенно актуально при разработке технологий, связанных с утилизацией промышленных отходов и очисткой окружающей среды от загрязнений. Напротив, подавление деструктивной активности микромицетов востребовано в области предотвращения процессов биоповреждений промышленных материалов. В связи с этим большое значение придается исследованию воздействия различных факторов (химических, физических), способных регулировать деструктивную активность грибов.

В последнее время в качестве таких факторов используются электромагнитное излучение, например, низкоинтенсивное лазерное излучение (НИЛИ), магнитные поля (МП) различной природы и ин-

тенсивности. В ряде работ было продемонстрировано воздействие магнитных полей различной природы на рост микромицетов, показано запаздывание фазы спороношения и/или полное ингибирование процессов спорообразования, а также морфологические изменения клеток грибов (Быстрова с соавт., 2009; Nagy, Fischl, 2004; Treu, Larnoy, 2016).

В работах Manoliu et al. (2005), Potenza et al. (2012), Касатовой с соавт. (2017) продемонстрировано, что магнитное поле может оказывать как положительный, так и отрицательный эффект на грибные оксидоредуктазы, увеличивая или снижая их активность. Также обнаружено, что эффективность воздействия на микроскопические грибы импульсного магнитного поля выше в сравнении с постоянным и переменным полями (Treu, Larnoy, 2016).

Несмотря на то, что накоплен обширный экспериментальный материал о биологических эффектах электромагнитных полей, понимание механизмов их воздействия на биологические системы до сих пор не достаточны (Бинги, Савин, 2003; Новицкая с соавт., 2006). Не в полной мере исследованы зависимость величин биологических биоэффектов (особенно для микромицетов)

от характеристик и режима воздействия электромагнитного поля (Hristov, Perez, 2011).

Хотя воздействие магнитных полей на живые объекты изучено сравнительно подробно, в меньшей степени это касается микроорганизмов, воздействие низкоинтенсивных лазерных излучений на микромицеты практически не затрагивается в современных исследованиях.

Существуют отдельные данные, свидетельствующие о том, что лазерное излучение определенных параметров неоднозначно воздействует на рост и развитие микроорганизмов. В частности, рядом исследователей показан стимулирующий эффект воздействия лазерного излучения красного и инфракрасного спектра (Бочков, Хафизов, 2013), в то время как в других исследованиях отмечен его дозозависимый эффект (Долгова с соавт., 2014) и при определенных параметрах ингибирующее действие (Кунин с соавт., 2012). Анализ имеющейся информации позволяет заключить, что исследований, комплексно рассматривающих воздействие лазерного излучения на микроорганизмы, на данный момент крайне мало.

Известно, что процесс биодеструкции промышленных материалов под воздействием грибов имеет энзиматическую природу. В этом процессе принимают участие такие внеклеточные ферменты, как оксидоредуктазы и гидролазы. Поэтому весьма актуальными являются исследования направленные на регулирование энзиматической активности микромицетов под воздействием различных факторов, в том числе физических.

В связи с вышеизложенным целью настоящего исследования было изучать действие электромагнитного излучения низкочастотного импульсного магнитного поля и низкоинтенсивного лазерного излучения на активность внеклеточных оксидоредуктаз (каталазы, пероксидазы) и на рост ряда мицелиальных грибов – деструкторов промышленных материалов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследования были следующие штаммы мицелиальных грибов, полученные из Всероссийской коллекции микроорганизмов (ИБФМ РАН, Пушкино): *Penicillium cyclopium* Westling ВКМ F-266, *Aspergillus niger* van Tieghen ВКМ F-1119, *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler ВКМ F-1120. Эти виды микромицетов являются активными биодеструкторами различных промышленных материалов и хорошими продуцентами экзооксидоредуктаз, в частности каталазы и пероксидазы (Пехташева с соавт., 2012).

Линейную скорость роста микромицетов определяли на агаризованной среде Чапека-Докса следующего состава (г/л): NaNO_3 – 2.0; KH_2PO_4 – 0.74;

K_2HPO_4 – 0.3; KCl – 0.5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.5; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.01; агар – 20.0; сахароза – 30.0.

Рост биомассы определяли при развитии микромицетов в среде Чапека-Докса без агара.

При оценке активности оксидоредуктаз в состав питательной среды Чапека-Докса без агара в качестве индуктора добавляли сосновые опилки в количестве 10.0 г/л.

В качестве физического фактора, воздействующего на грибы, использовали низкочастотное импульсное электромагнитное поле. Для создания поля использовали источник VL 2 (пачки по 20 импульсов длительностью 227 мкс с амплитудой магнитной индукции 1.5 мТл, следующие с частотой 15 Гц) и применяли генератор фирмы “Electro-Biology (inc.) (USA).

Также для воздействия на микромицеты использовался многомодовый полупроводниковый InGaP/GaAs/InGaAs лазер полоскового типа, изготовленный в НИФТИ ННГУ. Режим работы лазера непрерывный, длина волны генерации 980 нм. Изучали воздействие лазера на двух показателях мощности – 0.3 и 0.7 Вт, диапазон мощности выбран нами для исключения влияния теплового эффекта на объекты исследований.

При определении прироста биомассы и активности экзооксидоредуктаз грибы выращивали в колбах Эрленмейера емкостью 500 мл с 250 мл жидкой питательной среды Чапека-Докса при перемешивании (200 об./мин) и температуре $27 \pm 2^\circ\text{C}$. Время культивирования составляло 10 сут, после чего навески мицелия по 300 мг подвергали воздействию: 1) лазерного излучения, время экспозиции для каждой мощности составляло 5 и 10 мин, и 2) электромагнитного поля, время экспозиции составляло 30, 90, 150 и 210 мин. После облучения мицелий помещали в колбы Эрленмейера на доращивание еще на 10 сут в тех же условиях. Затем определяли прирост биомассы и активность ферментов. Контролем служили варианты, не подвергавшиеся воздействию физических факторов.

Активность экзоферментов (каталазы и пероксидазы) грибов в культуральной жидкости определяли спектрофотометрически на приборе UVmini-1240 (Shimadzu, Япония): каталазную – по убыли H_2O_2 при длине волны 240 нм (Li, Shellhorn, 2007), пероксидазную – по окислению *n*-фенилендиамина при длине волны – 535 нм (Nagaraja et al., 2009). За единицу активности каждого фермента принимали изменение оптической плотности реакционной смеси за 1 мин в пересчете на 1 мг белка.

Линейную скорость роста грибов определяли общепринятым методом (Билай, 1982), измеряя ежедневно в течение 10 сут диаметр колоний грибов, растущих на плотной питательной среде.

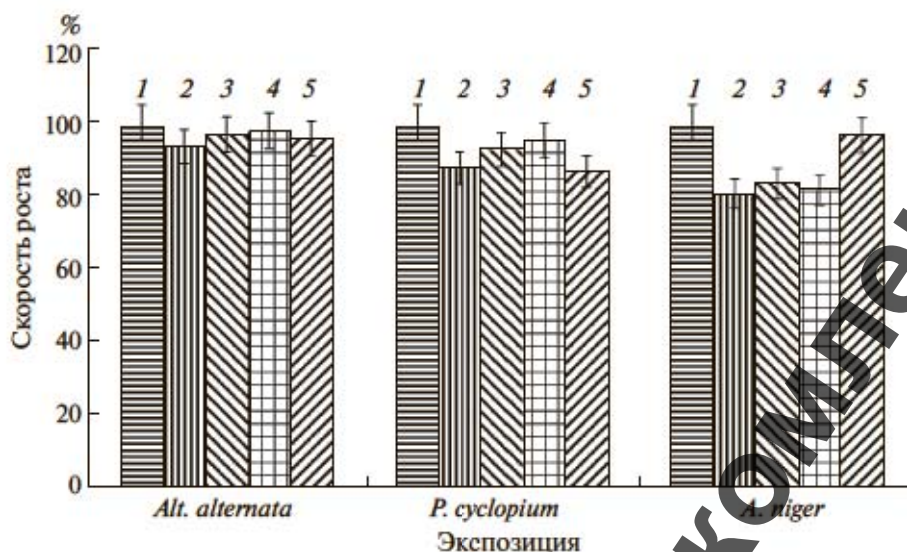


Рис. 1. Влияние НИЛИ на линейную скорость роста грибов, в % к контролю. Обозначение: 1 – контроль; 2 – 0.3 Вг, 5 мин; 3 – 0.3 Вг, 10 мин; 4 – 0.7 Вг, 5 мин; 5 – 0.7 Вг, 10 мин.

Все результаты, полученные не менее, чем в трех независимых экспериментах и не менее, чем в 3–5 повторностях, обрабатывали с помощью программ Statistica 10.0 и Microsoft Excel 2007. Оценку достоверности различий средних значений проводили по критерию Стьюдента для уровня вероятности не менее 95%. В таблицах и на рисунках приведены средние значения всех опытов со стандартными ошибками.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе определяли зависимость линейной скорости роста грибов от времени экспозиций действующих факторов. Известно, что эти показатели используют при оценке воздействия различных неблагоприятных факторов на жизнедеятельность грибов (Билай, 1982).

Анализ результатов по воздействию лазерного излучения на линейную скорость роста (рис. 1) показал, что имел место ингибирующий эффект для *Aspergillus niger* при всех вариантах воздействия, кроме сильного длительного (0.7 Вг, 10 мин). Для *Penicillium cyclopium* ингибирование линейной скорости роста наблюдалось только при слабом кратковременном (0.3 Вг, 5 мин) воздействии. У *Alternaria alternata* практически не отмечалось изменений скорости роста во всех вариантах воздействия. Активацию роста не наблюдали ни в одном эксперименте.

Действие магнитного поля не приводило к существенному изменению скорости роста гриба *Alt. alternata*. Незначительное ингибирование роста отмечалось для гриба *A. niger* при экспозиции 30 и 90 мин. У *P. cyclopium*, напротив, наблюдалось досто-

верное увеличение линейной скорости роста при экспозиции длительностью 90 и 150 мин (рис. 2).

При сравнении действия МП и НИЛИ на линейную скорость роста грибов можно отметить, что наибольшей устойчивостью к действию исследованных факторов обладал гриб *Alt. alternata* (показатель роста оставался на уровне контроля при всех вариантах воздействия). В случае *A. niger* имело место ингибирование скорости роста как при воздействии НИЛИ, так и МП. В опытах с *P. cyclopium* эти факторы имели различные знаки биоэффекта. Все это позволяет говорить о том, что устойчивость микромицетов к действию физических факторов определяется как их природой и интенсивностью воздействия, так и физиолого-биохимическими особенностями микромицетов. Устойчивость гриба *Alt. alternata*, относящегося к темноокрашенным грибам, к действию исследованных факторов может быть обусловлено высоким содержанием меланина, как известно, повышающим устойчивость живых организмов к действию различных излучений (Жданова, Василевская, 1988).

Следует отметить, что в настоящее время имеются разрозненные исследования в области воздействия магнитных полей на рост мицелиальных грибов. В частности, в работе Треу, Larnøy (2016) было показано, что переменное магнитное поле способно подавлять рост грибов, участвующих в биоповреждении древесины, а постоянное магнитное поле – стимулировать рост микромицетов. В работе Быстровой (2009), также как и в наших экспериментах, эффект воздействия магнитного поля был неоднозначным: в ряде вариантов имело место снижение скорости роста грибов

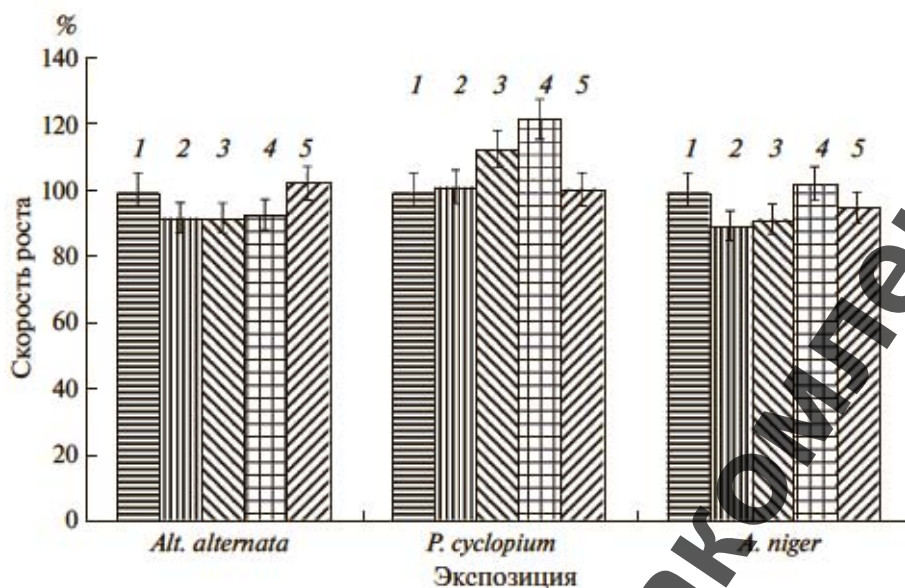


Рис. 2. Влияние ЛП на линейную скорость роста грибов, в % к контролю. Обозначение: 1 – контроль; 2 – 30 мин; 3 – 90 мин; 4 – 150 мин; 5 – 210 мин.

на 15–17%, а в других, напротив, отмечено увеличение скорости роста до 10%.

Рост мицелиальных грибов при действии на них различных физических и химических факторов можно охарактеризовать не только по скорости увеличения их колоний, но и по приросту биомассы при культивировании в жидкой питательной среде.

Полученные нами результаты свидетельствуют о неоднозначности действия низкочастотного лазерного излучения на прирост биомассы грибов. В опытах с *Alt. alternata* имело место снижение накопления биомассы при всех вариантах воздействия по сравнению с контролем, в то время как накопление биомассы *A. niger* снижалось только при слабом кратковременном (0.3 Вт, 5 мин) и сильном долговременном (0.7 Вт, 10 мин) воздействии. Для *P. cyclopium* ингибирующий эффект показан только при сильном долговременном (0.7 Вт, 10 мин) воздействии, в остальных слу-

чаях наблюдалось достоверное повышение прироста биомассы (табл. 1).

Действие ЛП на прирост биомассы также оказалось неоднозначным. Для *P. cyclopium* имело место снижение прироста биомассы относительно контроля во всех вариантах опыта (30–210 мин). Для *A. niger* кратковременное воздействие (30 мин) приводило к увеличению биомассы, а более длительное время экспозиции (150 и 210 мин) ингибировало прирост биомассы *A. niger*. В случае гриба *Alt. alternata* имело место достоверное снижение прироста биомассы при 30, 150 и 210 мин экспозиции (табл. 2).

Сравнение результатов, представленных в табл. 1 и табл. 2, показывает, что одни и те же дозы воздействия исследуемых физических факторов различным образом влияют на прирост биомассы у разных грибов, что связано с физиолого-биохимическими особенностями каждого вида.

Несовпадение результатов влияния исследуемых нами факторов на линейную скорость роста

Таблица 1. Действие ЛП на прирост биомассы микромицетов в глубинных культурах

	<i>A. niger</i>		<i>Alt. alternata</i>		<i>P. cyclopium</i>	
	прирост, мг	прирост, %	прирост, мг	прирост, %	прирост, мг	прирост, %
Контроль	217.5 ± 10.2	100	317.0 ± 13.3	100	211.5 ± 10.2	100
0.3 Вт, 5 мин	169.7 ± 9.4	78	256.8 ± 10.9	81	234.8 ± 6.1	111
0.3 Вт, 10 мин	213.2 ± 12.1	98	234.6 ± 10.4	74	253.8 ± 15.5	120
0.7 Вт, 5 мин	254.5 ± 15.5	117	279.0 ± 16.7	88	181.9 ± 12.9	86
0.7 Вт, 10 мин	158.8 ± 9.9	73	260.0 ± 12.4	82	294.0 ± 19.4	139

Таблица 2. Действие МП на прирост биомассы микромицетов в погруженных культурах

	<i>A. niger</i>		<i>Alt. alternata</i>		<i>P. cyclopium</i>	
	прирост, мг	прирост, %	прирост, мг	прирост, %	прирост, мг	прирост, %
Контроль	180.0 ± 9.4	100	185.5 ± 7.5	100	268.0 ± 12.1	100
30 мин	319.5 ± 12.2	213	135.4 ± 6.3	73	91.1 ± 6.9	34
90 мин	164.5 ± 6.5	103	200.3 ± 10.2	108	123.2 ± 8.6	46
150 мин	40.5 ± 2.8	27	161.4 ± 9.4	87	187.6 ± 7.4	70
210 мин	70.0 ± 3.7	47	103.9 ± 8.8	56	179.6 ± 7.2	67

и прирост биомассы может быть связано с тем, что при оценке линейной скорости роста воздействие оказывалось на споровые формы, тогда как при оценке прироста биомассы – на вегетативные формы грибов. Известно, что в спорах грибов и вегетативном мицелии протекание метаболических процессов различно, вследствие чего грибы, находящиеся на различных стадиях роста, будут по-разному реагировать на действие различных факторов окружающей среды, в т.ч. и физических.

Как уже отмечалось выше, оксидоредуктазы играют важную роль в жизнедеятельности микроорганизмов, в том числе микроскопических грибов. Экстрацеллюлярные ферменты участвуют в метаболизме различных субстратов природного и синтетического происхождения. В частности, в работах (Shah, 2008) и (Аникина, 2016) показано участие каталазы и пероксидазы в деструкции эпоксидных компаундов, стиролов, полистиролов, акрилатов. В связи с этим представляло интерес рассмотреть действие исследуемых факторов на активность вышеуказанных ферментов.

Влияние низкоинтенсивного лазерного излучения на активность каталазы (рис. 3) у *A. niger* и *P. cyclopium* было дозозависимым и различным: с увеличением мощности и времени воздействия активность каталазы у *A. niger* возрастала, у *P. cyclopium* снижалась. У гриба *Alt. alternata* активность каталазы снижалась при слабом кратковременном (0.3 Вт, 5 мин) и сильном долговременном (0.7 Вт, 10 мин) воздействии. Активность пероксидазы снижалась у всех объектов (по сравнению с контролем) во всех вариантах воздействий, за исключением *P. cyclopium* при действии лазерного излучения с мощностью 0.3 Вт длительностью 10 мин (рис. 4). Отметим, что в работах (Manteifel, Karu, 2007) и (Fedoseyeva et al., 1984) при исследовании воздействия низкоинтенсивного лазерного излучения на активность оксидоредуктаз дрожжей были получены результаты, свидетельствующие об увеличении активности при низких дозах воздействия и об ее уменьшении при высоких дозах.

В случае воздействия низкочастотного магнитного поля (рис. 5, рис. 6) имела место временная дозозависимость активности исследуемых ферментов гриба *P. cyclopium*. При этом, изменение актив-

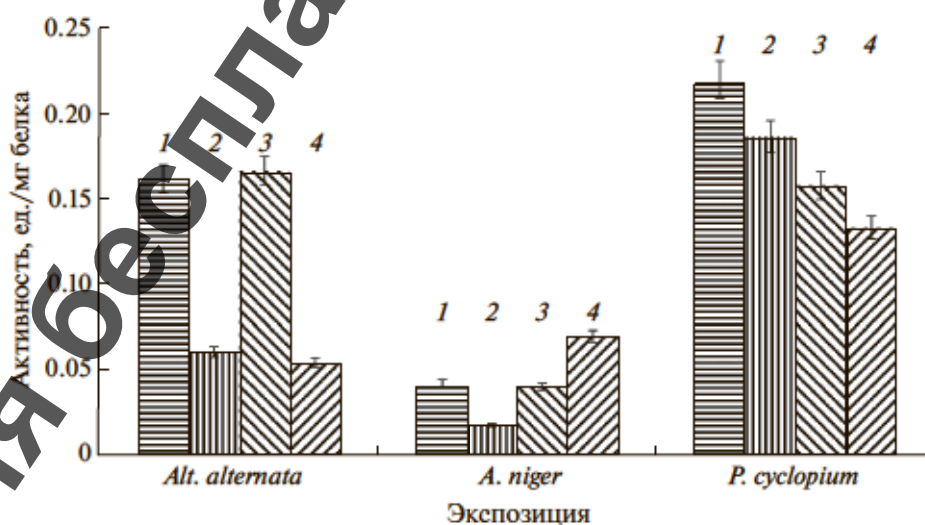


Рис. 3. Влияние НИЛИ на активность каталазы грибов (в ед./мг белка). Обозначение: 1 – контроль; 2 – 0.3 Вт, 5 мин; 3 – 0.3 Вт, 10 мин; 4 – 0.7 Вт, 10 мин.

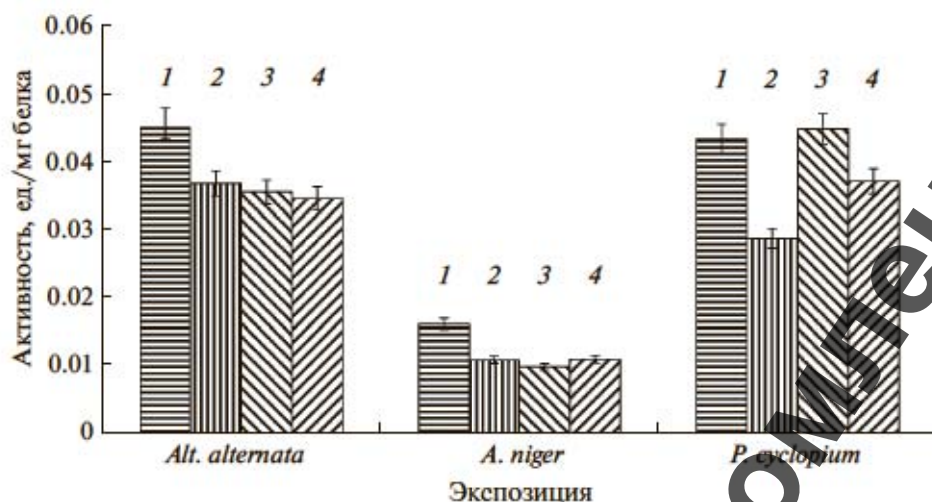


Рис. 4. Влияние НИЛИ на активность пероксидазы грибов (в ед./мг белка). Обозначение: 1 – контроль; 2 – 0.3 Вт, 5 мин; 3 – 0.3 Вт, 10 мин; 4 – 0.7 Вт, 10 мин.

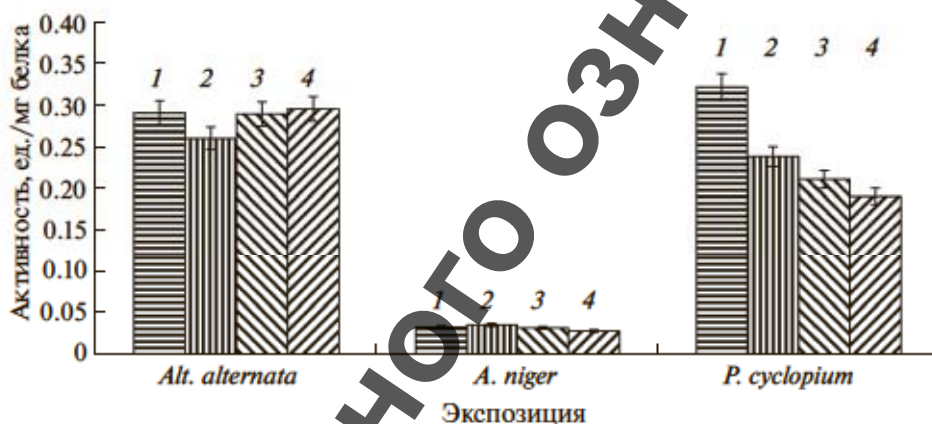


Рис. 5. Влияние МП на активность каталазы грибов (в ед./мг белка). Обозначение: 1 – контроль; 2 – 30 мин; 3 – 90 мин; 4 – 150 мин.

ности пероксидазы и каталазы под действием электромагнитного поля было неодинаково: с увеличением времени воздействия активность пероксидазы снижалась; максимальное ингибирование каталазы наблюдалось при 30 мин экспозиции, а с увеличением времени воздействия ее активность возрастала. Активность исследуемых экзооксидоредуктаз гриба *A. niger* под влиянием МП оставалась на уровне контроля во всех вариантах опыта. Активность пероксидазы *Alt. alternata* возрастала при воздействии слабого низкочастотного импульсного магнитного поля длительностью 90 мин и снижалась при 150 мин, в то время как активность каталазы не имела достоверных различий с контролем при всех вариантах воздействия.

При интерпретации результатов этого блока исследований необходимо отметить работу (Касатова, 2017), в которой также отмечено неоднознач-

ное действие магнитного поля на ферментативную активность гриба *Trichoderma virens*. После 30- и 90-мин экспозиции активность пероксидазы снижалась, а после 150 мин воздействия – возрастала. Активность каталазы в отличие от наших данных не изменялась при всех воздействиях. Отмеченные различия могут быть связаны со спецификой воздействия магнитного поля, как непосредственно на макромолекулы ферментов, так и на клеточные структуры (Manoliu et al, 2005; Bingi, Rubin, 2007). Изменение активности могло быть обусловлено, как мембранотропным действием МП на клетки грибов, что влияло на выход ферментов в среду культивирования (Watters, Griffiths, 2001), так и непосредственным воздействием МП на активный центр ферментов (Новичкова, Подковкин, 2009).

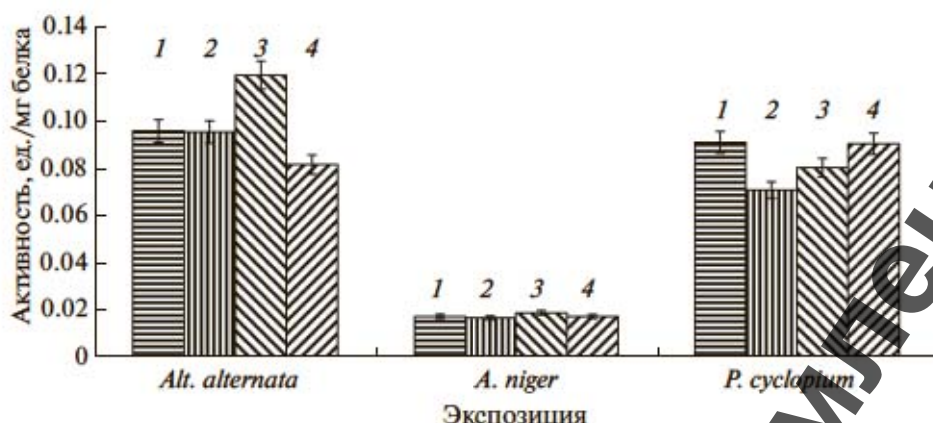


Рис. 6. Влияние МП на активность пероксидазы грибов (в ед./мг белка). Обозначение: 1 — контроль; 2 — 30 мин; 3 — 90 мин; 4 — 150 мин.

Такие различия в действии электромагнитных излучений на ферментативную активность грибов могут объясняться их физиолого-биохимическими особенностями, а именно различиями в механизмах адаптации, обеспечивающих их устойчивость или чувствительность к действию физических факторов. Высказанные соображения могут быть подтверждены исследованиями, где при низких дозах воздействия можно наблюдать снижение значений физиолого-биохимических показателей, а затем их возрастание до уровня контроля при более высоких дозах, включающих (индуцирующих) работу адаптационных механизмов.

Таким образом, проведенные исследования показали, что низкочастотное импульсное магнитное поле и низкоинтенсивное лазерное излучение по-разному действуют на споры и вегетативный мицелий грибов. Также различные эффекты были отмечены в отношении влияния этих факторов на экстрацеллюлярные каталазу и пероксидазу, которые принимают участие в биодеградации ряда полимерных материалов: имело место, как подавление ферментативной активности, так и ее активация. Наблюдаемое дозозависимое действие исследуемых факторов на жизнедеятельность мицелиальных грибов зависит, как от природы самого фактора, так и от организмов-реципиентов.

Полученные нами результаты могут быть использованы в различных биотехнологических процессах, связанных с жизнедеятельностью мицелиальных грибов, а также при защите различных материалов от биоповреждений и разрушений, вызываемых микромицетами.

Работа выполнена при поддержке стипендии президента Российской Федерации молодым ученым и аспирантам, осуществляющим перспективные научные исследования и разработки по приоритетным направлениям № СП-109.2016.3 и с использованием оборудования ЦКП "Новые ма-

териалы и ресурсосберегающие технологии" (ННГУ им. Н.И. Лобачевского).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Билай В.И. Методы экспериментальной микологии. Киев: Наукова думка, 1982. 552 с.
- Бинги В.Н., Савин А.В. Физические проблемы действия слабых магнитных полей на биологические системы // Успехи физических наук. 2003. Т. 173. № 3. С. 265–300.
- Быстрова Е.Ю., Богомолова Е. В., Гаврилов Ю.М., Панина Л. К., Стефанов В.Е., Сурма С.В., Щеголев Б.Ф. Влияние постоянного магнитного и экранированного геомагнитного полей на развитие колоний микромицетов // Микология и фитопатология. 2009. Т. 43. № 5. С. 438–446.
- Долова Д.Р., Абакумова Т.В., Фомина А.В., Воронова О.С. Функциональное состояние *Saccharomyces cerevisiae* после фемтосекундного лазерного излучения // Ульяновский медико-биологический журнал. 2014. № 2. С. 58–61.
- Жданова Н.Н., Василевская А.И. Меланинсодержащие грибы в экстремальных условиях. Киев: Наукова думка, 1988. 194 с.
- Касатова Е.С., Стручкова И.В., Аникина Н.А., Смирнов В.Ф. Действие слабого низкочастотного электромагнитного поля на активность экстрацеллюлярных оксидоредуктаз *Trichoderma virens* // Микология и фитопатология. 2017. Т. 51 (2). С. 99–103.
- Кунин А.А., Коровкина А.Н., Олейник О.И., Мухина Е.Г. Клинико-микробиологическое обоснование применения низкоинтенсивного лазерного излучения в комплексном лечении начальных форм воспалительных заболеваний пародонта // ВНМТ. 2012. № 2. С. 356–358.
- Новицкая Г.В., Кочешкова Т.К., Новицкий Ю.И. Влияние слабого постоянного магнитного поля на состав и содержание липидов листьев лука разного возраста // Физиология растений. 2006. Т. 55. № 5. С. 721–781.
- Новичкова Е.А., Подковкин В.Г. Анализ действия электромагнитного поля ЛЭП на активность ферментов антиоксидантной защиты в тканях подсолнечника на

разных этапах вегетации // Вестник СамГУ. 2009. № 70. С. 183–191.

Пехташева Е.Л., Неверов А.Н., Заиков Г.Е., Стоянов О.В. Биодеструкция и биоповреждения материалов. Кто за это в ответе? // Вестник Казанского технологического университета. 2012. № 8. С. 222–233.

Binhi V.N., Rubin A.B. The fundamental problem magnetobiology // Biomeditsinskie tekhnologii i elektronika. 2007. V. 43. № 5. P. 565–575.

Fedoseyeva G.E., Karu T.I., Letokhov V.S., Lobko V.V., Pomoshnikova N.A., Lyapunova T.S., Meissel M.N. Effect of the He-Ne laser radiation on the reproduction rate and protein synthesis of the yeast // Laser Chemistry. 1984. V. 5. № 1. P. 27–33.

Hristov J., Perez V.H. Critical analysis of data concerning *Saccharomyces cerevisiae* free-cell proliferations and fermentations assisted by magnetic and electromagnetic fields // Int. Rev. Chem. Eng. 2011. V. 3. № 1. P. 3–20.

Manoliu A., Oprica L., Olteanu Z., Neacsu I., Rusu I., Creanga D., Bodale I. The magnetosensitivity of some cellulolytic fungi revealed by means of the soluble protein response to electromagnetic field exposure // ANALELE ȘTIINȚIFICE ale Universității “Al. I. Cuza” din Iași. Biofizică, Fizică medical și Fizica mediului. 2005. T. 1. P. 77–80.

Manteifel V., Karu T. Prolonged Effects of He-Ne Laser Irradiation on Ultrastructure of Mitochondria in Successive Generations of Yeast Cells // Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology / Eds. Méndez-Vilas A. Spain: Formatex, 2007. V. 1. P. 21–31.

Nagy P., Fischl G. Effect of static magnetic field on growth and sporulation of some plant pathogenic fungi // Bioelectromagnetics. 2004. V. 25. № 4. P. 316–318.

Potenza L., Saltarelli R., Polidori E., Ceccaroli P., Amicucci A., Zeppa S., Zambonelli A., Stocchi V. Effect of 300 mT static and 50 Hz 0.1 mT extremely low frequency magnetic fields on magnetic *Tuber borchii* mycelium // Can. J. Microbiol. 2012. V. 58. № 10. P. 1174–1182.

Shah A.A. Biological degradation of plastics: A Comprehensive review // Biotechnology Advances. 2008. V. 26. P. 246–265.

Treu A., Larnøy E. Impact of a low pulsed electric field on the fungal degradation of wood in laboratory trials // Int. Biodet. Biodeg. 2006. V. 114. P. 244–251.

Watters M.K., Griffiths A. J. F. Tests of a cellular model for constant branch distribution in the filamentous fungus *Neurospora crassa* // Appl. Environ. Microbiol. 2001. V. 67. P. 1788–1792.

Effect of Low-Frequency Pulsed Magnetic Field and Low-Level Laser Radiation on Oxidoreductase Activity and Growth of Fungi—Active Destructors of Polymer Materials

I. O. Makarov¹, D. A. Klyuev¹, V. F. Smirnov¹*, O. N. Smirnova¹, N. A. Anikina¹, and N. V. Dikareva¹

¹National Research Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod, Nizhni Novgorod, 603950 Russia

*e-mail: biodeg@mail.ru

Received February 13, 2018

Revised April 9, 2018

Accepted October 2, 2018

Abstract—Effect of low-frequency pulsed magnetic field and of low-intensity laser radiation on mycelial fungi actively degrading various polymer materials was studied. These factors had a different effect on spores of fungi and mycelia. Irradiation could stimulate and suppress fungal growth. The studied physical factors had dose-dependent effects on activity of the extracellular fungal oxidoreductases (catalase and peroxidase); both increased and decreased enzymatic activities were observed.

Keywords: low-frequency pulsed magnetic field, low-intensity laser radiation, mycelial fungi, growth, oxidoreductase activity, catalase, peroxidase

ЗАЩИТА БХЛ850 ОТ ДЕЙСТВИЯ СИНГЛЕТНОГО КИСЛОРОДА В МЕМБРАНАХ СЕРНОЙ ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩЕЙ БАКТЕРИИ *ALLOCHROMATIUM VINOSUM* С ПОМОЩЬЮ ТУШИТЕЛЕЙ

© 2019 г. З. К. Махнева^а, А. А. Ашихмин^а, М. А. Большаков^а, А. А. Москаленко^а, *

^аИнститут фундаментальных проблем биологии РАН, Московская обл., Пушкино, 142290, Россия

*e-mail: lfby22@gmail.com

Поступила в редакцию 30.07.2018 г.

После доработки 20.09.2018 г.

Принята к публикации 02.10.2018 г.

Исследовано действие синглетного кислорода в системе: мембраны *Allochromatium (Alc.) vinosum* штамм МГУ–бенгальский розовый–свет (547–600 нм) без тушителя или с тушителем. Показано, что в системе без тушителя наблюдается выцветание полосы БХл850 светособирающего комплекса LH2, и появляется пик поглощения в области 698 нм, принадлежащий 3-ацетил-хлорофиллу, продукту окисления БХл. Изучена эффективность пяти тушителей синглетного кислорода – аскорбата натрия, гистидина, имидазола, тролокса и азиды натрия – на нейтрализацию действия синглетного кислорода на бактериохлорофилл (БХл) в светособирающих комплексах мембран *Alc. vinosum* МГУ. Показано, что все они, за исключением азиды натрия, успешно нейтрализовали его действие.

Ключевые слова: фотосинтезирующие бактерии, фотосинтез, комплексы LH2 и LH1, синглетный кислород, 3-ацетил-хлорофилл, тушители синглетного кислорода

DOI: 10.1134/S0026365619010129

Пурпурные фотосинтезирующие бактерии делятся на две группы по возможности их роста в присутствии кислорода: аэробные и анаэробные. К первой из них относятся несерные бактерии, например, *Rb. sphaeroides*, которая может расти как фототрофно, и тогда в ее клетках (комплексах) накапливается сфероиден, или фотогетеротрофно, в этом случае сфероиден заменяется сфероиденоном, имеющим одну дополнительную кетогруппу (Takachi, 2009). Во вторую группу входят серные бактерии (*Alc. vinosum*, *T. tepidum* и т.д.), которые могут расти только фототрофно. Очевидно, что указанные различия связаны с эволюцией (или ее отсутствием) обеих групп бактерий в условиях увеличивающейся концентрации кислорода в атмосфере и среде обитания. Первая группа смогла приспособиться к подобным условиям и одновременно выработать принципы защиты от окисления активными формами кислорода, в основ-

ном синглетного кислорода, а вторая ограничила свой ареал серной бескислородной средой.

БХл является основным пигментом пурпурных фотосинтезирующих бактерий наряду с каротиноидами (дополнительные пигменты), и оба типа пигментов локализованы в пигмент-белковых комплексах. У фотосинтезирующих бактерий в мембране обычно присутствуют три вида комплексов: два светособирающих – LH1 и LH2 и реакционный центр (РЦ). Функция комплексов LH2 и LH1 заключается в поглощении квантов света и передаче этой энергии в виде энергии электронного возбуждения к РЦ, где происходит первичное разделение зарядов (Hoff, Deisenhofer, 1997). Светособирающие комплексы – это основные комплексы в мембранах и на их долю приходится до 99% пигментов. Они построены по общему принципу из низкомолекулярных полипептидов. Основным структурным модулем этих комплексов является так называемый α/β -гетеродимер, состоящий из двух полипептидов, с которым нековалентно связаны молекулы БХл (БХл800 и БХл850 в комплексе LH2 и БХл870–890 в комплексе LH1) и молекула каротиноида (Gabrielsen et al., 2009). У несерных бактерий комплексы LH2 состоят, как правило, из 8–9, а комплекс LH1 – из 16 пар гетеродимеров соответственно. Комплекс LH2 содержит 24–27 молекул БХл и 8–9 молекул кароти-

Принятые сокращения: БХл – бактериохлорофилл, ДМ – додецил β -D-маннопиранозид, ДФА – дифениламин, NaN_3 – азид натрия, LH – светособирающий, ДФА-образец (мембрана, комплекс) – образец, полученный из клеток, выращенных в 71 μM ДФА, *Alc.* – *Allochromatium*, *Ect.* – *Ectothiorhodospira*, *Rb.* – *Rhodobacter*, *Rps.* – *Rhodospseudomonas*, *Rsp.* – *Rhodospirillum*, *Trs.* – *Thiorhodospira*, *T.* – *Thermochromatium*.

ноидов, а в LH1 – 32 молекулы БХл и 16 молекул каротиноидов. Недавно было показано, что комплексы LH2 из серных бактерий *Alc. vinosum* представляют более крупные структуры по сравнению с комплексами из несерных бактерий. Они построены из 12 пар гетеродимеров и содержат 36 молекул БХл и 12 молекул каротиноидов (Niedzwiedzki et al., 2012; Löhner et al., 2015). БХл850 в этих комплексах легко окисляется под действием феррицианида калия или синглетного кислорода по сравнению с комплексами из несерных бактерий (Махнева и соавт., 2016), что, по-видимому, связано с отсутствием как защитных механизмов, так и изменений в структуре, которые приводили бы к уменьшению действия окислителей.

Известно, что после поглощения молекулой БХл энергии кванта света и перехода ее в долгоживущее триплетное состояние происходит ее взаимодействие с молекулой кислорода и образование синглетного кислорода. Последний является сильным окисляющим агентом, который способен окислять не только БХл, но и другие компоненты клетки (Imlay, 2003). В последние годы повысился интерес к влиянию высоких концентраций как кислорода, так и синглетного кислорода, на рост несерных бактерий. С помощью флуоресцентных меток было показано, что синглетный кислород не только выделяется в клетках несерных бактерий на сильном свете в аэробных условиях, но и диффундирует за пределы клетки (Kochevar, 2004; Berghoff et al., 2011; Kim et al., 2013). В цитируемых работах он рассматривается не как окисляющий агент, а как сигнальная молекула, которая способна запустить синтез новых белков в клетке. В принципе прямое определение выделения синглетного кислорода пигмент-белковыми комплексами достаточно сложная задача и, например, для светособирающих бактериальных комплексов она до сих пор не решена. Установлено, что изолированные РЦ могут выделять синглетный кислород с небольшим квантовым выходом (Arellano et al., 2007; Uchida et al., 2008). Во всех цитируемых работах объектами исследования были несерные бактерии. Работая с серными бактериями, мы пришли к выводу, что светособирающие комплексы могут быть удобным объектом для исследования разных аспектов их взаимодействия с синглетным кислородом.

Цель настоящей работы – оценить, какие тушители способны предотвращать взаимодействие синглетного кислорода с БХл850 светособирающего комплекса LH2 из клеток серной бактерии *Alc. vinosum* МГУ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования и условия культивирования. Клетки *Alc. vinosum* МГУ (старое название

Alc. minutissimum) выращивали на среде Ларсена (Кондратьева, 1972).

Для выделения пигмент-содержащих мембран клетки ресуспендировали в 0.05 М Трис-НСl-буфере (рН 8.0) и разрушали на ультразвуковом дезинтеграторе УЗД2-0.1-22 (22 кГц, дважды по 60 с). Неразрушенные клетки и остатки клеточной стенки удаляли методом дифференциального центрифугирования, как описано в работе Moskalenko et al. (2005). Выделенные мембраны хранили при температуре –18°С.

Воздействие синглетным кислородом. Обычно для получения синглетного кислорода используются несколько типов фотосенсибилизаторов, которые различаются по спектрам поглощения в области 400–800 нм и квантовому выходу (~20–75%) (Redmond, Gamlin, 1999; Scholz et al., 2013). Мы использовали бенгальский розовый, так как он имеет некоторые преимущества по сравнению с другими красителями. Во-первых, он поглощает в области 440–580 нм, маскируя каротиноиды, но у него отсутствует поглощение в области продукта окисления БХл (около 700 нм), поэтому этот продукт можно легко зарегистрировать с помощью спектроскопии. Во-вторых, он имеет самый высокий (75%) квантовый выход синглетного кислорода среди других фотосенсибилизаторов (Redmond, Gamlin, 1999; Scholz et al., 2013). В-третьих, он хорошо растворяется в воде. Для облучения образцов с бенгальским розовым использовали комбинацию двух фильтров (С3С22 + ОС13), которая позволяла выделить узкую область около 550–580 нм, где присутствует небольшое поглощение БХл и каротиноидов. Бенгальский розовый (конечная концентрация 20 мкМ) добавляли к образцу перед облучением, который затем помещали в 1 см спектрофотометрическую кювету. Все эксперименты с облучением проводились при температуре 24°С в термостатируемой ячейке осветителя ЛЭТИ с лампой КГМ 500 (500 Вт), при этом интенсивность используемого желто-зеленого света составляла (2 мВт/см²).

Анализ пигментов проводили методом ВЭЖХ (Ashikhmin et al., 2014) на колонке Agilent Zorbax SB-C18 (“Agilent”, США). Установка для ВЭЖХ состояла из насоса LC 10ADvp с модулем FCV10 A1vp, который позволял создавать градиент растворителей со стороны низкого давления, детектора с диодной матрицей SPD-M20A и термостата СТО-20АС (“Shimadzu”, Япония). Хроматограммы, а также спектры поглощения отдельных пигментов получали с помощью программы LC-solution (“Shimadzu”, Япония).

Методы спектроскопии. Спектры оптического поглощения мембран регистрировали при комнатной температуре на спектрофотометре Cary 90 (“Varian”, Австралия).

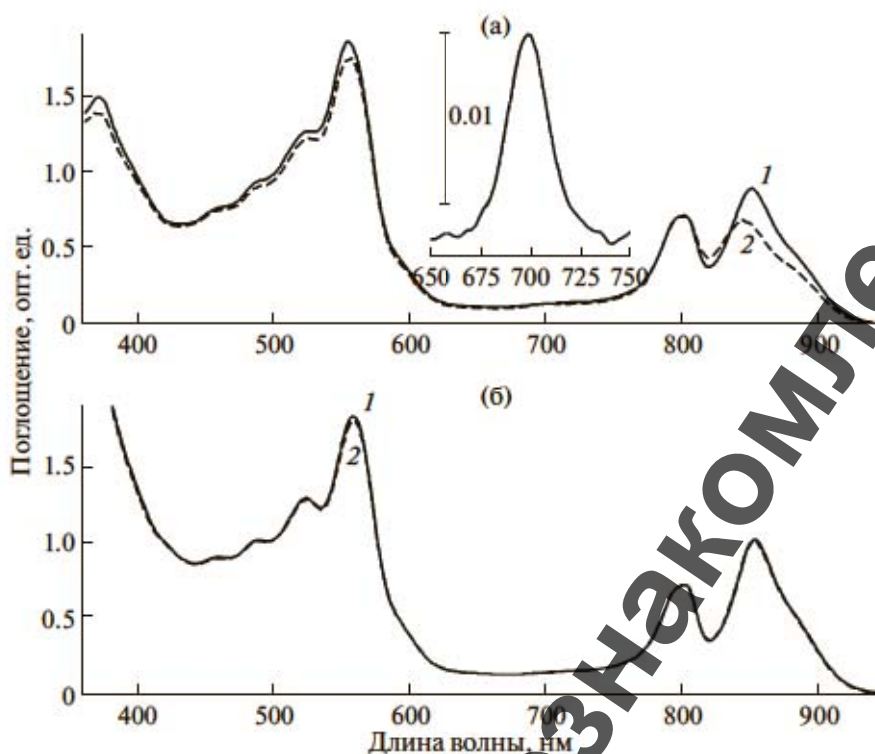


Рис. 1. Спектры поглощения мембран до освещения (1) и после 30 мин освещения (2) в присутствии 20 мкМ бенгальского розового: без других добавок (а); +100мМ аскорбата натрия (б). Вставка: часть разностного спектра поглощения "спектр (2) минус спектр (1)".

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В спектре оптического поглощения мембран из клеток *Alc. vinosum* МГУ присутствуют пики при 372, 487 (плечи при 460 и 522), 590, 801 и 852 нм, которые принадлежат полосе Соре БХл, каротиноидам, Q_x и двум Q_y переходам БХл соответственно. Добавление бенгальского розового маскирует максимумы поглощения каротиноидов и Q_x переход БХл (рис. 1). При освещении мембран в присутствии бенгальского розового происходит уменьшение полосы Q_y БХл850 на 25% и ее одновременное смещение с 852 до 846 нм. Менее чем на 2% выцветает и бенгальский розовый. Максимум 3-ацетил-хлорофилла при 700 нм в спектре поглощения мембран практически не виден и проявляется только на разностных спектрах (рис. 1; спектр 2 и вставка соответственно). Следует отметить, что некоторый эффект (>1/3 от общего выцветания полосы БХл850) вносит непосредственно свет, используемый для облучения. Дело в том, что область, которую вырезают применяемые нами светофильтры, перекрывается с длинноволновыми склонами поглощения каротиноидов. Ранее мы показали, что эти пигменты способны под действием света инициировать фотоокисление БХл (Махнева и соавт., 2016), т.е. фактически они являются фотосенсибилизатором и дополняют работу бенгальского розового.

На рис. 2а представлены результаты разделения пигментов из контрольных мембран *Alc. vinosum* МГУ. Основными пигментами в контрольном образце являются БХл и родопин. В нем также присутствуют следы 3-ацетил-хлорофилла, что связано с отсутствием каких-либо дополнительных мер (анаэробные условия, добавление антиоксидантов) при разрушении клеток и выделении мембран. После облучения образца в присутствии бенгальского розового на хроматограмме появляется заметный пик 3-ацетил-хлорофилла (рис. 2б), что полностью совпадает со спектральными данными. В растворителях максимум поглощения и БХл и 3-ацетил-хлорофилла смещается в синюю область до 770 и 678 нм соответственно (рис. 2, вставка).

Понятно, что если заблокировать синглетный кислород, то процесс окисления БХл должен прекратиться. На рис. 1б представлены результаты подобного эксперимента в присутствии аскорбата натрия. Хорошо видно, что уменьшение (окисление) полос поглощения БХл в ближней ИК области фактически отсутствует. В разностном спектре поглощения изменения не превышают 0.02 опт. ед. (рис. 3, спектр 1), что составляет около 2%. Однако аскорбат натрия является редокс-агентом, который может восстанавливать, например, цитохром, и поэтому его действие не со-

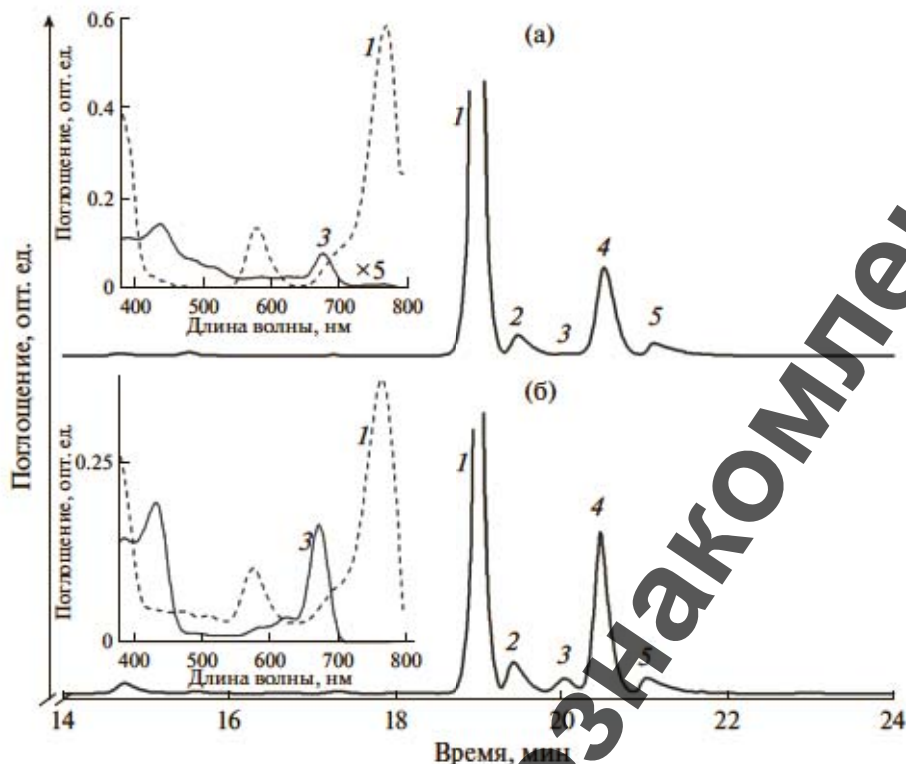


Рис. 2. Частичные хроматограммы ВЭЖХ пигментов из контрольных мембран (а) и мембран после 30 мин освещения в присутствии 20 мкМ бенгальского розового (б). Идентификация пиков: 1 – БХл, 2 – дидегидрородопин, 3 – 3-ацетил-хлорофилл, 4 – родопин, 5 – спириллоксантин. Вставка на (а) – спектры поглощения БХл (1) и 3-ацетил-хлорофилла (3, увеличен в 5 раз). Вставка на (б) – спектры поглощения БХл (1) и 3-ацетил-хлорофилла (3).

всем специфично. Другие тушители синглетного кислорода (гистидин, имидазол и тролокс) действуют также, как аскорбат натрия (рис. 3, спектры 2–4). Изменения в ИК области полосы поглощения БХл в их присутствии колеблются в пределах 0.005–0.045 опт. ед. Для сравнения там же приведен разностный спектр окисления БХл в мембранах после освещения в присутствии бенгальского розового без каких-либо добавок (рис. 3, спектр б). В этом спектре наблюдаются минимум при 858 нм и максимум при 824 нм, первый из них соответствует уменьшению полосы БХл850 при окислении, а второй – смещению этой полосы в коротковолновую область. Отметим, что в присутствии тушителей выступают более длинноволновые формы БХл (минимум при 865 нм; рис. 3, спектры 3 и 4). Одновременно в процессе освещения наблюдается небольшое выцветание полосы поглощения бенгальского розового в области 550–570 нм (рис. 3).

Все указанные тушители демонстрируют четкую зависимость уменьшения окисления БХл850 от увеличения концентрации агента (рис. 4). Максимальный эффект был достигнут при концентрации тролокса – 0.2 мМ, аскорбата 100 мМ, гистидина 100–200 мМ и имидазола – 200 мМ.

Данные, полученные с NaN_3 (рис. 3, спектр 5 и рис. 5), полностью контрастируют с описанными выше результатами для других тушителей: при концентрации 50 мМ NaN_3 практически никак не замедляет фотоокисление БХл850 (рис. 5, кривая 2), а при увеличении концентрации NaN_3 до 200 мМ отмечено только небольшое уменьшение (~3–5%) этого эффекта после 30 мин освещения. Этот факт не вписывается в общую концепцию и остается непонятным. Ранее было неоднократно показано, что NaN_3 способен тушить синглетный кислород в системе H_2O_2 – NaOCl (Bancirova, 2011) или в мицеллах и липосомах (Miyoshi, Tomita, 1979, Musbat et al., 2013). Причем эффективность тушения напрямую зависит от типа структур, в которые встраиваются мишени синглетного кислорода: в липосомах NaN_3 не взаимодействует с гидрофобными мишенями, а в мицеллах он эффективен с обоими типами мишеней (гидрофобными и гидрофильными) (Musbat et al., 2013). Исследуемые нами мембраны похожи на липосомы, они состоят из двойного слоя липидов, который пронизывают пигмент-белковые комплексы, содержащие БХл (гидрофобная мишень синглетного кислорода). В нашей работе NaN_3 не препятствовал окислению БХл850 и, соответственно, наши данные

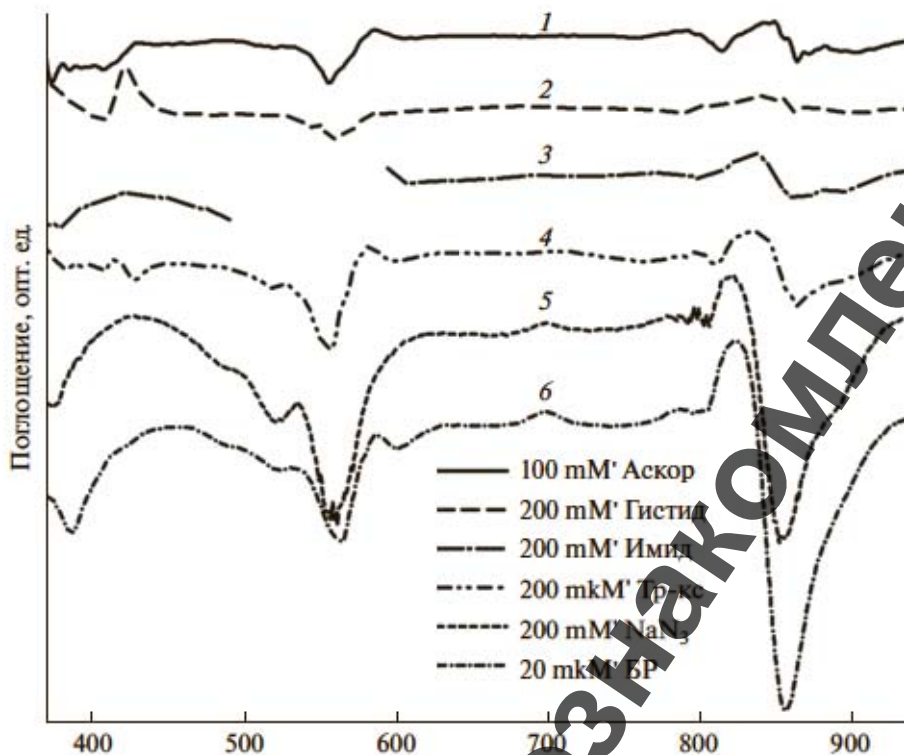


Рис. 3. Разностные спектры поглощения «спектр (2) минус спектр (1)» (см. рис. 1) в присутствии: 1 – 100 мМ аскорбата натрия, 2 – 200 мМ гистидина, 3 – 200 мМ имидазола, 4 – 200 мкМ тролокса, 5 – 200 мМ NaN_3 , 6 – без добавок. Спектры сдвинуты по оси ординат, разрыв в спектре 3 (491–524 нм) связан с удаленными большими шумами.

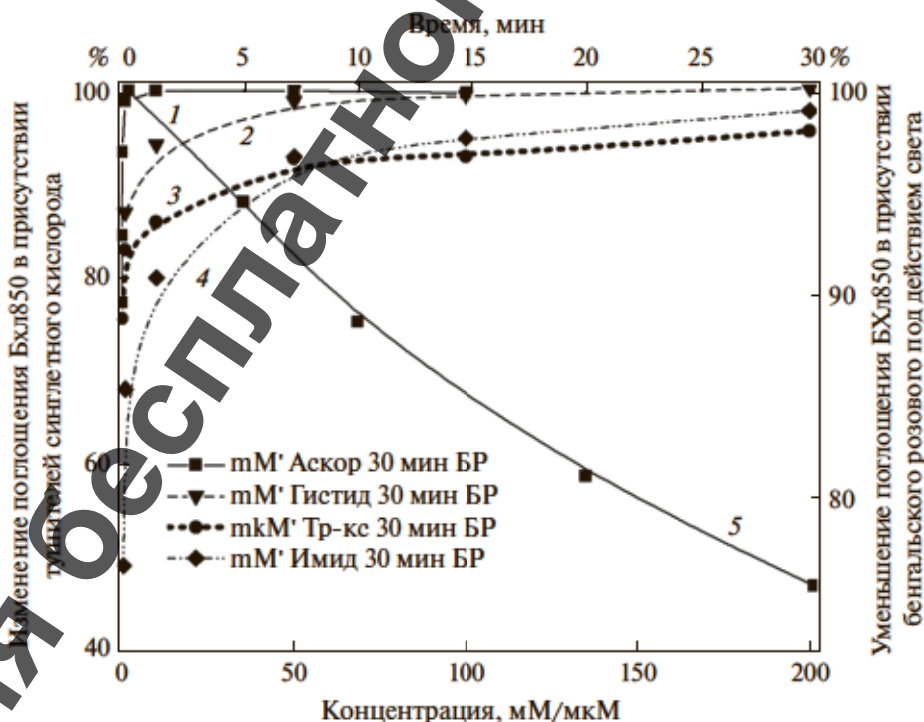


Рис. 4. Выцветание полосы БХЛ850 в присутствии 20 мкМ бенгальского розового в зависимости от количества добавленного тушителя: 1 – аскорбат натрия (мМ), 2 – гистидин (мМ), 3 – тролокс (мкМ), 4 – имидазол (мМ). Выцветание полосы БХЛ850 в присутствии 20 мкМ бенгальского розового без добавок (5).

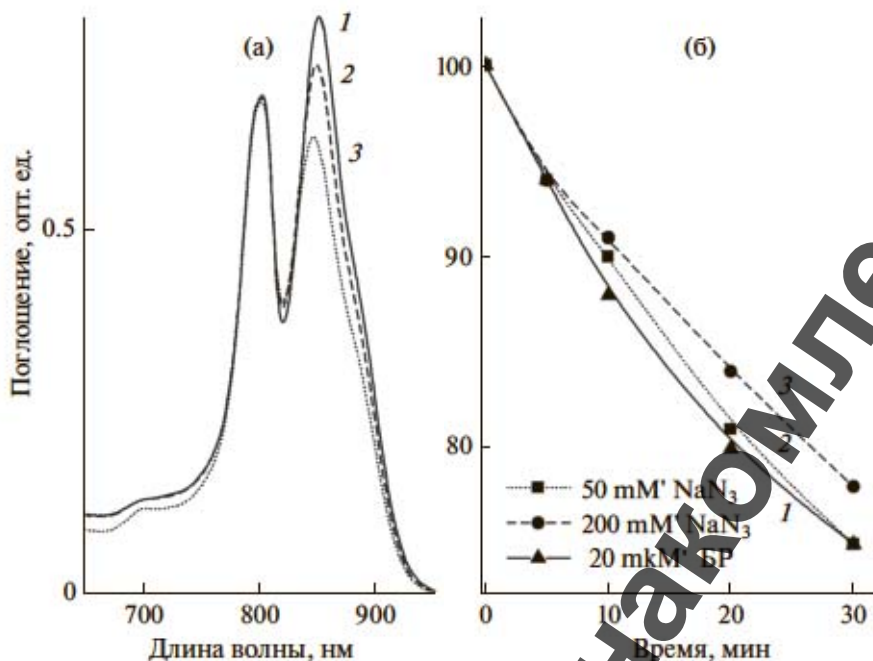


Рис. 5. (а) — Спектры поглощения мембран до освещения (1) и после 30 мин освещения в присутствии 20 мкМ бензильского розового и 50 мМ NaN_3 (2) и 200 мМ NaN_3 (3); (б) — выцветание полосы БХл850 в присутствии 20 мкМ бензильского розового (1), +50 мМ NaN_3 (2) и +200 мМ NaN_3 (3) в зависимости от времени освещения (0–30 мин).

совпадают с результатами работы Musbat et al. (2013). Однако остается не ясным, почему NaN_3 не может взаимодействовать с синглетным кислородом сразу после образования последнего в гидрофильной фазе.

Синглетный кислород является сильным деструктурирующим фактором, который способен окислять разные компоненты клетки, такие как липиды, белки и пигменты. Его действие обычно проверялось на модельных системах, на которых проще оценить образование новых продуктов. Например, при взаимодействии синглетного кислорода с диазокрасителями в зависимости от типа растворителя в молекулах красителей происходило образование гидроксид- или кетогрупп с возможной их последующей модификацией (Bortolus, Monti, 1989). У растительных каротиноидов типа β -каротина (а также лютеина и зеаксантина) под действием синглетного кислорода в растворителях происходило расщепление молекулы пигмента на фрагменты разной длины и образование соответствующего эндопероксида с молекулярной массой в пределах 192–416 (Rame et al., 2012). Понятно, что если бы подобный процесс происходил в наших образцах, то это привело бы к уменьшению поглощения в основной полосе каротиноидов (рис. 3) и появлению новых продуктов на хроматограммах ВЭЖХ, чего ранее мы не фиксировали (Махнева и соавт., 2009). БХл в модельных системах легко окисляется с образованием нескольких типов окисленных продуктов, включая бесцвет-

ные соединения, соединения с открытым кольцом типа билинов, хлорины и бактериохлорины (Smith, Calvin, 1966; Limantara et al., 2006). Основными продуктами окисления являются хлорины с преобладанием 3-ацетил-хлорофилла. Последний также преобладает в наших образцах, и его легко обнаружить спектрофотометрически (рис. 1 и 3) или ВЭЖХ (рис. 2). Образование указанного продукта связано с особенностью структуры молекулы БХл, у которой во втором имидазольном кольце в положении 7–8 присутствуют два свободных протона. Если они не участвуют в образовании водородной связи с аминокислотными остатками полипептидов, то при окислении происходит их отрыв от молекулы БХл с образованием двойной связи, которая изменяет систему сопряженных двойных связей. При этом длинноволновая полоса поглощения пигмента смещается на ~155 или ~90 нм в синюю область в комплексах или растворителе соответственно (рис. 1 и 2). Очевидно, что БХл в наших образцах является основной мишенью для синглетного кислорода.

В настоящей работе исследована эффективность пяти тушителей синглетного кислорода — аскорбата натрия, гистидина, имидазола, тролокса и азиды натрия — на нейтрализацию действия синглетного кислорода на БХл в светособирающих комплексах мембран *Alc. vinosum* МГУ, и все они, за исключением азиды натрия, показали свою эффективность. Указанные тушители, наряду с другими: β -каротин, α -токоферол, аскорбиновая

кислота, кверцетин, бутилгидроксианизол, бутилгидрокситолуен, тетрабутилгидрохинон, бетаин, 1,4-дизабицикло[2.2.2]октан и т.д. – широко используются в опытах с синглетным кислородом (Gutiérrez et al., 2001; Dad et al., 2006; Yettella, Min, 2008; Fatima et al., 2016; Wendel et al., 2016). Например, в работе Fatima et al. (2016) наиболее эффективными были β -каротин, α -токоферол, аскорбиновая кислота и кверцетин. Авторы регистрировали выцветание нитрозодиметиланилина в присутствии синглетного кислорода, который генерировался в системе ($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{HOCl} \rightarrow \text{HCl} + \text{H}_2\text{O} + {}^1\text{O}_2$). Результаты цитируемой работы (в части совпадающих тушителей) отличаются от полученных нами данных. При одинаковых концентрациях тушителей в нашей работе тролокс (0.1 мМ) был эффективнее в ~2.8 раза, аскорбат (0.1 мМ) – в ~1.6 раза, имидазол (50 мМ) – в ~2 раза и гистидин (50 мМ) – в ~1.9 раза по сравнению с данными Fatima et al. (2016). Такие различия достаточно сложно объяснить, возможно, они связаны с тем, что в этой работе (Fatima et al., 2016) в состав реакционной смеси входила перекись водорода (200 мМ), которая могла дополнительно окислять нитрозодиметиланилин. Ранее мы показали, что перекись действует на БХЛ *Alc. vinosum* МГУ также, как химический окислитель или синглетный кислород (Москаленко, 1974).

Долгое время синглетный кислород считался сильным повреждающим фактором, способным нарушать работу отдельных компартментов клетки (Gorman, Rodgers, 1992). Однако в последние годы его также рассматривают как сигнальную молекулу (Kochevar, 2004; Glaeser, Klug, 2004; Berghoff et al., 2011). Понятно, что в первом случае на клетку воздействуют “кислородный стресс”, т.е. высокие концентрации синглетного кислорода. Они генерируются за счет внешнего фактора или после разрушения отдельных пигмент-белковых комплексов и появления мономерного БХЛ, который является сильным сенсibilizатором синглетного кислорода. Впервые этот эффект наблюдался в работе (Griffith et al., 1955) и был ошибочно приписан защитной функции каротиноидов. Низкие концентрации синглетного кислорода могут образовываться непосредственно в клетке (Berghoff et al., 2011). Время жизни синглетного кислорода резко возрастает при переходе от воды к фосфолипидам (мембранам) и предполагается, что при тесном контакте клеток друг с другом он может переходить (диффундировать) от клетки к клетке (Maisch et al., 2007).

В настоящее время существует несколько методов определения генерации или присутствия синглетного кислорода в образце: 1). Прямое определение синглетного кислорода по его фосфоресценции при 1260 нм. Этим методом показано выделение синглетного кислорода реакцион-

ными центрами бактерий (Arellano et al., 2007; Uchoa et al., 2008). 2). Косвенное определение синглетного кислорода с помощью ловушек типа гистидина или имидазола. Основано на эффекте связывания образовавшегося синглетного кислорода ловушкой и уменьшения общей концентрации кислорода в ячейке, которая измеряется с помощью электрода Кларка (Kraljic, Mohsin, 1978). 3). Использование флуоресцентных ловушек типа Singlet Oxygen Sensor Green (SOSG), которые, связывая синглетный кислород, переходят во флуоресцирующую форму с испусканием в области 510–550 нм (Berghoff et al., 2011), т.е. для их детектирования можно использовать стандартный спектрофлуориметр. Однако для SOSG, как и для других датчиков на основе флуоресцеина, существует как возможность фоторазложения, так и прямой генерации синглетного кислорода (Kim et al., 2013).

Таким образом, в работе изучено действие синглетного кислорода на мембраны *Alc. vinosum* МГУ, который генерировался бенгальским розовым под действием света (547–600 нм), без тушителя и в присутствии тушителей синглетного кислорода. В системе без тушителя происходило выцветание полосы БХЛ850 светособирающего комплекса LH2 и появлялся пик поглощения в области 698 нм, принадлежащий окисленному продукту 3-ацетил-хлорофиллу. Изучена эффективность пяти тушителей синглетного кислорода – аскорбата Na, гистидина, имидазола, тролокса и NaN_3 – на нейтрализацию действия синглетного кислорода на бактериохлорофил (БХЛ) светособирающих комплексов в мембранах *Alc. vinosum* МГУ, и все они, за исключением азида натрия, успешно нейтрализовали это действие.

Примененный в данной работе подход является простым методом детектирования синглетного кислорода по изменениям в спектре поглощения мембран *Alc. vinosum* МГУ. Они будут использованы при исследовании разных аспектов взаимодействия синглетного кислорода с пигментами фотосинтезирующих бактерий.

Работа выполнена при частичной поддержке РФФИ (проекты № 18-04-00684_a; 18-34-00416_мол_a; 17-04-00929_a). Представленные на рис. 1–3 результаты получены в рамках государственного задания № АААА-А17-117030110140-5.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Кондратьева Е.Н. Фотосинтезирующие бактерии и бактериальный фотосинтез. М.: Изд-во МГУ, 1972. С. 75.
- Kondratyeva Ye.N. Photosynthesizing Bacteria. USSR Academy of Sciences Publishers, Moscow. 1972. P. 75. (in Russian).
- Махнева З.К., Ашихмин А.А., Большаков М.А., Москаленко А.А. Образование 3-ацетил-хлорофилла в свето-

- собирающих комплексах пурпурных бактерий при химическом окислении // Биохимия. 2016. Т. 81. № 2. С. 282–294.
- Makhneva Z.K., Ashikhmin A.A., Bolshakov M.A., Moskalenko A.A. 3-Acetyl-chlorophyll formation in light harvesting complexes of purple bacteria by chemical oxidation // Biochemistry (Moscow). 2016. V. 81. P. 176–186.
- Махнева З.К., Большаков М.А., Ашихмин А.А., Ерохин Ю.Е., Москаленко А.А. Влияние синего света на стабильность структуры антенных комплексов из *Allochrochromatium minutissimum* с разным содержанием каротиноидов // Биол. мембраны. 2009. Т. 26. № 3. С. 188–193.
- Makhneva Z.K., Bolshakov M.A., Ashikhmin A.A., Erokhin Y.E., Moskalenko A.A. Influence of blue light on the structure stability of antenna complexes from *Allochrochromatium minutissimum* with different content of carotenoids // Biochemistry-Moscow Supplement Series A: Membrane and Cell Biology. 2009. V. 3. № 2. P. 123–127.
- Москаленко А.А. Пигмент-белковые комплексы и их взаимодействие в структурах фотосинтетического аппарата бактерий и растений. Дисс. ... докт. биол. наук в форме научного доклада. ИПФС РАН. Пущино. 1993. 37 с.
- Arellano J.B., Yousef Y.A., Melø T.B., Mahamad S.B., Cogdell R.J., Naqvi K.R. Formation and geminate quenching of singlet oxygen in purple bacterial reaction center // J. Photochem. Photobiol. 2007. V. 87. P. 105–112.
- Ashikhmin A., Makhneva Z., Moskalenko A. The LH2 complexes are assembled in the cells of purple sulfur bacterium *Ectothiorhodospira haloalkaliphila* with inhibition of carotenoid biosynthesis // Photosynth. Res. 2014. V. 119. P. 291–303.
- Bancirova M. Sodium azide as a specific quencher of singlet oxygen during chemiluminescent detection by luminol and Cypridina luciferin analogues // Luminescence. 2011. V. 26. P. 685–688.
- Berghoff B.A., Glaeser J., Nuss A.M., Zobawa M., Lottspich F., Klug G. Anoxygenic photosynthesis and photooxidative stress: a particular challenge for *Roseobacter* // Environ. Microbiol. 2011. V. 13. P. 775–791.
- Bortolus P., Monti S. Physical quenching and chemical reaction of singlet molecular oxygen with azo dyes // J. Organic. Chem. 1989. V. 54. P. 534–540.
- Dad S., Bisby R.H., Clark I.P., Parker A.W. Formation of singlet oxygen from solutions of vitamin E // Free Radic. Res. 2006. V. 40. P. 333–338.
- Fatima K., Masood N., Luqman S. Quenching of singlet oxygen by natural and synthetic antioxidants and assessment of electronic UV/Visible absorption spectra for alleviating or enhancing the efficacy of photodynamic therapy // Biomed. Res. Therapy. 2016. V. 3. P. 514–527.
- Gabrielsen M., Gardiner A.T., Cogdell R.J. Peripheral complexes of purple bacteria // Advances in Photosynthesis and Respiration. Eds. Hunter C.N., Daldal F., Thurnauer M.C., Beatty J.T. The Purple Phototrophic Bacteria. Dordrecht: Springer, 2009. V. 28. P. 135–153.
- Glaeser J., Klug G. Photo-oxidative stress in *Rhodobacter sphaeroides*: protective role of carotenoids and expression of selected genes // Microbiology (SGM). 2005. V. 151. P. 1927–1938.
- Gorman A.A., Rodgers M.A.J. Current perspectives of singlet oxygen detection in biological environments // J. Photochem. Photobiol. 1992 B: Biol. V. 14. P. 159–176.
- Griffith M., Sistrom W.R., Cohen-Bazire G., Stanier R.Y. Functions of carotenoids in photosynthesis // Nature. 1955. V. 176. P. 1211–1214.
- Gutiérrez I., Criado S., Bertolotti S., Norman A., Garcia N. Dark and photoinduced interactions between trolox, a polar-solvent-soluble model for vitamin E, and riboflavin // J. Photochem. Photobiol. 2001. V. 62. P. 133–139.
- Hoff A.J., Deisenhofer J. Photophysics of photosynthesis. Structure and spectroscopy of reaction centers of purple bacteria // Physics Rep. 1997. V. 287. P. 1–247.
- Imlay J.A. Pathways of oxidative damage // Annu. Rev. Microbiol. 2003. V. 57. P. 395–418.
- Kim S., Fujitsuka M., Majima T. Photochemistry of singlet oxygen sensor green // J. Phys. Chem. B. 2013. V. 117. P. 13985–13992.
- Kochevar I.E. Singlet oxygen signaling: from intimate to global // Sci. Signaling. 2004. V. 2004. P. 1–3.
- Kraljic I., Moksness E.L. A new method for the detection of singlet oxygen in aqueous solutions // Photochem. Photobiol. 1978. V. 28. P. 577–581.
- Krieger-Leschay A., Trebst A. Tocopherol is the scavenger of singlet oxygen produced by the triplet states of chlorophyll in the PSII reaction centre // J. Exp. Botany. 2006. V. 57. P. 1677–1684.
- Limantara L., Koehler P., Wilhelm B., Robert J., Porra R.J., Scheer H. Photostability of bacteriochlorophyll a and derivatives: potential sensitizers for photodynamic tumor therapy // Photochem. Photobiol. 2006. V. 82. P. 770–780.
- Löhner A., Carey A.M., Hacking K., Picken N., Kelly S., Cogdell R., Köhler J. The origin of the split B800 absorption peak in the LH2 complexes from *Allochrochromatium vinosum* // Photosynth. Res. 2015. V. 123. P. 23–31.
- Maisch T., Baier J., Franz B., Maier M., Landthaler M., Szeimies R.M., Bäuml W. The role of singlet oxygen and oxygen concentration in photodynamic inactivation of bacteria // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2007. V. 104. P. 7223–7228.
- Miyoshi N., Tomita G. Quenching of singlet oxygen by sodium azide in reversed micellar systems // Z. Naturforsch. 1979. V. 34b. P. 339–343.
- Moskalenko A.A., Makhneva Z.K., Fiedor L., Scheer H. Effects of carotenoid inhibition on the photosynthetic RC–LH1 complex in purple sulphur bacterium *Thiorhodospira sibirica* // Photosynth. Res. 2005. V. 86. P. 71–80.
- Musbat L., Weitman H., Ehrenberg B. Azide quenching of singlet oxygen in suspensions of microenvironments of neutral and surface charged liposomes and micelles // Photochem. Photobiol. 2013. V. 89. P. 253–258.
- Niedzwiedzki D.M., Bina D., Picken N., Honkanen S., Blankenship R.E., Holten D., Cogdell R.J. Spectroscopic studies of two spectral variants of light-harvesting complex 2 (LH2) from the photosynthetic purple sulfur bacterium *Allochrochromatium vinosum* // Biochim. Biophys. Acta. 2012. V. 1817. P. 1576–1587.
- Ohara K., Kikuchi K., Origuchi T., Nagaoka S. Singlet oxygen quenching by trolox C in aqueous micelle solutions // J. Photochem. Photobiol. 2009. B. V. 97. P. 132–137.

- Rame F., Birtic S., Cuiné S., Christian Triantaphylidés C., Ravanat J.L., Havaux M. Chemical quenching of singlet oxygen by carotenoids in plants // *Plant Physiol.* 2012. V. 158. P. 1267–1278.
- Redmond R.W., Gamlin J.N. A compilation of singlet oxygen yields from biologically relevant molecules // *Photochem. Photobiol.* 1999. V. 70. P. 391–475.
- Scholz M., Roman Dedic R., Breitenbach T., Hala J. Singlet oxygen-sensitized delayed fluorescence of common water-soluble photosensitizers // *Photochem. Photobiol. Sci.* 2014. V. 13. P. 1203–1212.
- Smith J.R., Calvin M. Studies on the chemical and photochemical oxidation of bacteriochlorophyll // *J. Am. Chem. Soc.* 1966. V. 88. P. 4500–4506.
- Takaichi S. Distribution and biosynthesis of carotenoids // *The Purple Phototrophic Bacteria* / Eds. Daldal F., Thurnauer M.C., Beatty J.T., Hunter C.N. New York: Springer, 2009. P. 97–117.
- Uchoa A.F., Knox P.P., Turchielle R., Seifullina N.Kh., Baptista S.M. Singlet oxygen generation in the reaction centers of *Rhodobacter sphaeroides* // *Eur. Biophys.* 2008. V. 37. P. 843–850.
- Wendel M., Nizinski S., Gierszewski M., Prukala D., Sikorski M., Starzak K., Wybraniec S., Burdzinski G. Chemical quenching of singlet oxygen by betanin // *Photochem. Photobiol. Sci.* 2016. V. 15. P. 872–878.
- Yettella R.R., Min D.B. Quenching mechanisms and kinetics of trolox and ascorbic acid on the riboflavin-photosensitized oxidation of tryptophan and tyrosine // *J. Agric. Food Chem.* 2008. V. 56. P. 10887–10892.

Quenchers Protect BChl850 from Action of Singlet Oxygen in the Membranes of a Sulfur Photosynthetic Bacterium *Allochromatium vinosum* Strain MSU

Z. K. Makhneva¹, A. A. Ashikhmin¹, M. A. Bolshakov¹, and A. A. Moskalenko¹, *

¹Institute of Basic Biological Problems, Russian Academy of Sciences, Pushchino, 142290 Russia

*e-mail: lfbv22@gmail.com

Received July 3, 2018

Revised September 20, 2018

Accepted October 2, 2018

Abstract—The effect of singlet oxygen was studied in the system of *Allochromatium (Alc.) vinosum* MSU membranes, rose bengal, and light (547–600 nm) with and without a quencher. In the system without a quencher, bleaching of the BChl850 band of the LH2 light-harvesting complex was observed and an absorption peak emerged at 698 nm, which belonged to the oxidized product, 3-acetyl-chlorophyll. The efficiency of five quenchers of singlet oxygen for neutralization of the effect of singlet oxygen on bacteriochlorophyll in the light-harvesting complexes of the membranes *Alc. vinosum* MSU was studied: sodium ascorbate, histidine, imidazole, trolox, and sodium azide. All of them, with the exception of sodium azide, neutralized successively the effect of singlet oxygen.

Keywords: photosynthetic bacteria, photosynthesis, LH2 and LH1 complexes, singlet oxygen, 3-acetyl-chlorophyll, singlet oxygen quenchers

СЕЗОННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ СТРУКТУРЫ СООБЩЕСТВА
АНОКСИГЕННЫХ ФОТОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ МЕРОМИКТИЧЕСКОГО
ОЗЕРА ТРЕХЦВЕТНОЕ (КАНДАЛАКШСКИЙ ЗАЛИВ БЕЛОГО МОРЯ)

© 2019 г. О. Н. Лунина^{a, *}, А. С. Саввичев^a, В. В. Бабенко^b, Д. И. Болдырева^b, Б. Б. Кузнецов^c,
Т. В. Колганова^c, Е. Д. Краснова^d, Н. М. Кокрятская^e, Е. Ф. Веслополова^e, Д. А. Воронов^{f, g},
Н. А. Демиденко^b, М. А. Летарова^a, А. В. Летаров^a, В. М. Горленко^a

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

^bФедеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА России, Москва, 119435, Россия

^cИнститут биоинженерии, Федеральный исследовательский центр
“Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва 119071, Россия

^dБеломорская биологическая станция им. Н.А. Перцова
Биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

^eФедеральный исследовательский центр комплексного изучения
Арктики имени академика Н.П. Лаверова РАН, Архангельск, 163000, Россия

^fИнститут проблем передачи информации им. А.А. Харкевича РАН, Москва, 127994, Россия

^gИнститут физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, 119992, Россия

^hГосударственный океанографический институт им. Н.И. Зубова, Москва 119034, Россия

*e-mail: onlun@yandex.ru

Поступила в редакцию 27.06.2018 г.

После доработки 27.08.2018 г.

Принята к публикации 02.10.2018 г.

В марте 2012 и 2013 гг. и в сентябре 2013 и 2014 гг. были проведены исследования сообщества аноксигенных фототрофных бактерий (АФБ) водной толщи меромиктического оз. Трехцветное (Кандалакшский залив Белого моря). Показано восстановление структуры сообщества АФБ под хемоклином, происходившее в течение трех лет после частичного перемешивания, связанного с заплеском морской воды в озеро осенью 2011 г., и формирование высокоплотного слоя зеленоокрашенных (з/о) зеленых серобактерий (ЗСБ), с общей численностью не менее 10^8 кл. мл⁻¹. В зимние сезоны в верхнем слое зеленой воды отмечено незначительное развитие коричневоокрашенных (к/о) ЗСБ. Показано, что в летние сезоны к/о ЗСБ занимают необычное для них положение над слоем зеленой воды в кислородной зоне. В сообществе АФБ отмечено присутствие пурпурных бактерий. Из проб воды верхней части сероводородной зоны озера были выделены 4 штамма АФБ. К/о и з/о штаммы ЗСБ оказались филогенетически близкими между собой и с типовым видом *Chlorobium phaeovibrioides* DSM 265, имея 99% сходства по данным сиквенса гена 16S рРНК. Один штамм пурпурных бактерий оказался филогенетически близким к сероводородным серным бактериям *Thiocapsa marina*, другой — к пресноводным несерным бактериям *Rhodopseudomonas palustris*. Выделенные штаммы серобактерий оказались филогенетически близки к бактериям зоны хемоклина стратифицированного оз. Кисло-Сладкое, также находящегося в прибрежной зоне Кандалакшского залива Белого моря.

Ключевые слова: полярные экосистемы, Белое море, стратифицированные и меромиктические озера, сообщества аноксигенных фототрофных бактерий, филогения зеленых и коричневых форм серобактерий *Chlorobium phaeovibrioides*

DOI: 10.1134/S0026365619010051

Меромиктические водоемы являются классическими объектами исследований лимнологов, микробиологов и биогеохимиков (Горленко и соавт., 1977; Van Gemerden, Mas, 1995; Overmann et al., 1996; Thiel et al., 2010; Ecology of Meromictic Lakes, 2017).

В водной толще меромиктических озер формируется многослойное микробное сообщество,

состоящее из фототрофных, хемотрофных и гетеротрофных микроорганизмов, достигающее высокой плотности в зоне хемоклина. В составе микробного сообщества хемоклина особый интерес представляют аноксигенные фототрофные бактерии (АФБ), являющиеся естественным фильтром, сдерживающим распространение сероводорода из нижних слоев озера.

Видовой состав и структура сообществ АФБ разных озер сильно различаются и зависят от гидрхимических условий, резкости градиентов в хемоклине и условий освещения верхней части сероводородной зоны озер. Известно, что пурпурные серобактерии (ПСБ) не выдерживают большой концентрации сероводорода, они менее чувствительны к кислороду, чем ЗСБ, и поэтому часто встречаются в верхней части хемоклина. ЗСБ, наоборот, являются строгими анаэробами, выдерживают большие концентрации сероводорода, чем ПСБ, и поэтому образуют слой под хемоклином, часто под слоем ПСБ. К/о ЗСБ, приспособленные к жизни в условиях низкого освещения, обычно развиваются на нижней границе фотического слоя: на большой глубине (Черное море, оз. Гек-Гель) (Manske et al., 2005; Лунина и соавт., 2008) или в условиях сильного затенения (оз. Вейсово, оз. Могильное) (Горленко и соавт., 1977; Лунина и соавт., 2005).

Классическим примером трехслойного пространственного расположения АФБ является карстовое оз. Конан-Ер (Горленко и соавт., 1977; Лунина и соавт., 2009). В соленоводных меромиктических озерах, как правило, присутствуют не все слои АФБ или некоторые из слоев могут объединяться. В оз. Репное (Донецкая обл., Украина) над слоем к/о ЗСБ (5.75 м) расположен слой преимущественно ПСБ (5.5 м) с небольшим количеством з/о ЗСБ (Горленко и соавт., 1977). В оз. Шунет описано двуслойное сообщество АФБ, где над слоем зеленой воды присутствует тонкий слой розовой воды, содержащей ПСБ (Лунина и соавт., 2007).

В большинстве озер формируется один слой, в котором доминирует лишь один вид АФБ, остальные же могут присутствовать в виде минорных компонентов. Примерами могут служить озера Могильное (Gorlenko et al., 1978), Махони (Overmann et al., 1991), Чипрана (Vila et al., 2002), Цизо (Casamayor et al., 2000).

Начиная с 2012 г. нами были проведены исследования микробного сообщества хемоклина водной толщи меромиктического высокосульфидного оз. Трехцветное, которое относится к группе озер, сохранивших связь с Кандалакшским заливом Белого моря. Ранее нами было показано, что в зоне хемоклина озера в составе сообщества АФБ доминировали з/о ЗСБ *Chlorobium phaeovibrioides* (Savvichev et al., 2018), также были получены данные о скоростях ключевых микробных процессов (в зимний и летний периоды). Однако структура фототрофного сообщества в этом уникальном водоеме и его видовой состав исследованы не были.

Целью настоящей работы было выяснить состав и структуру сообщества АФБ в оз. Трехцветное и проследить их изменения в связи с резкими сезонными изменениями освещенности и некоторых других физико-химических условий в водной толще водоема.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования на озере Трехцветное проводили в марте 2012 и 2013 гг. и в сентябре 2013 и 2014 гг.

Отбор проб воды осуществляли в точке с наибольшей глубиной 5–7.5 м. Пробы воды отбирали через 1 м, а в зоне хемоклина через 10 см, с помощью силиконовой трубки, закрепленной на калиброванном тросе, и портативного насоса Whale Premium Submersible Pump CP152 (США). Отбранную воду разливали в 30-мл стеклянные флаконы, закрывали без пузырька воздуха резиновой пробкой и обжимали алюминиевой крышкой.

Общую соленость воды определяли в свежих образцах, используя кондуктометр WTW Condi 3110 (Германия).

Концентрацию кислорода и сероводорода измеряли непосредственно после отбора проб с использованием тест-наборов Aquamerck ("Merck", Германия), а в сентябре 2013 г. – *in situ* кислородомером "Марк 302 Е" (Россия) с погружным зондом, с поправкой на температуру и соленость. Сероводород определяли с использованием N,N-диметил-п-фенилендиамина (РД 52.24.450-2010) фотометром Эксперт-003 (Россия). Пробы воды с высоким содержанием сероводорода до окрашивания растворов предварительно разбавляли деионизированной водой (Дубинин и соавт., 2012).

Освещенность измеряли люксметром AR813A (Китай), модифицированным для погружения регистрирующего элемента под воду, с калиброванным тросом.

Для учета общей численности микроорганизмов (ОЧМ) пробы воды фиксировали раствором глутаральдегида, конечная концентрация – 2%. Затем 0.05–1 мл фиксированной пробы фильтровали через черные поликарбонатные фильтры (Миллипор) с диаметром пор 0.2 мкм. Фильтры окрашивали раствором акридинового оранжевого (Hobbie et al., 1977). Препараты просматривали с помощью люминесцентного микроскопа Olympus BX-41 с системой визуализации Image Scope Color (M) при увеличении $\times 1000$. Учет клеток проводили на электронных изображениях 20 полей зрения.

Для получения накопительных культур АФБ в полевых условиях свежееотбранную озерную воду с различных глубин наливали в стерильные 30-мл флаконы, добавляли 100 мкл 10% дрожжевого экстракта для инициации синтрофного развития ЗСБ (Горленко и соавт., 2005). Для подавления окислительного фотосинтеза добавляли диурон в концентрации 50 мг л⁻¹. Флаконы герметично закрывали резиновой пробкой, оставляя пузырек воздуха диаметром не более 0.5 см.

Также, для получения накопительных культур АФБ в герметично закрытые стеклянные флаконы с питательной средой объемом 30 мл стерильными шприцами вводили пробы озерной воды объемом 5 мл. Использовали среду следующего состава (г л⁻¹ дистиллированной воды): KH_2PO_4 – 0.7; NaCl – 15; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.5; NH_4Cl – 0.7;

KCl – 0.33; NaHCO₃ – 0.15; CaCl₂ – 0.1; Na₂S₂O₃ · 5H₂O – 1; Na₂S · 9H₂O – 0.5; Na-ацетат – 0.5; Напируват – 0.5; дрожжевой экстракт – 0.1; раствор микроэлементов – 1 мл (Pfennig, Lippert, 1966); витамин B₁₂ – 20 мкг, диурон – 50 мг; pH среды 7.0.

Для определения относительной численности АФБ в лабораторных условиях производили посев проб воды методом предельных серийных разведений природного материала на агаризованную (0.5%) питательную среду с 15 г л⁻¹ NaCl. Культивирование проводили анаэробно в течение 1 мес. в люминостате при освещенности 2000 лк и температуре 20–25°C. Выделение и очистку культур проводили методом предельных разведений посевного материала с использованием жидких и агаризованных сред с разной соленостью.

Первичная идентификация микроорганизмов была выполнена по фенотипическим признакам с учетом формы, размера, цвета клеток и микроколоний, наличия газовых вакуолей, капель серы, спектров поглощения пигментов.

Пигментный состав полученных культур АФБ исследовали в препаратах целых клеток в 50%

глицерине, а также в ацетоновых и ацетон-метанольных (7 : 2) экстрактах. Спектры поглощения снимали на спектрофотометре Cary 100 “Varian”, Австралия) в диапазоне длин волн 350–900 нм. По нашим оценкам, в ацетоне происходило смещение пиков в среднем на 3–5 единиц в коротковолновую область, по сравнению с теми же пиками в ацетон-метанольном экстракте.

Для получения спектров поглощения света озерной воды пробы концентрировали на фильтрах GF/F, далее часть фильтра замачивали в 50% глицерине и снимали его спектр (март 2012 г.) или часть фильтра обрабатывали ультразвуком в дистиллированной воде и снимали спектр полученного водного раствора пигментов против дистиллированной воды (сентябрь 2014 г.). Пигменты другой части фильтра GF/F экстрагировали ацетоном и снимали спектр полученного экстракта пигментов против ацетона.

Для определения содержания бактериохлорофиллов (Бхл) использовали формулы (Overmann, Tilzer, 1989):

$$C(\text{мкг Бхл}(d + e)) = (1.315E651 - 0.643E663 + 0.005)v \times 10^6 / (Vde\text{Бхл}d),$$

$$C(\text{мкг Хла}) = (1.35E663 - 0.643E651 + 0.005)v \times 10^6 / (Vde\text{Хла}),$$

где: C (мкг Бхл $(d + e)$) – концентрация бактериохлорофиллов $d + e$ (мг м⁻³), E651, E663 – светопоглощение ацетонового экстракта пигментов при длине волны 651 нм и 663 нм (исключая мутность, измеренную при E850), v – объем ацетонового экстракта (мл), V – объем профильтрованной пробы озерной воды (мл), d – ширина кюветы (см), ϵ – абсорбционный коэффициент: $\epsilon_{\text{Бхл}d} = 98.0 \text{ мг см}^{-1}$ (Montesinos et al., 1983), $\epsilon_{\text{Хла}a} = 84.0 \text{ л г}^{-1} \text{ см}^{-1}$ (Smith, Benitez, 1955).

Присутствие каротиноида изоксантератина, характерного для к/о ЗСБ, определяли по появлению в ацетоновых экстрактах пика в области 470 нм.

Микрофотографии клеток получали с помощью светового микроскопа Olympus при увеличении 1200 (объектив 90×) с иммерсионной системой и фазовым контрастом.

Электронно-микроскопические исследования проводили описанными ранее стандартными методами (Лунина и соавт., 2014).

Филогенетический анализ выделенных штаммов АФБ проводили, определяя последовательности генов 16S рРНК зеленых серобактерий, которые были получены из аннотации геномных сборок двух штаммов ранее описанным способом (Nikitina et al., 2015).

Выделенные пурпурные бактерии идентифицировали по гену 16S рРНК ранее описанным методом (Лунина и соавт., 2014).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Описание оз. Трехцветное. Меромиктическое оз. Трехцветное (66°35.53' N, 32°59.97' E) расположено в Пеккелинской губе, входящей в состав Ругозерской губы Кандалакшского залива Белого моря, в 12 км от Беломорской биологической станции МГУ. Его размеры: площадь – 3.2 га, средняя глубина 1–1.5 м, максимальная глубина 7.5 м (Krasnova et al., 2014, 2015; Краснова и соавт., 2016).

Озеро названо Трехцветным из-за различных по цвету слоев воды: пресный поверхностный слой – бурый за счет гуминовых веществ, средний солоноватый слой – изумрудно-зеленый в результате развития ЗСБ, нижний еще более соленый слой – желтый вследствие присутствия полисульфидов. Озеро образовалось на месте древнего морского залива, отгороженного от моря островом, который в процессе поднятия берега присоединился к матерiku. Площадь водосборного бассейна в 20 раз превышает площадь самого озера, сток с водосбора собирается вблизи поверхности озера и формирует пресный слой глубиной 1.5–1.7 м. Озеро изолировано от моря; в летнее время уровень воды в нем на 1.20–1.26 м выше уровня моря, зимой абсолютная отметка поверхности льда – 1.25 м (Краснова и соавт., 2016). С учетом скорости регрессии моря, которую оценивают в 3.25–4.00 мм в год (Романенко, Шилова, 2012), порог, отделяющий водоем от мо-

ря, в результате подъема берега полностью преградил путь приливам 3–4 столетия назад. Однако при сильных нагонных ветрах на максимуме сизигийного прилива уровень воды может подниматься настолько, что вода из моря затекает в озеро, вызывая перемешивание верхних слоев озерной воды. Это случается крайне редко, с перерывом в несколько десятилетий. Один такой эпизод был зарегистрирован осенью 2011 г. (Краснова и соавт., 2013).

Последствия заплеска морской воды и последующее восстановление стратификации. В марте следующего, 2012 г., что на широте Северного полярного круга соответствует концу зимы, соленость поверхностного слоя озера возросла на несколько единиц, а сероводород поднялся к самой поверхности льда (Краснова и соавт., 2013) (рис. 1а). Кислород в воде не обнаруживался, галоклин и термоклин совпадали и находились между 1.0 и 3.5 м. В этот сезон вся водная толща озера была окрашена в зеленый цвет из-за присутствия в ней з/о ЗСБ, содержащих бактериохлорофилл *d* (Бхл *d*). Концентрация Бхл *d* уменьшалась с глубиной и на глубине 1 м составляла 782 мг м^{-3} , на глубине 2 м – 272 мг м^{-3} . У дна на глубине 5 м наблюдалось скопление осевших клеток, и содержание Бхл *d* возрастало до 419 мг м^{-3} , что свидетельствовало о том, что перемешивание воды не затронуло нижние слои воды озера. Наибольшие значения аноксигенного фотосинтеза (АФ) были зарегистрированы в подледном слое (рис. 2а), оксигенный фотосинтез (ОФ) был сильно подавлен присутствием сероводорода и ледовым затемнением. Небольшое количество Хл *a* регистрировалось на глубине 1–2 м. Общая численность микроорганизмов на глубине 1 м составляла $33 \times 10^6 \text{ кл. мл}^{-1}$, в толще она снижалась, а у дна возрастала до $36 \times 10^6 \text{ кл. мл}^{-1}$.

В последующие годы мы наблюдали постепенное восстановление стратификации (Васильчук и соавт., 2016) (рис. 1б–1г). Вода поверхностного слоя опреснялась в марте 2013 г. до глубины 1 м и опресненный слой воды постепенно расширялся, достигая в сентябре 2014 г. глубины 1.7 м. Таким образом, в каждом последующем сезоне, согласно нашим исследованиям, галоклин становился все более резким и залегал все ниже. Появилась и все глубже распространялась кислородная зона: в марте 2013 г. она достигала 1 м, в сентябре 2013 г. – 1.8 м. Ниже зоны ветрового перемешивания на глубине 1.5–1.8 м, где пресная вода сменяется солоноватой, летом за счет активного оксигенного фотосинтеза иногда наблюдалось кислородное пересыщение: в сентябре 2013 г. оно составляло 300% на глубине 1.75 м, в сентябре 2014 г. – 204%. Одновременно в воде наблюдался хемоклин – весной 2013 г. он находился между 1–1.5 м, затем постепенно сужался и опускался вниз, занимая к сентябрю 2013 г. свое обычное в этом озере положение на глубине 1.8–1.9 м (Krasnova et al., 2015;

Краснова и соавт., 2016). Содержание сероводорода у дна возрастало с 170 мг л^{-1} в марте 2012 г., до 640 мг л^{-1} в сентябре 2014 г.

Профиль рН, выровненный перемешиванием до 7.5 по всей глубине в марте 2012 г., к сентябрю 2013 г. полностью восстановился: значения рН уменьшались от поверхности (8.6–8.9) ко дну (6.7–6.9), но в верхней части галоклина немного повышались, что вместе с высоким содержанием кислорода указывало на активный ОФ в этой зоне.

Температура у дна в течение всего года не поднималась выше $5\text{--}7^\circ\text{C}$. В летне-осенние сезоны в эпилимнионе наблюдалась обратная температурная стратификация.

По мере восстановления стратификации зеленая окраска воды оказывалась все больше приуроченной к зоне хемоклина. В максимуме зеленой окраски воды, расположенном сразу под хемоклином, постепенно увеличивалось содержание пигментов ЗСБ (Бхл *d* + *e*). Широкий, толщиной до 1.5 м, в марте 2013 г. пик пигментов с каждым сезоном становился все уже и к сентябрю 2014 г. имел толщину не более 40 см (рис. 2б–2г). Постепенно возрастала интенсивность АФ, значения АФ в сентябре 2014 г. на порядок превышали значения ОФ (238 и $23.5 \text{ мкг С л}^{-1} \text{ сут}^{-1}$ соответственно). В сентябре 2014 г. пик ОФ в кислородной зоне приходился на глубину 1.5 м, содержание Хл *a* на этой глубине составило 50 мг/м^3 . Наибольшие значения АФ наблюдались на глубине 2 м, где регистрировалось содержание Бхл (*d* + *e*) в клетках бактерий более 4500 мг м^{-3} .

С каждым сезоном увеличивалась численность бактериальных клеток в верхней части сероводородной зоны. Чрезвычайно большая общая численность микроорганизмов $2.0\text{--}2.3 \times 10^8 \text{ кл. мл}^{-1}$, была зафиксирована в сентябре 2014 г. в 10-см слое на глубине 2–2.1 м (сразу под хемоклином), что свидетельствовало о присутствии в оз. Трехцветное высокоплотного сообщества микроорганизмов, ранее не встречавшегося нам ни в одном из исследованных водоемов (рис. 2г).

Сукцессионные и сезонные изменения в сообществе АФБ. Малая глубина расположения хемоклина (1.8–1.9 м) в оз. Трехцветное и достаточное освещение хемоклина – освещенность на верхней границе зеленого слоя составляет 20–150 лк, создают благоприятные условия для развития АФБ в верхней части сероводородной зоны. Во все сезоны исследований в озере доминировали ЗСБ, однако в зависимости от сезона встречались как зеленые, содержащие Бхл *d* и каротиноид хлоробактин, так и коричневые формы, содержащие Бхл *e* и каротиноид изорениератин. В марте 2012 г., когда вследствие осеннего перемешивания воды сероводород присутствовал даже подо льдом, пики Бхл *d* (450 нм и 730 нм в воде; 429 нм и 656 нм в ацетоновом экстракте) наблюдались, начиная с поверхности и до дна озера (рис. 3). На

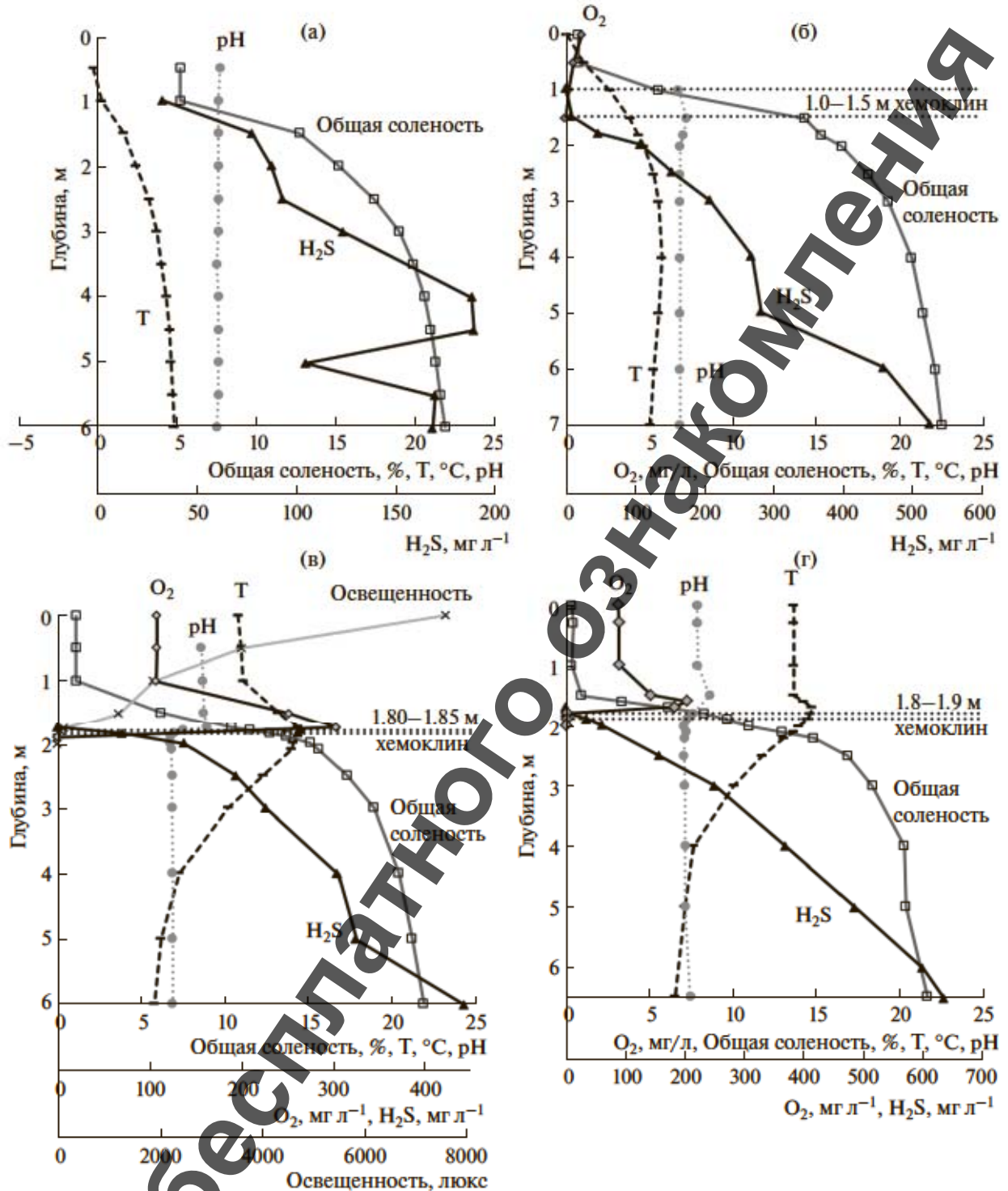


Рис. 1. Гидрохимические показатели воды оз. Трехцветное: а – март 2012; б – март 2013; в – сентябрь 2013; г – сентябрь 2014.

спектрах озерной воды в этот сезон нет признаков развития к/о ЗСБ (отсутствует пик изорениератина в области 470 нм). В посевах проб воды на агаризованную среду наблюдался рост колоний только зеленого цвета. По данным количествен-

ного учета на глубине 2 м число жизнеспособных клеток ЗСБ составляло 2.1×10^3 кл. мл⁻¹, на глубине 5 м – 1×10^3 кл. мл⁻¹, в придонной воде на глубине 6 м – 4.7×10^3 кл. мл⁻¹ (табл. 1). О присутствии жизнеспособных клеток к/о ЗСБ в воде

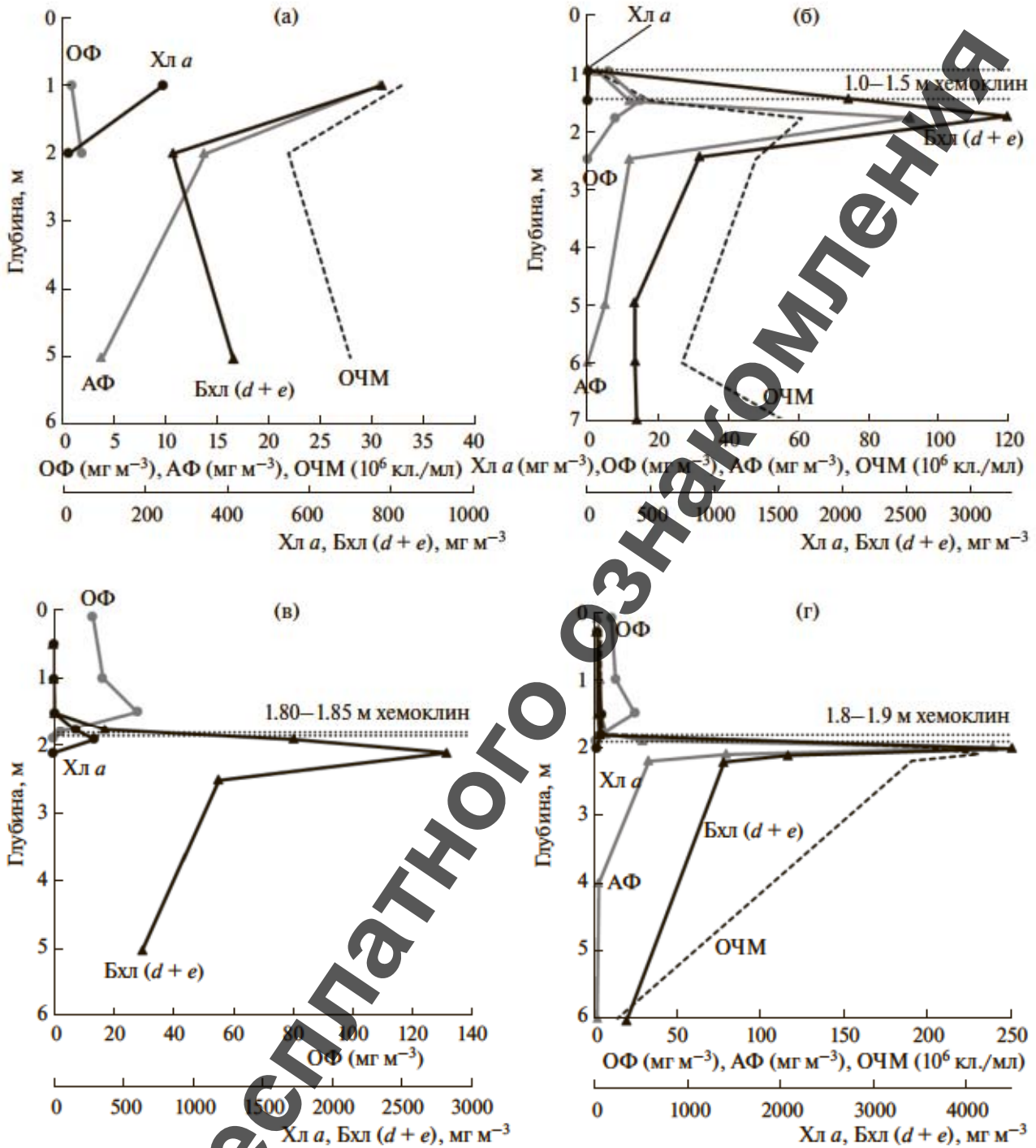


Рис. 2. Профили фотосинтеза, содержания пигментов и общего счета клеток бактерий в воде оз. Трехцветное: (а) – март 2012, (б) – март 2013, (в) – сентябрь 2013, (г) – сентябрь 2014. Обозначения: ОФ – оксигенный фотосинтез; АФ – аноксигенный фотосинтез; Хл *a* – хлорофилл *a*; Бхл (*d* + *e*) – суммарно бактериохлорофиллы *d* и *e* зеленых серобактерий; ОЧМ – общая численность микроорганизмов.

озера свидетельствует также тот факт, что спустя 3,5 года в одном из накопительных флаконов, хранившихся без специального освещения в холодильнике, был отмечен заметный рост к/о ЗСБ.

В марте 2013 г. в озере наблюдалась сформированная кислородная зона, а сероводород начинал появляться с глубины 1 м. С этой глубины и до дна озера в озерной воде наряду с пиком Бхл *d* (430 нм) присутствовал пик 470 нм, характерный

для к/о ЗСБ, содержащих Бхл *e* и каротиноид изо-рениератин (рис. 4). На глубине 1 и 1.5 м (верхняя часть сероводородной зоны) пик 470 нм (к/о ЗСБ) превышал пик 430 нм (з/о ЗСБ). Однако в посевах, предназначенных для количественного учета АФБ, выросли преимущественно зеленые и пурпурные колонии. В верхних горизонтах сероводородной зоны (1.5–3 м) в незначительном количестве развивались ПСБ с газовыми вакуолями, максимальная численность которых (3.4×10^3 кл./мл) была зафиксирована на глубине 1.6 м. Из-за такого малого количества клеток на спектрах озерной воды ни в один из сезонов исследований нами не отмечалось присутствие пурпурных бактерий. Количество колоний зеленого цвета в пробах увеличивалось с глубиной, достигая максимума на 4 м ($2.1\text{--}2.8 \times 10^4$ кл. мл⁻¹) и 5 м ($3.5 \times 10^3\text{--}2.5 \times 10^4$ кл. мл⁻¹). К/о ЗСБ выросли в толще агаризованной среды в виде очень мелких, едва заметных, размытых и быстро исчезающих колоний, количественно учесть которые не представлялось возможным. В жидких накопительных культурах к/о ЗСБ конкурентно вытеснялись з/о формами.

В последующий вегетационный сезон (сентябрь 2013 г.) развитие к/о ЗСБ в озере оказалось полностью подавленным зелеными формами ЗСБ. Однако о присутствии клеток к/о ЗСБ в озерной воде свидетельствовало еле заметное плечо 470 нм на спектре воды (экстракт) с глубины 1.5 м (зона кислородного пересыщения) (рис. 5). Аналогичная картина наблюдалась в сентябре 2014 г.: не большой пик к/о ЗСБ и слабое плечо при 470 нм видны на спектрах воды с глубин 1.5–1.8 м (рис. 6).

В теплое время года среди АФБ подавляющие доминировали з/о ЗСБ. В сентябре 2013 г. на глубине 1.9 м было не менее 10^5 кл. мл⁻¹ з/о ЗСБ, в то время как количество ПСБ не превышало 0.1×10^3 кл. мл⁻¹, а количество пурпурных несерных бактерий (ПНБ) было не более 0.6×10^3 кл. мл⁻¹. В сентябре 2014 г. на глубине 2–2.1 м сформировался высокоплотный слой микроорганизмов, основной составляющей которого явились з/о ЗСБ. Интересно, что в посевах проб воды сентября 2014 г. пурпурные бактерии встречались ниже высокоплотного зеленого слоя, при этом количество ПНБ снизилось до 0.4×10^3 кл. мл⁻¹ (на 2.2 м), в то время как ПСБ практически отсутствовали. К/о ЗСБ в летние сезоны высевались из проб воды верхней части сероводородной зоны (в том числе и из высокоплотного слоя), в виде единичных, обычно прозрачных и быстро исчезающих колоний.

Характеристика выделенных аноксигенных фототрофных бактерий. В разные сезоны исследований из воды озера были выделены 4 штамма АФБ: зеленоокрашенные зеленые серобактерии *GrTcv12*, коричневоокрашенные зеленые серобактерии *PhvTcv-s14*, пурпурные серобактерии *AmTcv13* и пурпурные несерные бактерии *RprtTcv12*.

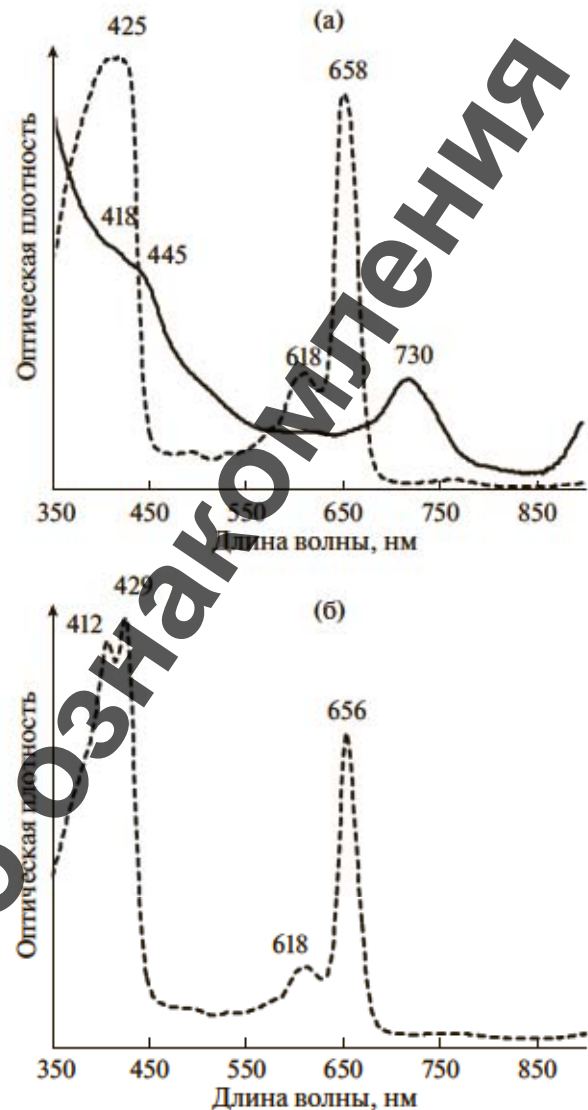


Рис. 3. Спектры поглощения пигментов из взвеси воды оз. Трехцветное, март 2012. Сплошная линия – спектр стекловолнистого фильтра GF/F (через который была профильтрована озерная вода) в 50% глицерине, пунктирная линия – спектр экстракта пигментов в ацетоне. Глубина (м): а – 1; б – 2.

В марте 2012 г. зеленоокрашенные ЗСБ *GrTcv12* были выделены из пробы озерной воды с глубины 1 м. Клетки культуры были мелкие, неподвижные, округлые или овальные, размером $0.3\text{--}0.5 \times 0.6\text{--}0.8$ мкм, содержали газовые вакуоли и могли быть одиночными или образовывали короткие (несколько клеток) и длинные (более 20 клеток) изогнутые нити. Некоторые отдельные клетки были крупнее и достигали размеров $0.3\text{--}0.8 \times 1\text{--}1.5$ мкм (рис. 7а–7в). Культура оказалась солоноватоводной, оптимальная соленость для роста штамма *GrTcv12* составляла $5\text{--}10$ г л⁻¹ NaCl. Фотосинтетическими пигментами были Бхл *d* и каротиноид хлоробактин. Спектры штамма ЗСБ

Таблица 1. Данные количественного учета выросших на агаризованной среде колоний АФБ при посеве проб воды с различных горизонтов оз. Трехцветное, март 2013 г.

Глубина, м	Численность клеток АФБ в воде озера, кл. мл ⁻¹	
	зеленоокрашенные ЗСБ	пурпурные серобактерии
1.5	0.45×10^3	0.23×10^3
1.6	5.9×10^3	3.4×10^3
2	$7-8.1 \times 10^3$	0.2×10^3
3	$0.8-3 \times 10^4$	0.14×10^3
4	$2.1-2.8 \times 10^4$	—
5	$3.5 \times 10^3-2.5 \times 10^4$	—

GrTcv12 полностью совпали со спектрами озерной воды, а также были близки к спектрам з/о ЗСБ, выделенных нами ранее из оз. Кисло-Сладкое (рис. 8а) (Лунина и соавт., 2014). По данным сиквенса гена 16S рДНК штамм з/о ЗСБ *GrTcv13* (GenBank MH509940) имел 99% сходства с з/о тиосульфат-зависимым штаммом *Chlorobium phaeovibrioides* DSM 265 (номер Генбанка CP000607.1), а также с з/о штаммами *Chlorobium* spp. *ChlvPS10* (номер Генбанка KC702852.1), *PrPS10* (номер Генбанка KC702854.1), к/о штаммом *PhvPS10* (номер Генбанка KC702853.1), выделенными нами из оз. Кисло-Сладкое (Кандалакшский залив Белого моря).

Коричневоокрашенные ЗСБ *PhvTcv-s14*, были выделены из колонии, выросшей на агаризованной среде при посеве озерной воде с глубины 2.2 м (сентябрь 2014 г.). В накопительных флаконах роста к/о ЗСБ не наблюдалось. Клетки культуры обычно были округлые или слабоизогнутые, неподвижные, размером 0.3–0.5 мкм, газовых вакуолей не содержали (рис. 7г, 7д). Культура хорошо вырастала при солености 5–20 г л⁻¹ NaCl, оптимальная соленость для роста штамма *PhvTcv-s14* составляла 10 г л⁻¹ NaCl. Фотосинтетическими пигментами были Бхл е и каротиноид изорениератин. Спектры живой культуры и ацетон-метанольных экстрактов пигментов штамма *PhvTcv-s14* совпадали со спектрами к/о ЗСБ штамма *PhvPS10*, выделенного из оз. Кисло-Сладкое в 2010 г. (рис. 8б). Штамм к/о ЗСБ *PhvTcv-s14* (GenBank MH509941) имел 99% сходства с з/о штаммом *GrTcv13*, а также по 99% сходства с к/о *Chlorobium phaeovibrioides* DSM 265 и ЗСБ из оз. Кисло-Сладкое: з/о *ChlvPS10*, з/о *PrPS10*, к/о *PhvPS10*. Таким образом, наши данные показали, что как з/о ЗСБ, так и к/о ЗСБ из оз. Трехцветное относятся к двум морфотипам известного вида *Chlorobium phaeovibrioides*, причем зеленый морфотип содержит газовые везикулы, что ранее не отмечалось для бактерий данного вида.

В оз. Трехцветное обнаружены как соленоводные, так и пресноводные пурпурные бактерии. Галофильные пурпурные серобактерии *AmTcv13* были выделены из пробы воды с глубины 1.5 м (март 2013 г.). Это были неподвижные округлые клетки 1–1.7 мкм в диаметре, содержащие газовые вакуоли и капли серы (рис. 7е, 7ж). Фотосинтетическими пигментами были Бхл а и каротиноиды океановой серии. Культура хорошо вырастала при солености 10–35 г л⁻¹ NaCl, оптимальная соленость составляла 10 г л⁻¹. Спектры живой культуры и ацетон-метанольных экстрактов пигментов штамма *AmTcv13* были близки спектрам океаносодержащих штаммов *AmPS10* и *TcvPS10*, выделенных из оз. Кисло-Сладкое в сентябре 2010 г. (рис. 8в). Штамм пурпурных серобактерий *AmTcv13* (GenBank MG193753), содержащий каротиноиды океановой серии, имел по 99% сходства с типовыми штаммами: спириллоксантин-содержащим штаммом *Thiocapsa rosea* DSM 235T (GenBank AJ006062), океаносодержащим штаммом *Thiocapsa marina* DSM 5653T (GenBank FM178270.1), а также с океаносодержащим штаммом *Thiocapsa* sp. *AmPS10* (GenBank KC702856) из оз. Кисло-Садкое.

Пурпурные несерные бактерии штамм *RpmpTcv12* были выделены из единичных колоний, выросших на агаре при выделении ЗСБ (март 2012 г.). Клетки культуры – подвижные палочки (0.4–0.6 × 1.5–2 мкм), содержали Бхл а и каротиноиды спириллоксантиновой серии (рис. 7з–7к, 8г). Культура не росла при концентрации NaCl выше 15 г л⁻¹. Присутствие пресноводного вида пурпурных несерных бактерий в воде хемоклина можно объяснить поступлением пресных вод с заболоченных берегов водоема. Штамм пурпурных несерных бактерий *RpmpTcv12* (GenBank MG193752) имел по 99% сходства со штаммами *Rhodopseudomonas palustris* NaA2 и BisB5 (номер Генбанка CP000250.1 и CP000283.1).

ОБСУЖДЕНИЕ

Озеро Трехцветное является вторым стратифицированным водоемом на берегу Кандалакшского залива Белого моря, подробно исследованным нами (после оз. Кисло-Сладкое) с точки зрения видового разнообразия АФБ. Озеро Трехцветное является меромиктическим, хотя в экстраординарных случаях меромиксия этого водоема частично нарушается, что наблюдалось последний раз осенью 2011 г. Галоклин и термоклин озера практически совпадают, что гарантирует стабильное положение границы, разделяющей соленоводную сероводородную и сильно распресненную кислородную зоны водоема. Граница сероводородной зоны находится на глубине 1.8–1.9 м и хорошо освещена. При максимальной глубине всего 7.5 м, глубинные воды озера содержат рекордные концентрации сульфида (более 600 мг л⁻¹), что обеспечивает формирование сверхплотного слоя з/о ЗСБ сразу под редокс-зоной.

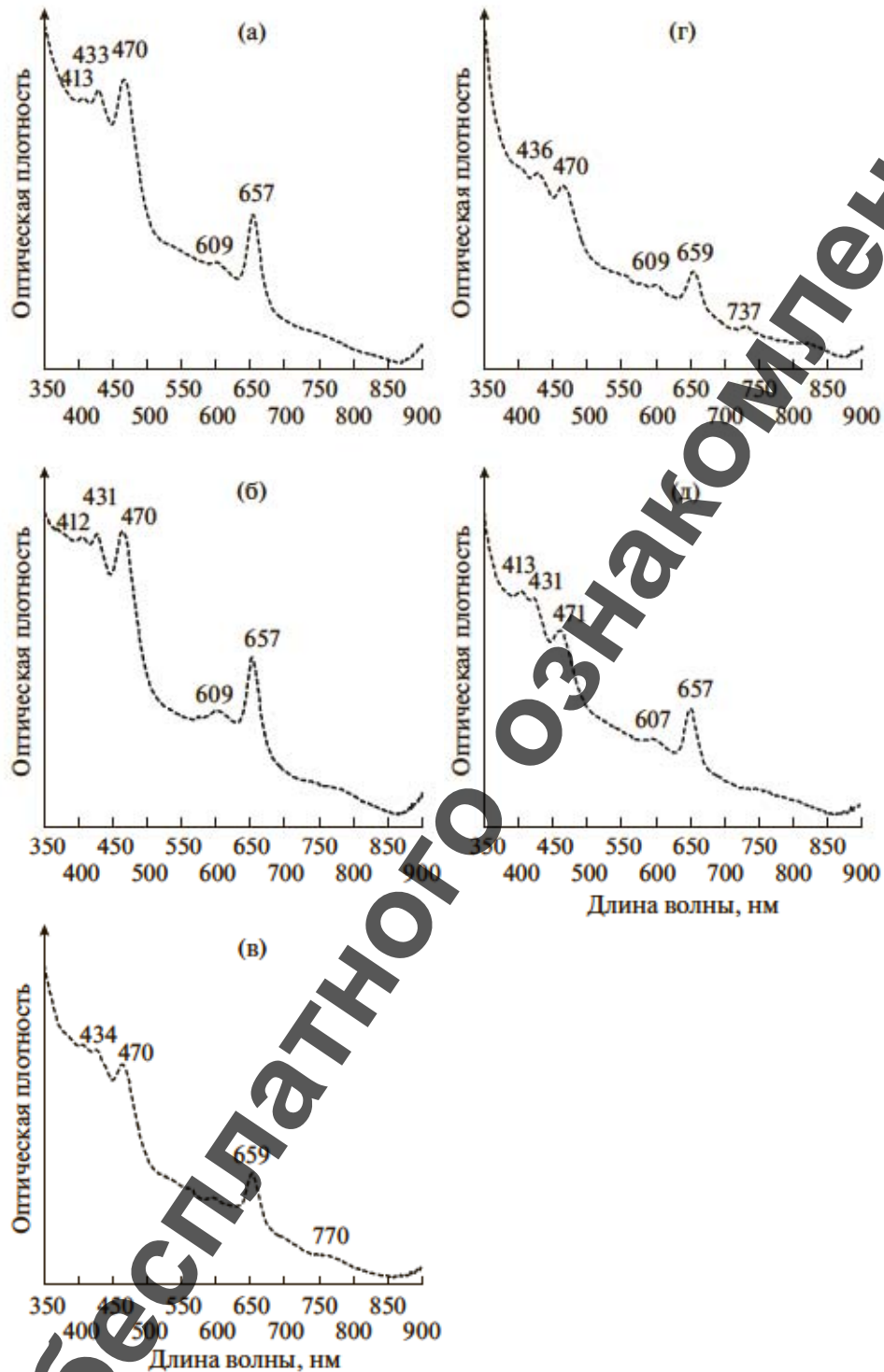


Рис. 4. Спектры поглощения ацетон-метанольных (7 : 2) экстрактов пигментов из взвеси воды оз. Трехцветное, март 2013. Глубина: а – 1 м; б – 1.5 м; в – 2 м; г – 2.5 м; д – 4 м.

Все выделенные нами бактерии из оз. Трехцветное оказались филогенетически очень близки бактериям, ранее выделенным из оз. Кисло-Сладкое, и были определены как зеленые и коричневые морфотипы известного вида *Chlorobium phaeovibrioides*,

имея между собой 99% сходства по данным сиквенса гена 16S рРНК. Коричневый морфотип этого же вида ЗСБ доминировал в известном заполярном мезомиктическом оз. Могильное (Лунина и соавт., 2005). Этот факт говорит о возможной зависимости

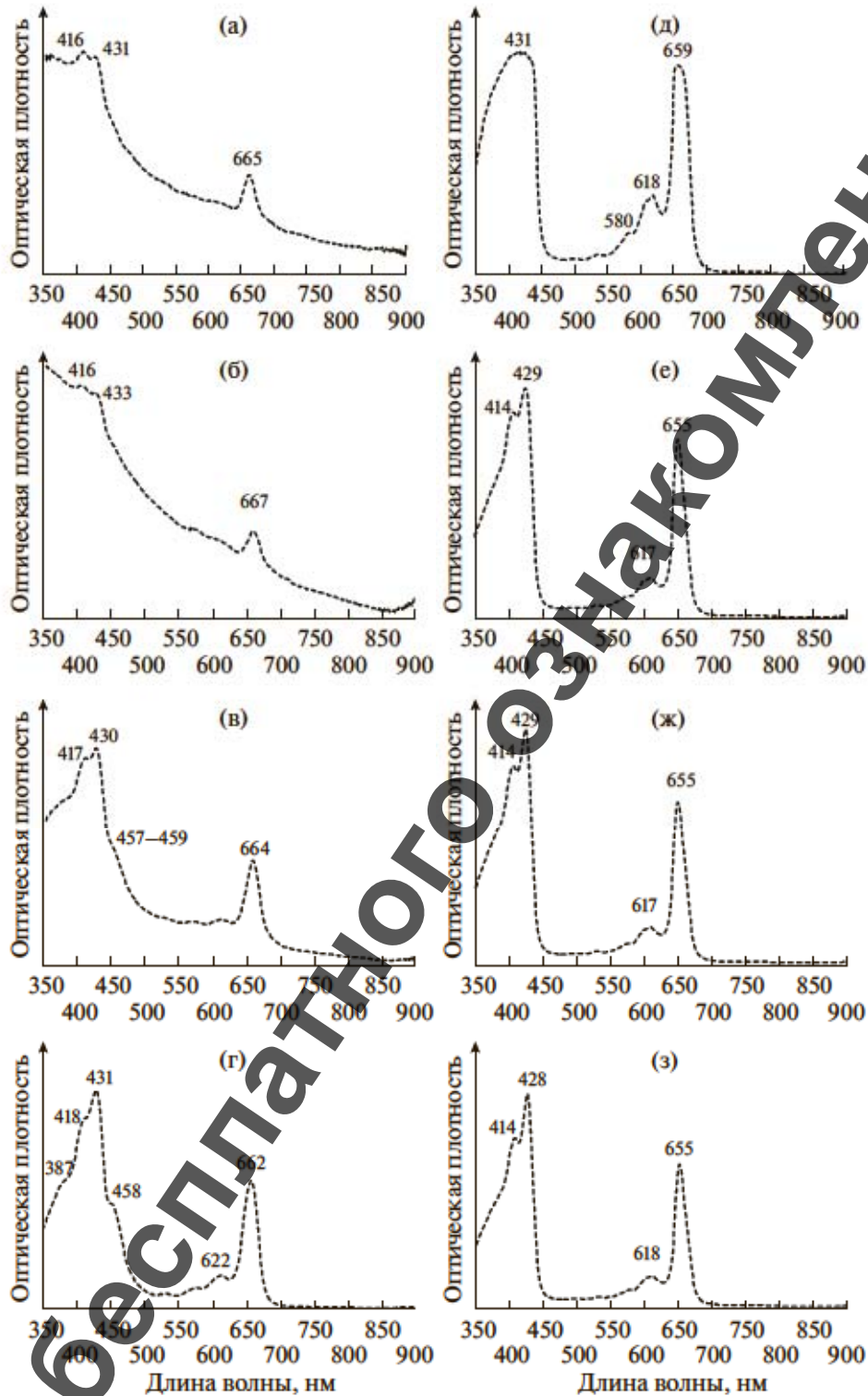


Рис. 5. Спектры поглощения ацетоновых экстрактов пигментов из взвеси воды оз. Трехцветное, сентябрь 2013. Глубина (м): а – 0,5; б – 1; в – 1,5; г – 1,75; д – 1,9; е – 2,1; ж – 2,5; з – 5.

видовой идентичности ЗСБ от географической близости водоемов, имеющих связь с морем, в приполярных и заполярных районах.

Тем не менее, оз. Трехцветное отличается от оз. Кисло-Сладкого и других ранее исследованных водоемов сразу двумя уникальными чертами: образовани-

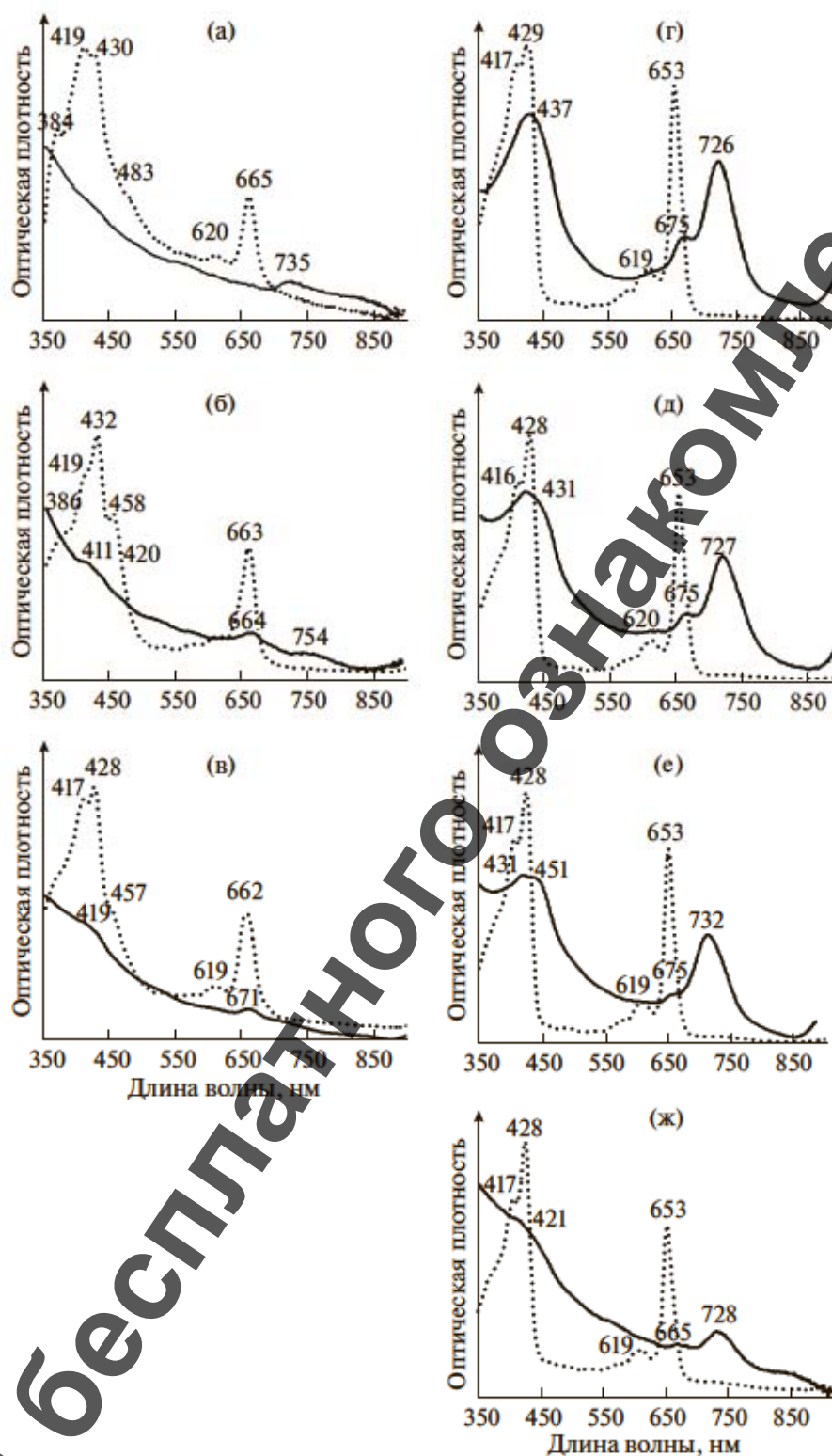


Рис. 6. Спектры поглощения пигментов из взвеси воды оз. Трехцветное, сентябрь 2014. Глубина (м): а – 0.3; б – 1.5; в – 1.8; г – 2; д – 2.1; е – 2.2; ж – 6. Сплошная линия – пигменты озерной взвеси, сконцентрированной на фильтре GF/F, далее разбиты ультразвуком в дистилляте и снят спектр против дистиллята. Пунктирная линия – ацетоновый экстракт пигментов.

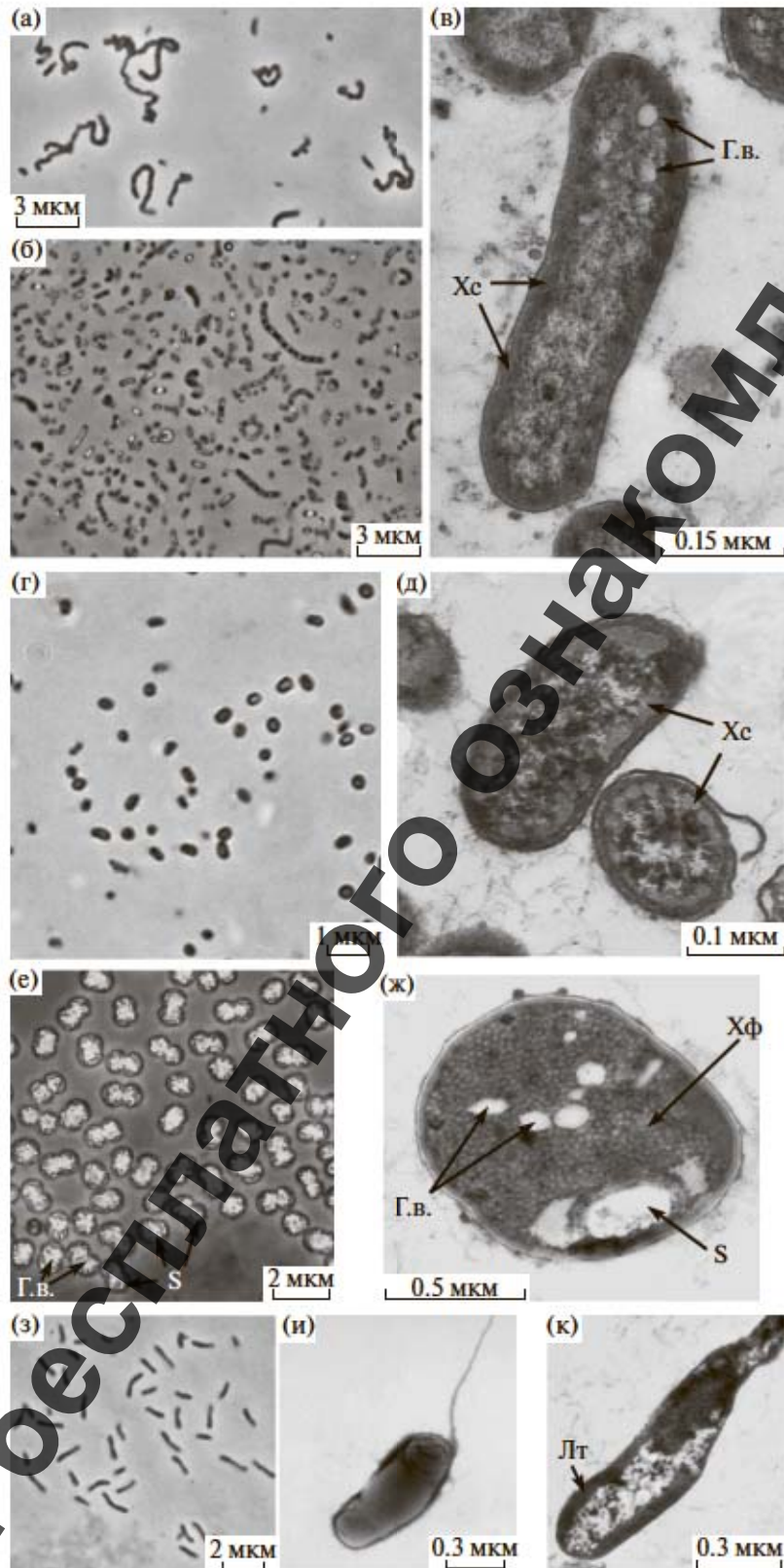


Рис. 7. Морфология и ультратонкое строение клеток анаэробных фототрофных бактерий из оз. Трехцветное: *GfTcv12* (а–б), *BrTcv-s14* (г, д), *AmTcv13* (е, ж), *RptrTcv12* (з–к). Световой микроскоп, фазовый контраст (а, б, г, е, з); электронные микрофотографии тотального препарата (и) и ультратонких срезов клеток бактерий (в, д, ж, к). Обозначения: Г.в. – газовые вакуоли; Хс – хлоросомы; Хф – хроматофоры; S – капли серы; Лт – ламеллярные тилакоиды.

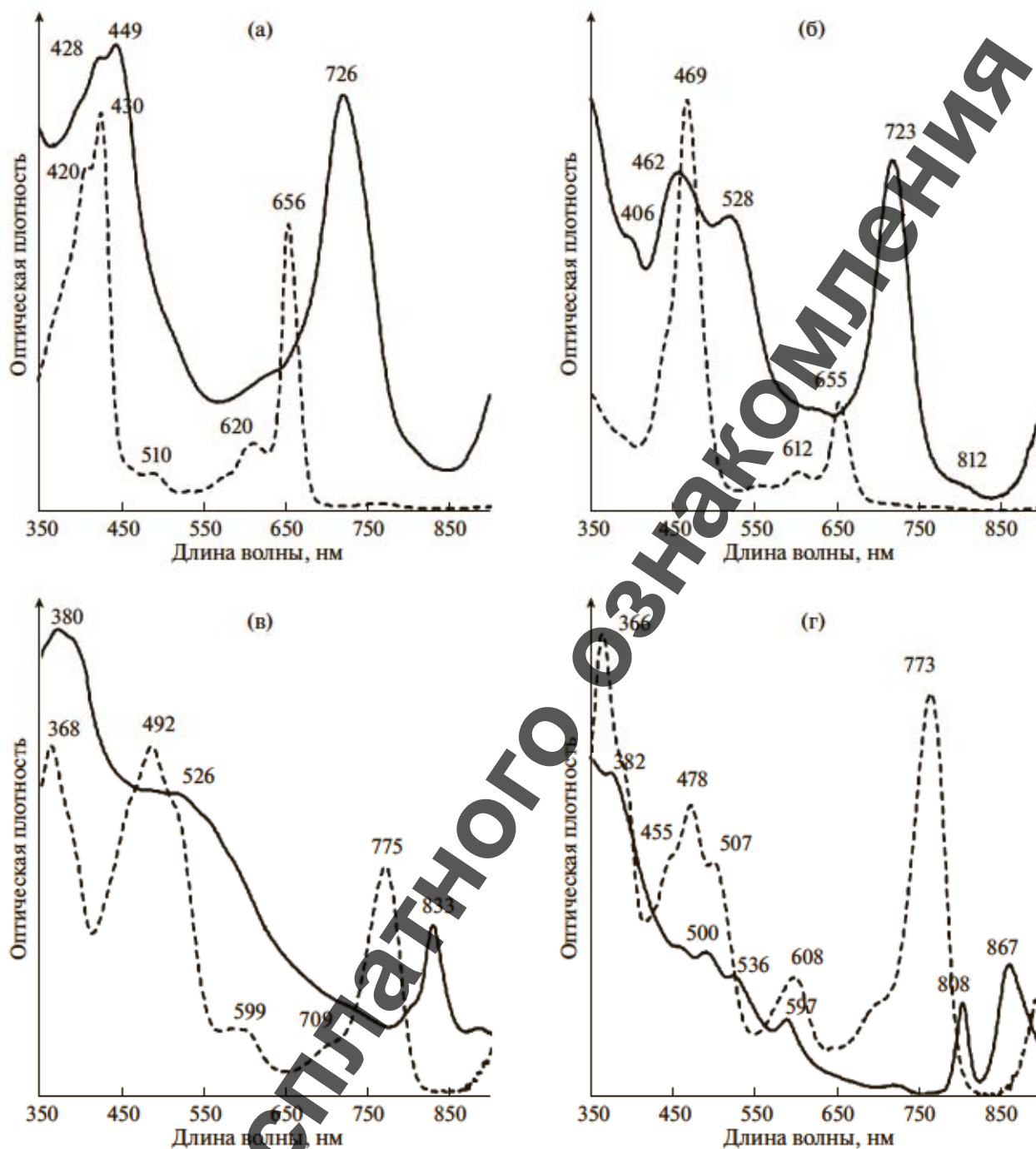


Рис. 8. Спектры аноксицидных фототрофных бактерий из оз. Трехцветное: а – зеленоокрашенные ЗСБ *G7Tcv12*; б – коричневоокрашенные ЗСБ *B7Tcv-s14*; в – пурпурные серобактерии *A1Tcv13*; г – несерные пурпурные бактерии *RpmpTcv12*. Сплошная линия – спектр живой культуры в глицерине, пунктирная линия – спектр ацетон-метанольного экстракта пигментов (7 : 2).

ем высокоплотного слоя зеленых серобактерий и необычным положением коричневоокрашенных ЗСБ в верхней части сообщества АФБ, что было отмечено также М.Ю. Горбуновым (устное сообщение).

Мы полагаем, что причины этих особенностей кроются в чрезвычайно резких градиентах гидрохимических параметров зоны хемо- и галоклина,

вследствие чего сразу под хемоклином формируется бактериальное сообщество высокой плотности. В сентябре 2014 г. в 10-см слое зеленой воды на границе кислородной и сероводородной зон зарегистрированная плотность бактериальных клеток была не менее 10^8 кл. мл⁻¹. Небольшая толщина такого плотного зеленого слоя может зависеть от

подпирающего снизу мощного потока сероводорода. Мы полагаем, что наибольшая плотность клеток ЗСБ сосредоточена в верхней части зеленого слоя может быть даже несколько выше полученных нами значений, что связано с неизбежным захватом при пробоотборе воды из соседних горизонтов с меньшей плотностью ЗСБ.

Следствием высокой плотности слоя, состоящего, в основном, из зеленоокрашенных клеток, является необычное положение в летние сезоны слоя коричневоокрашенных ЗСБ. Практически полное отсутствие жизнеспособных клеток к/о ЗСБ в посевах свидетельствует о неприспособленности этих бактерий к росту в условиях интенсивного освещения. Однако отмеченное нами в сентябре 2013 г. полное поглощение света плотным слоем з/о ЗСБ свидетельствует также и о невозможности развития к/о форм ЗСБ в обычной для них экологической нише под слоем з/о ЗСБ. Таким образом, развитие к/о серобактерий в озере в летние сезоны оказывается сильно подавленным избытком освещения в верхней части хемоклина, конкурентным вытеснением со стороны быстро растущих з/о клеток внутри плотного слоя, полным отсутствием света под высокоплотным слоем бактериальной пластинки.

Интересно, что в зимний сезон 2012 г., когда из-за заброса морской воды произошло нарушение хемоклина, и сероводородная зона поднялась под самый лед, проникающего поверхностного освещения хватило для поддержания развития з/о форм ЗСБ, тогда как развития к/о форм не происходило. Зимой 2013 г. в связи с отдалением зоны хемоклина от поверхности льда, недостаток поверхностного освещения начинал сдерживать развитие з/о форм ЗСБ, и в верхней части сероводородной зоны создавались благоприятные условия для развития к/о ЗСБ. В этот сезон ниже глубины 1,5 м, где при отсутствии света клетки ЗСБ представлены, в основном, отмирающей и оседающей биомассой, пик з/о ЗСБ (430 нм) превалировал над пиком к/о ЗСБ (470 нм). Это говорит о том, что, несмотря на глубокую адаптацию к чрезвычайно низкому освещению, развитие к/о ЗСБ в зимние сезоны в озере не достигает такого размаха, как развитие з/о ЗСБ в летние сезоны, что, вероятно, связано с низкой скоростью роста к/о ЗСБ при слабом освещении.

После таяния льда, з/о клетки с присущей им г-стратегией развития (для которой свойственны высокая плодовитость, небольшие размеры, относительно короткое время жизни поколения и способность быстрого и широкого распространения) очень быстро достигали высокой плотности, и слой к/о ЗСБ оказывался запертым между плотным слоем з/о ЗСБ и кислородным слоем, с последующим вытеснением к/о клеток в кислородную зону, где к/о ЗСБ, будучи строгими анаэробами, быстро теряли жизнеспособность. Тот факт, что из высокоплотного слоя происходило высевание

единичных колоний к/о ЗСБ, свидетельствует о сохранении единичных жизнеспособных клеток к/о ЗСБ в сообществе.

Примечательно, что развитие пурпурных серобактерий, содержащих газовые вакуоли, также оказалось сильно подавленным. Об этом свидетельствует отсутствие пурпурных бактерий в посевах проб воды марта 2012 г. и сентября 2014 г. Развитие сколько-нибудь заметного количества ПСБ (3.4×10^3 кл. мл⁻¹) происходило в течение 2012–2013 гг. в условиях широкое и разреженное слоя зеленой воды. В этот период становления сообщества АФБ хемоклина вполне ожидаемым казалось бы формирование двух разноокрашенных слоев по примеру двуслойного сообщества оз. Шунет, в котором глубина, профиль сероводорода в водной толще и концентрация сероводорода у дна практически совпадают с таковыми в оз. Трехцветное (Дунина и соавт., 2007). Однако в оз. Трехцветное такого не происходит, что, по видимому, связано с высокой скоростью роста клеток з/о ЗСБ, по сравнению со скоростью роста клеток ПСБ и с установлением резких градиентов кислорода и сероводорода в очень узкой (10 см), в отличие от оз. Шунет (25 см), зоне хемоклина.

Первый автор от всей души благодарит замечательную актрису Ксению Лаврову-Глинку, вдохновляющие кинематографические работы которой служили настоящим двигателем при осознании и изложении простого материала настоящей статьи. Авторы выражают искреннюю благодарность директору Беломорской биологической станции МГУ им. Н.А. Перцова А.Б. Цетлину, заведующему А.В. Савченко, водителям катеров и снегоходов В.В. Сивонену, В.Т. Колбыко, коллегам по летним и зимним экспедициям А.Н. Пантюлину, С.В. Пацаевой, Г.Н. Лосюк за помощь в проведении полевых исследований. Работа выполнена по теме госзадания (№ госрегистрации 01201350937), а также с использованием финансовых средств проектов РФФИ № 16-05-00548 и 17-04-01263. Идентификация бактерий выполнена в рамках выполнения государственного задания № 0104-2014-0203 с использованием научного оборудования ЦКП «Биоинженерия».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Васильчук Ю.К., Фролова Н.Л., Краснова Е.Д., Буданцева Н.А., Васильчук А.К., Добрыднева Л.В., Ефимова Л.Е., Терская Е.В., Чижова Ю.Н. Изотопно-геохимический состав воды в меромиктическом озере Трехцветном на Беломорском побережье // Водные ресурсы. 2016. Т. 43. С. 555–566.
- Vasil'chuk, Yu.K., Frolova, N.L., Krasnova, E.D., Budantseva, N.A., Vasil'chuk, A.C., Dobrydneva, L.V., Efimova, L.E., Terskaya, E.V., and Chizhova, Ju.N., Water isotopic-geochemical composition in the Trekhtsvetnoe meromictic lake on the White Sea coast, Water Res., 2016, vol. 43, pp. 828–838.
- Горленко В.М., Дубинина Г.А., Кузнецов С.И. Экология водных микроорганизмов. М.: Наука, 1977. С. 181–192.

- Горленко В.М., Михеев П.В., Русанов И.И., Пименов Н.В., Иванов М.В. Эко-физиологические свойства фотосинтезирующих бактерий из зоны хемоклина Черного моря // *Микробиология*. 2005. Т. 74. С. 239–247.
- Gorlenko V.M., Mikheev P.V., Rusanov I.I., Pimenov N.V., Ivanov M.V. Ecophysiological properties of photosynthetic bacteria from the Black Sea chemocline zone // *Microbiology (Moscow)*. 2005. V. 74. P. 201–209.
- Дубинин А.В., Демидова Т.П., Кременецкий В.В., Кокрятская Н.М., Римская-Корсакова М.Н., Якушев Е.В. Определение восстановленных форм серы в анаэробной зоне Черного моря: сравнение методов спектрофотометрии и иодометрии // *Океанология*. 2012. Т. 52. С. 200–209.
- Dubin A.V., Demidova T.P., Kremetskii V.V., Rimskaya-Korsakova M.N., Kokryatskaya N.M., Yakushev E.V. Determination of the reduced sulfur species in the anoxic zone of the Black Sea: A comparison of the spectrophotometry and iodometry techniques // *Oceanology*. 2012. V. 52. P. 181–190.
- Краснова Е.Д., Пантюлин А.Н., Белевич Т.А., Воронов Д.А., Демиденко Н.А., Житина Л.С., Ильяш Л.В., Кокрятская Н.М., Лунина О.Н., Мардашова М.В., Прудковский А.А., Саввищев А.С., Филиппов А.С., Шевченко В.П. Комплексные исследования отделяющихся водоемов на разных стадиях изоляции от Белого моря в марте 2012 г. // *Океанология*. 2013. Т. 53. С. 714–717.
- Krasnova E.D., Belevich T.A., Zhitina L.S., Ilyash L.V., Mardashova M.V., Prudkovskiy A.A., Pantyulin A.N., Voronov D.A., Demidenko N.A., Kokryatskaya N.M., Lunina O.N., Savvichev A.S., Filippov A.S., Shevchenko V.P. Multidisciplinary studies of the separating lakes at different stage of isolation from the White Sea performed in March 2012 // *Oceanology*. 2013. V. 53. P. 639–642.
- Краснова Е.Д., Воронов Д.А., Демиденко Н.А., Кокрятская Н.М., Пантюлин А.Н., Рогатых Т.А., Самсонов Т.Е., Фролова Н.Л. К инвентаризации реликтовых водоемов, отделяющихся от Белого моря // Комплексные исследования Бабьего моря, полу-изолированной беломорской лагуны: геология, гидрология, биота, изменения на фоне трансгрессии берегов / Труды Беломорской биостанции МГУ. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2016. Т. 12. С. 211–241.
- Krasnova E.D., Demidenko N.A., Pantyulin A.N., Frolova N.L., Efimova L.E., Shirokova V.A. Термический и ледовый режимы реликтовых водоемов, отделяющихся от Белого моря // *Динамика и термика рек, водохранилищ и прибрежной зоны морей / Труды VIII Межд. научно-практической конф.: в 2 томах. М.: Российский университет дружбы народов*, 2014. С. 430–443.
- Лунина О.Н., Горленко В.М., Дюрова О.А., Акимов В.Н., Русанов И.И., Пименов Н.В. Сезонные изменения структуры сообщества анаэробных фототрофных бактерий реликтового озера Могильное (о. Кильдин, Баренцево море) // *Микробиология*. 2005. Т. 74. С. 677–686.
- Lunina O.N., Gorlenko V.M., Solov'eva O.A., Akimov V.N., Rusanov I.I., Pimenov N.V. Seasonal changes in the structure of the anoxygenic phototrophic bacterial community in Lake Mogilnoe, a relict lake on Kil'din Island in the Barents Sea // *Microbiology (Moscow)*. 2005. V. 74. P. 588–596.
- Лунина О.Н., Брянцева И.А., Акимов В.Н., Русанов И.И., Рогозин Д.Ю., Барина Е.С., Лысенко А.М., Пименов Н.В. Сезонные изменения структуры сообщества анаэробных фототрофных бактерий озера Шунет (Хакасия) // *Микробиология*. 2007. Т. 76. С. 416–428.
- Lunina O.N., Bryantseva I.A., Akimov V.N., Rusanov I.I., Rogozin D.Yu., Barinova E.S., Lysenko A.M., Pimenov N.V. Seasonal changes in the structure of the anoxygenic phototrophic bacterial community in Lake Shunet, Khakassia // *Microbiology (Moscow)*. 2007. V. 76. P. 368–379.
- Лунина О.Н., Кевбрина М.В., Акимов В.Н., Пименов Н.В. Сообщество анаэробных фототрофных бактерий горного меромиктического озера Гек-Гель (Азербайджан) // *Микробиология*. 2008. Т. 77. С. 675–682.
- Lunina O.N., Kevbrina M.V., Akimov V.N., Pimenov N.V. Anoxygenic phototrophic bacteria of the high-altitude meromictic lake Gek-Gel, Azerbaijan // *Microbiology (Moscow)*. 2008. V. 77. P. 602–609.
- Лунина О.Н., Пименов Н.В. Анаэробные фототрофные бактерии в карстовых меромиктических озерах Среднего Поволжья // *Биоразнообразие и типология карстовых озер Среднего Поволжья / Под ред. Мингазовой Н.М. Казанский гос. ун-т*, 2009. С. 121–135.
- Лунина О.Н., Саввищев А.С., Кузнецов Б.Б., Пименов Н.В., Горленко В.М. Анаэробные фототрофные бактерии стратифицированного озера Кисло-Сладкое, (Кандалакшский залив Белого моря) // *Микробиология*. 2014. Т. 83. С. 90–108.
- Lunina O.N., Savvichev A.S., Kuznetsov B.B., Pimenov N.V., Gorlenko V.M. Anoxygenic phototrophic bacteria of the Kисло-Sladkoe stratified lake (White Sea, Kandalaksha Bay) // *Microbiology (Moscow)*. 2013. V. 82. P. 815–832.
- Романенко Д.А., Шилова О.С. Последледниковое поднятие Карельского берега Белого моря по данным радиуглеродного и диатомового анализов озерно-болотных отложений п-ова Киндо // *Докл. РАН*. 2012. Т. 442. С. 544–548.
- Romanenko D.A., Shilova O.S. The postglacial uplift of the Karelian Coast of the White Sea according to radiocarbon and diatom analyses of Lacustrine-Boggy deposits of Kindo Peninsula // *Doklady Earth Sciences*. 2012. V. 442. P. 242–246.
- Casamayor E.O., Schafer H., Baneras L., Pedros-Alio C., Muyzer G. Identification of and spatio-temporal differences between microbial assemblages from two neighboring sulfurous lakes: comparison by microscopy and denaturing gradient gel electrophoresis // *Appl. Environ. Microbiol.* 2000. V. 66. P. 499–508.
- Ecology of Meromictic Lakes / Eds. Gulati R.D., Zadereev E.S., Degermendzhi A.G. Cham: Springer Int. Publ., 2017. V. 228. 405 p.
- Hobbie J.T., Daley R.J., Jasper S. Use of Nucleopore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy // *Appl. Environ. Microbiol.* 1977. V. 33. P. 1225–1228.
- Gorlenko V.M., Vainshtein M.B., Kachalkin V.I. Microbiological characteristic of lake Mogilnoye // *Arch. Hydrobiol.* 1978. V. 81. P. 475–492.
- Krasnova E., Voronov D., Frolova N., Pantyulin A., Samsonov T. Salt lakes separated from the White Sea // *EARSeL eProceedings*. 2015. V. 14. P. 8–22.
- Manske A.K., Glaeser J., Kuypers M.M.M., Overmann J. Physiology and phylogeny of green sulfur bacteria forming a monospecific phototrophic assemblage at a depth of 100 meters in the Black Sea // *Appl. Environ. Microbiol.* 2005. V. 71. P. 8049–8060.
- Montesinos E., Guerrero R., Abella C., Esteve I. Ecology and physiology of the competition for light between *Chlorobium limicola* and *Chlorobium paeobacteroides* in natural habitats // *Appl. Environ. Microbiol.* 1983. V. 46. P. 1008.
- Nikitina A.S., Kharlampieva D.D., Babenko V.V., Shirokov D.A., Vakhitova M.T., Manolov A.I., Shkoporov A.N., Taraskina A.E., Manuvera V.A., Lazarev V.N., Kostryukova E.S. Complete

genome sequence of an enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* clinical isolate // Genome Announc. 2015. V. 3. doi 10.1128/genomeA.00450-15

Overmann J., Tilzer M.M. Control of primary productivity and the significance of photosynthetic bacteria in a meromictic kettle lake Mittlerer Buchensee, West-Germany // Aquatic Sci. 1989. V. 51. P. 4.

Overmann J., Beatty J.T., Hall K.J., Pfennig N., Northcote T.G. Characterization of a dense, purple sulfur bacterial layer in a meromictic salt lake // Limnol. Oceanogr. 1991. V. 36. P. 846–859.

Overmann J., Beatty J.T., Hall K.J. Purple sulfur bacteria control the growth of aerobic heterotrophic bacterioplankton in a meromictic salt lake // Appl. Environ. Microbiol. 1996. V. 62. P. 3251–3258.

Pfennig N., Lippert K.D. Über das Vitamin B₁₂-Bedürfnis phototropher Schwefelbakterien // Arch. Mikrobiol. 1966. V. 55. P. 245–256.

Savvichev A., Babenko V., Lunina O., Letarova M., Boldyreva D., Weslopolova E., Demidenko N., Kokryatskaya N., Krasnova E., Gaysin V., Kostryukova E., Gorlenko V., Letarov A.

Sharp water column stratification with an extremely dense microbial population in a small meromictic lake Trekhtsvetnoe // Environmental Microbiology and Environmental Microbiology Reports. 2018. In press.

Smith J.H.C., Benitez A. Chlorophylls: analysis in plant materials // Moderne Methoden der Pflanzenanalyse / Ed. Peach K., Tracey M.V. Berlin–Göttingen–Heidelberg: Springer, 1955. V. 4. P. 142–196.

Thiel V., Tank M., Neulinger S.C., Gehrman L., Dorador C., Imhoff J.F. Unique communities of anoxygenic phototrophic bacteria in saline lakes of Salar de Atacama (Chile) // FEMS Microbiol. Ecol. 2010. V. 74. P. 510–522.

Van Gernerden H., Mas J. Ecology of phototrophic sulfur bacteria // Anoxygenic Photosynthetic Bacteria / Eds. Blankenship R.E., Madigan M.T., Bauer C.E. New York: Kluwer Academic, 1995. P. 49–85.

Vila X., Guyoneaud R., Cristina X.P., Figueras J.B., Abella C.A. Green sulfur bacteria from hypersaline Chiprana Lake (Monegros, Spain): habitat description and phylogenetic relationship of isolated strains // Photosynth. Res. 2002. V. 71. P. 165–172.

Seasonal Variations in Community Structure of Anoxygenic Phototrophic Bacteria from the Meromictic Lake Trekhtsvetnoe (Kandalaksha Bay, White Sea)

O. N. Lunina^{1,*}, A. S. Savvichev¹, V. V. Babenko², D. I. Boldyreva², B. B. Kuznetsov^{3,†}, T. V. Kolganova³, E. D. Krasnova⁴, N. M. Kokryatskaya⁵, E. F. Veslopolova¹, D. A. Voronov^{6,7}, N. A. Demidenko⁸, M. A. Letarova¹, A. V. Letarov¹, and V. M. Gorlenko¹

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

²Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, Federal Medical Biological Agency, Moscow, 119435 Russia

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

⁴Pertsov Whit Sea Biological Station, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

⁵Lavrov Federal Research Center for Comprehensive Arctic Studies, Russian Academy of Sciences, Arkhangelsk, 163000 Russia

⁶Kharkevich Institute for Information Transmission Problems, Russian Academy of Sciences, Moscow, 127994 Russia

⁷Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119992 Russia

⁸Zubov State Oceanographical Institute, Moscow, 119034 Russia

*e-mail: onlun@yandex.ru

Received June 27, 2018

Revised August 27, 2018

Accepted October 2, 2018

Abstract—The community of anoxygenic phototrophic bacteria (APB) from the water column of the meromictic Lake Trekhtsvetnoe (Kandalaksha Bay, White Sea, Russia) was studied in March 2012 and 2013 and in September 2013 and 2014. The community structure below the chemocline was shown to restore during three years after partial mixing resulting from seawater admixture into the lake in autumn 2011; a dense layer (at least 10^8 cells mL⁻¹) of green-colored (g/c) sulfur bacteria (GSB) was formed. During winter, development of low numbers of brown colored (b/c) GSB was observed in the upper layer of green water. During summer seasons, b/c GSB were found to be located in the oxic zone above the green water layer, which was unusual for these organisms. The APB community was found to contain purple bacteria. Four APB strains were isolated from the upper part of the sulfide zone. The b/c and g/c GSB strains were phylogenetically close to each other and to the type species *Chlorobium phaeovibrioides* DSM 265 (99% similarity gene sequences). One strain of purple bacteria was phylogenetically related to the brackish sulfur bacteria *Thiocapsa marina*, while the other was related to freshwater bacteria *Rhodospseudomonas palustris*. The strains of sulfur bacteria were phylogenetically close to the chemocline bacteria from the stratified Lake Kislo-Sladkoe, also located in the coastal zone of the Kandalaksha Bay, White Sea.

Keywords: polar ecosystems, White Sea, stratified and meromictic lakes, anoxygenic phototrophic bacterial communities, phylogeny of the green and brown forms of *Chlorobium phaeovibrioides* sulfur bacteria

НОВЫЙ ШТАММ *ENSIFER ADHAERENS* M1 СПОСОБЕН
К ТРАНСФОРМАЦИИ ПЕРФТОРКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ© 2019 г. С. П. Четвериков^{а, *}, О. Н. Логинов^а^аУфимский Институт биологии Уфимского федерального исследовательского центра
Российской академии наук, Уфа, Россия

*e-mail: che-kov@mail.ru

Поступила в редакцию 24.04.2018 г.

После доработки 05.06.2018 г.

Принята к публикации 02.10.2018 г.

DOI: 10.1134/S0026365618060083

Перфторкарбонные кислоты внесены в Приложение В Стокгольмской конвенции по стойким органическим загрязняющим веществам, что предусматривает принятие мер по минимизации и, по возможности, прекращению их производства и использования, с последующим уничтожением (Report..., 2009). Основные значимые представители этого класса соединений – перфтороктановая кислота (ПФОК) и перфтороктансульфонат (ПФОС) – это высокостабильные синтетические химические соединения, широко используемые в производстве фторполимеров, пестицидов и, вследствие их поверхностно-активных свойств, в качестве компонентов противопожарных пен. ПФОК и ПФОС крайне устойчивы к биоразложению и детектируются во многих объектах окружающей среды и живых организмах (Yamashita et al., 2005; Tao et al., 2006; Betts, 2007; Anderson et al., 2008). В настоящее время в литературе имеются лишь единичные сообщения об утилизации ПФОК и ПФОС бактериями рода *Pseudomonas* без раскрытия особенностей биодеструкции (Kwon et al., 2014; Yi et al., 2016), хотя представители других типов фторорганических соединений, такие как фторбензол, перфторбифенилы и пр. биodeградебельны (Carvalho et al., 2005; Hughes et al., 2011; Amorim et al., 2013).

В настоящей работе представлены результаты исследования физиолого-биохимических свойств и таксономического положения штамма *Ensifer adhaerens* M1, обладающего уникальной способностью к использованию ПФОК и ПФОС в качестве единственного источника углерода и энергии.

Штамм *E. adhaerens* M1 был выделен из почвы, отобранной с территории хранения и испытания средств тушения пожаров (Мальдивская Республика), методом накопительной культуры. При

выделении бактерий в качестве единственного источника углерода и энергии использовали ПФОС (1.0 г/л). Чистую культуру культивировали с использованием минеральной среды Раймонда (Raymond, 1961) с ПФОК или ПФОС (1.0 г/л) при 26°C и 160 об./мин. Рост штамма оценивали по оптической плотности (ОП₅₉₀) клеточной суспензии на спектрофотометре СФ-56 (Россия).

Характеристику чистой культуры проводили по культурально-морфологическим и физиолого-биохимическим признакам, используя общепринятые руководства (Методы ..., 1984, Определитель ..., 1997). Выделение и очистку ДНК, определение молярного % Г + Ц, амплификацию, секвенирование гена 16S рРНК, филогенетический анализ осуществляли общепринятыми методами. Определенная для штамма *E. adhaerens* M1 последовательность фрагмента гена длиной 1319 пар нуклеотидов депонирована в GenBank под номером MN141439.

Оценивали содержание ПФОК и ПФОС в среде и идентифицировали продукты их биотрансформации на жидкостном тандемном хромато-масс-спектрометре LCMS-IT-TOF (“Shimadzu”, Япония) в ЦКП “БиоАналит” УИБ УФИЦ РАН в ультрафильтратах (≤3 кДа) культуральных жидкостей (КЖ). Хроматографическое разделение проводили в изократическом режиме на колонке Shim-pak XR-ODS (75 × 2.0 мм) (“Shimadzu”, Япония) при соотношении растворителей 5 мМ ацетат аммония в воде–ацетонитрил = 56 : 44; скорость элюирования 0.2 мл/мин. Концентрацию фторид-иона в среде измеряли при помощи фторид-селективного электрода ЭЛИС-131F (Россия).

Клетки штамма M1 – граммотрицательные подвижные палочки размером 0.7–1.0 × 1.0–2.0 мкм;

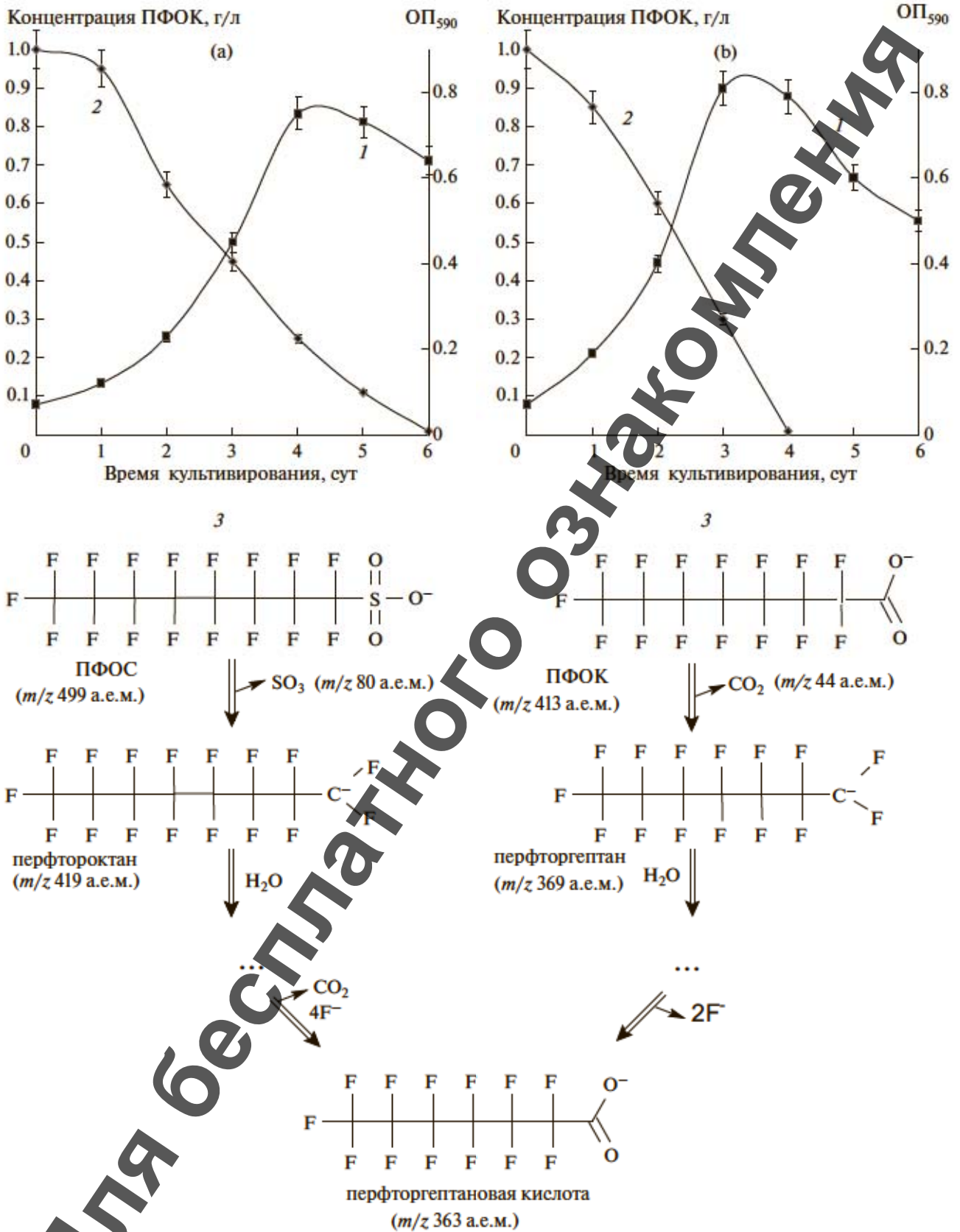


Рис. 1. Динамика роста (1) штамма *Ensifer adhaerens* M1 и изменения концентрации перфторкарбоновой кислоты (2) со схемой ее бактериальной деструкции (3) при культивировании в жидкой минеральной среде: а – с ПФОС; б – с ПФОК.

имеют пучок жгутиков, неспорообразующие. На МПА колонии бело-кремовые, круглые, выпуклые, прозрачные, слизистые, диаметром 2–3 мм. Метаболизм дыхательный. Штамм М1 – каталазо- и оксидазоположительный, восстанавливал нитрат и нитрит, не гидролизировал казеин, крахмал. Культура росла при температуре 10–37°C (оптимум 26–28°C), pH 6.0–8.0 и концентрации NaCl до 2%.

Культура использовала в качестве единственного источника углерода D-глюкозу, лактозу, мальтозу, сахарозу, маннит, сорбит, D-арабинозу, D-ксилозу, D-маннозу, D-галактозу, D-рамнозу, сукцинат, малат, цитрат, 2-кетоглюконат, L-аланин, L-аспарагин, L-глутамин, L-глутаминовую кислоту.

Филогенетически выявлена принадлежность штамма М1 к виду *Ensifer adhaerens*, уровень сходства гена 16S рРНК с типовым штаммом *E. adhaerens* LMG 20216 составил 99.85%. Содержание Г + Ц в ДНК 62.2 мол. % – типичное для бактерий данного вида.

Штамм М1 активно рос на минеральных средах, содержащих в качестве единственного источника углерода перфторкарбоновые кислоты (рисунок 1), достигая максимального показателя оптической плотности КЖ через 4 сут при культивировании на ПФОС с его полной трансформацией за 6 сут и через 3 сут выращивания на ПФОК с его разложением за 4 сут. Конверсия перфторированных субстратов сопровождалась выходом в среду свободных ионов фтора, а начало высвобождения коррелировало с началом линейного снижения их концентрации в среде.

При хроматографическом анализе с масс-спектрометрией в исходной культуральной жидкости (КЖ) наблюдали диссоциированные кислотные ионы ПФОС и ПФОК (молекулярные ионы с отношением m/z 499 а.е.м. и 413 а.е.м. соответственно) характерные для анионных перфторсоединений. Через 1 сут в варианте с ПФОС детектировали наличие компонента, молекулярному иону которого соответствует m/z 419 а.е.м., что возможно в результате прохождения процесса монооксигеназного удаления из ПФОС сульфонатой группы (m/z 80 а.е.м.) в виде сульфита, который способен метаболизироваться в условиях голодания. Вероятно, с этим связана более низкая скорость роста на этом субстрате. Через 3 сут культивирования помимо компонентов с m/z 499 и 419 а.е.м. в ультрафильтрате обнаруживалось соединение, молекулярный ион которого имел соотношение m/z 363 а.е.м., отсутствовавшее первоначально в среде. В последующие сутки концентрация этого компо-

нента в КЖ увеличивалась, а соединения с m/z 499 и 419 а.е.м. через 6 сут культивирования в среде не детектировались. Соединение с отношением m/z , равным 363 а.е.м., по масс-спектрам MS^1 и MS^2 идентифицировали как перфторгептановую кислоту с характерным прекурсор-ионом (m/z 363 а.е.м.) в масс-спектре MS^1 , фрагментирующемся с образованием продукт-иона с m/z 319 а.е.м. в масс-спектре MS^2 .

В варианте же с ПФОК через 1 сут обнаруживалось соединение, молекулярному иону которого соответствует m/z 369 а.е.м., что возможно в результате реакции элиминирования диоксида углерода (m/z 44 а.е.м.) из карбоксильной группы. В дальнейшем обнаруженное соединение полностью было трансформировано также в перфторгептановую кислоту.

Таким образом, в результате работы выделен и идентифицирован штамм *Ensifer adhaerens* М1, обладающий уникальной способностью использовать перфторкарбоновые кислоты, в частности, ПФОК и ПФОС, в качестве единственного источника углерода и энергии с образованием такого метаболита деградации, как перфторгептановая кислота, выделяя в среду свободные фторид-ионы, являющиеся индикатором частичной минерализации, и, возможно, оказывающие ингибирующий эффект на дальнейшую деструкцию промежуточных фторированных соединений.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Методы общей бактериологии. В 3 т. Под ред. Герхардт Ф.М.: Мир, 1984. Т. 1–3.
- Определитель бактерий Берджи. Под ред. Хоулт Дж., Криг Н., Снит П., Стейли Дж., Уильямс С. М.: Мир, 1997. Т. 1, 2.
- Amorim C.L., Carvalho M.F., Afonso C.M.M., Castro P.M.L.* Biodegradation of fluoroanilines by the wild strain *Labrys portucalensis* // Int. Biodeter. Biodegr. 2013. V. 80. P. 10–15.
- Anderson M.E., Butenhof J.L., Chang S.* Perfluoroalkyl acids and related chemistries – toxicokinetics and modes of action // Toxicol. Sci. 2008. V. 102. P. 3–14.
- Betts K.* PFOS and PFOA in humans: new study links prenatal exposure to lower birth weight // Environ. Health Perspectives. 2007. V. 115. P. 550.
- Carvalho M.F., Ferreira J.R., Pacheco C.C., De Marco P., Castro P.M.L.* Isolation and properties of a pure bacterial strain capable of fluorobenzene degradation as sole carbon and energy source // Environ. Microbiol. 2005. V. 7. P. 294–298.
- Hughes D., Clark B.R., Murphy C.D.* Biodegradation of polyfluorinated biphenyl in bacteria // Biodegradation. 2011. V. 22. P. 741–749.
- Kwon B.G., Lim H.J., Na S.H., Choi B.I., Shin D.S., Chung S.Y.* Biodegradation of perfluorooctanesulfonate (PFOS) as an emerging contaminant // Chemosphere. 2014. V. 109. P. 221–225.

Raymond R.L. Microbial oxidation of *n*-paraffinic hydrocarbons // *Develop. Industr. Microbiol.* 1961. V. 2. P. 23–32.

Report of the Conference of the Parties of the Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants on the work of its fourth meeting, 4–8 May 2009 // *UNEP/POPS/COP.4/38*. Geneva: Stockholm Convention Secretariat, 2009. P. 66–69.

Tao L., Kannan K., Kajiwara N., Costa M., Fillmann G., Takahashi S., Tanabe S. Perfluorooctanesulfonate and related fluorochemicals in albatrosses, elephant seals, pen-

guins, and polar skuas from the Southern Ocean // *Environ. Science Technol.* 2006. V. 40. P. 7642–7648.

Yamashita N., Kannan K., Taniyasu S., Horii Yu., Petrick G., Gamo T. A global survey of perfluorinated acids in oceans // *Marine Pollut. Bull.* 2005. V. 51. P. 658–668.

Yi L.B., Chai L.Y., Xie Y., Peng Q.J., Peng Q.Z. Isolation, identification, and degradation performance of a PFOA-degrading strain // *Genet. Mol. Res.* 2016. V. 15. doi 10.4238/gmr.15028043

Для бесплатного ознакомления

ВЛИЯНИЕ ТРИСПОРОИДОВ НА ЛИПОГЕНЕЗ Т (–) ШТАММА МИЦЕЛИАЛЬНОГО ГРИБА *BLAKESLEA TRISPORA*

© 2019 г. О. А. Данилова^а, *, В. М. Терёшина^а

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

*e-mail: noitcelfer@mail.ru

Поступила в редакцию 28.08.2018 г.

После доработки 03.09.2018 г.

Принята к публикации 02.10.2018 г.

Ключевые слова: *Blakeslea trispora*, триспоронды, триспоровые кислоты, липогенез

DOI: 10.1134/S0026365619010038

Гетероталлический мукооровый гриб *Blakeslea trispora* используется в биотехнологии в качестве суперпродукта β-каротина и ликопина, которые применяются в медицине, пищевой промышленности и косметологии. При половом взаимодействии (+) и (–) штаммов образуются триспоронды, триспоровые кислоты и их нейтральные предшественники – триспорины и триспоролы. Триспоровые кислоты являются авторегуляторными сигнальными молекулами, которые осуществляют коммуникацию между (+) и (–) штаммами гриба (Schachtschabel et al., 2008). Посредством индукции фитоинсинтазы и ликопинциклазы, триспоровые кислоты стимулируют синтез каротиноидов и других изопреноидов (Shmidt et al., 2005) преимущественно у (–) штамма, который, в отличие от (+) штамма, не способен образовывать триспоровые кислоты в отсутствие полового партнера (Schachtschabel et al., 2008).

Нейтральные липиды – эфиры стерина, три- и диацилглицерина – являются основными компонентами липидных глобул, в которых локализованы липофильные каротиноиды (Murphy, Vance, 1999), и могут синтезироваться *de novo* или поступать в клетку экзогенно. β-Каротин и триацилглицерина имеют общего предшественника, но синтезируются в разных компартментах, что указывает на независимую регуляцию их синтеза (Kuzina, 2007). Известно, что растительные масла (особенно масла с высокой степенью ненасыщенности) стимулируют каротиногенез у *B. trispora* (Верещагина и соавт., 2010). В совокупности существующие данные указывают на тесную взаимосвязь между каротино- и липогенезом.

Целью настоящей работы было изучение влияния триспоровых кислот и их нейтральных предшественников, триспоринов и триспоролов, на

синтез нейтральных и мембранных липидов Т (–) штамма *B. trispora*.

Работу проводили с Т (–) штаммом *B. trispora* из коллекции Института микробиологии им. С.Н. Виноградского. Действие триспорондов на липогенез Т (–) штамма *B. trispora* изучали радиоизотопным методом. Инокулят выращивали, как описано ранее (Верещагина и соавт., 2012), затем в количестве 20% (об.) вносили в мучную среду и выращивали еще 24 ч. Полученную культуру по 30 мл переносили в колбы емкостью 200 мл. В опытные варианты вносили растворы триспорондов в этаноле, которые получали как описано ранее (Верещагина и соавт., 2012), из расчета 50 мкг/мл среды, а в контроль – соответствующее количество этанола и выращивали в течение 3 ч. Затем в колбы вносили меченый (¹⁴C)-ацетат натрия из расчета 16 кБк/мл и культивировали еще 3 ч. Анализ каротиноидов проводили спектрофотометрически (Терёшина и соавт., 1994). Анализ липидов для определения включения (¹⁴C)-ацетата натрия в индивидуальные фракции проводили в соответствии с описанным в предыдущей работе (Терёшина с соавт., 2013). Опыты проводили в трехкратной повторности, в сообщении представлены данные типичного опыта, отражающие общую закономерность. Разброс результатов не превышал 10%.

В результате исследования показано, что нейтральные предшественники триспоровых кислот, триспорины и триспоролы, не оказывали заметного влияния на биосинтез нейтральных липидов (табл. 1). Триспоровые кислоты, напротив, обладали выраженным действием, стимулируя синтез диацилглицерина, стерина и триацилглицерина в 1.5–2 раза. При этом ни триспоровые кислоты, ни триспорины и триспоролы не оказывали влияния на включение метки во фракцию свободных жирных кислот.

Таблица 1. Влияние триспоридов на включение (^{14}C)-ацетата в нейтральные и мембранные липиды и каротиноиды *B. trispora* (имп./мин/г сухой биомассы $\times 10^3$)

Фракция		Контроль	Триспорины и триспоролы	Триспоровые кислоты
Нейтральные липиды	Диацилглицерины	63.9	61.1	29.3
	Стерины	348.5	371.5	507.8
	Свободные жирные кислоты	62.5	53.9	79.7
	Триацилглицерины	706.6	733.5	1277.7
Мембранные липиды	Фосфатидилэтаноламин	203.4	243.8	256.8
	Фосфатидилхолин	256.3	305.4	276.8
	Кардиолипин	54.7	52.9	57.9
	Фосфатидная кислота	70.6	75.7	78.7
	Сфинголипиды	57.2	88.4	81.2
	Фосфатидилсерин	71.4	92.4	41.2
	Фосфатидилинозитол	58.6	75.0	37.2
	Лизофосфатидилхолин	40.1	Следы	Следы
Каротиноиды		60.7	50.0	791.1

Интенсификация биосинтеза нейтральных липидов под действием триспоровых кислот сопровождалась выраженным каротиногенным эффектом: включение метки в каротиноиды возрастало в 13 раз, тогда как фракция триспоринов и триспоролов подобным действием не обладала.

Изучение действия триспоридов на синтез полярных липидов – основных компонентов мембран – показало, что включение метки в них изменялось слабо, в отличие от нейтральных липидов. Так, триспоровые кислоты и их нейтральные предшественники не оказывали заметного влияния на синтез фосфатидилэтаноламинов, фосфатидилхолинов, кардиолипинов и фосфатидных кислот, но немного стимулировали синтез сфинголипидов (в 1.5 раза). Нужно отметить, что в присутствии триспоринов и триспоролов уровень синтеза фосфатидилсеринов и фосфатидилинозитолов слабо возрастал (на 30%), а при введении триспоровых кислот падал в 1.6–1.7 раза.

Таким образом, впервые показано, что триспоровые кислоты принимают участие в регуляции липогенеза, однако их действие на биосинтез нейтральных и мембранных липидов различно. Установлено стимулирующее действие триспоровых кислот на биосинтез стерина, а также триацилглицеринов и диацилглицеринов, являющихся основными компонентами липидных глобул, тогда как заметного влияния на синтез фосфолипидов не выявлено. В отличие от триспоровых кислот, триспорины и триспоролы не оказывают

значительного влияния на биосинтез ни нейтральных, ни мембранных липидов. При этом триспоровые кислоты, в отличие от их нейтральных предшественников, обладают сильным каротиногенным эффектом.

Полученные результаты подтверждают предположение о тесной взаимосвязи липо- и каротиногенеза и указывают на новую функцию триспоровых кислот, заключающуюся в их способности стимулировать не только каротиногенез, но и синтез нейтральных липидов – диацилглицеринов, триацилглицеринов и стерина.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Верещagina O.A., Меморская A.C., Кочкина G.A., Терешина B.M. Триспориды и каротиноиды у штаммов *Blakeslea trispora* с различной способностью к зиготообразованию // Микробиология. 2012. Т. 81. № 5. С. 570–577.
- Vereshchagina O.A., Memorskaya A.S., Kochkina G.A., Tereshina V.M. Trisporoids and carotenoids in *Blakeslea trispora* strains differing in capacity for zygote formation // Microbiology (Moscow). 2012. V. 81. P. 517–525.
- Верещagina O.A., Меморская A.C., Терешина B.M. Роль экзогенных липидов в ликопиногенезе мукового гриба *Blakeslea trispora* // Микробиология. 2010. Т. 79. № 5. С. 605–613.
- Vereshchagina O.A., Memorskaya A.S., Tereshina V.M. The role of exogenous lipids in lycopene synthesis in the mucoraceous fungus *Blakeslea trispora* // Microbiology (Moscow). 2010. V. 79. P. 593–601.

- Терёшина В.М., Меморская А.С., Котлова Е.Р. Обмен липидов у *Aspergillus niger* в условиях теплового шока // Микробиология. 2013. Т. 82. № 5. С. 528–533.
- Tereshina V.M., Memorskaya A.S., Kotlova E.R. Lipid metabolism in *Aspergillus niger* under conditions of heat shock // Microbiology (Moscow). 2013. V. 82. P. 542–546.
- Терёшина В.М., Меморская А.С., Феофилова Е.П. Экспресс-метод определения содержания ликопина и β-каротина // Микробиология. 1994. Т. 63. № 6. С. 1111–1116.
- Kuzina V., Cerdá-Olmedo E. Ubiquinone and carotene production in the Mucorales *Blakeslea* and *Phycomyces* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2007. V. 76. P. 991–999.
- Murphy D.J., Vance J. Mechanisms of lipid-body formation // Trends Biochem. Sci. 1999. V. 24. P. 109–115.
- Shmidt A., Heinecamp T., Matuschek M., Liebmann B., Bollschweiler C., Brakhage A.A. Analysis of mating-dependent transcription of *Blakeslea trispora* carotenoid biosynthesis genes *carB* and *carRA* by quantitative real-time PCR // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2005. V. 67. P. 549–555.
- Schachtschabel D., David A., Menzel K., Schimek C., Wöstemeyer J., Boland W. Cooperative biosynthesis of trisporoids by the (+) and (–) mating types of the zygomycete *Blakeslea trispora* // ChemBioChem. 2008. V. 9. P. 3004–3012.

Для бесплатного ознакомления

СЕРООКИСЛЯЮЩИЕ БАКТЕРИИ ДОМИНИРУЮТ В ВОДЕ ЗАТОПЛЕННОЙ УГОЛЬНОЙ ШАХТЫ В КУЗБАССЕ

© 2019 г. В. В. Кадников^а, А. В. Марданов^а, А. В. Белецкий^а, Д. В. Андиферов^б,
А. А. Ковалева^б, О. В. Карначук^б, Н. В. Равин^а, *

^аИнститут биоинженерии, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, 119071, Россия

^бЛаборатория биохимии и молекулярной биологии, Томский государственный университет, Томск, 634050, Россия

*e-mail: nravin@biengi.ac.ru

Поступила в редакцию 26.09.2018 г.

После доработки 01.10.2018 г.

Принята к публикации 02.10.2018 г.

DOI: 10.1134/S0026365619010117

Традиционным способом консервирования угольных шахт после выработки пластов является их затопление. Это наиболее экономичный способ сохранения физической целостности всех подземных конструкций. Затопление существенно меняет физико-химические параметры экосистемы за счет создания анаэробных условий. Микробные консорциумы, формирующиеся в подземных горизонтах затопленных шахт, изучены недостаточно. Целью работы являлся молекулярный анализ микробного сообщества воды затопленной угольной шахты в Кузбассе.

Отбор образцов проводили из дренажной скважины, пробуренной в 1998 г. для контроля уровня воды в закрытой в 1997 г. и в настоящее время затопленной шахте «Северная», расположенной в непосредственной близости от г. Кемерово, Российская Федерация (45 м вниз по течению от моста через реку Томь). Вода из шахты поступает самоизливом со средней скоростью 166–170 м³/ч через скважину глубиной 260 м. Артезианский характер скважины исключает возможность загрязнения проб воды микроорганизмами, обитающими в поверхностных горизонтах. Глубина подземных горизонтов шахты, разрабатывавшей Кемеровский, Волковский и Владимировский пласты Балахонской свиты, составляла около 360 м. Проба воды из скважины была обозначена как Ку5. Вода, отобранная непосредственно у устья скважины в июле 2017 г., имела температуру 12,1 °С и нейтральный pH (табл. 1). Отрицательный окислительно-восстановительный потенциал (–174 мВ) указывает на анаэробные условия. Вода содержит 22,5 мг/л сульфата и растворенный сероводород (табл. 1). В отличие от дренажных вод шахт по добыче металлов (Kaksonen et al., 2008; Кадников и соавт., 2016), содержание растворенного железа и других металлов не-

высоко (табл. 1), что свидетельствует об отсутствии активных окислительных процессов.

Для сбора биомассы микроорганизмов 25 л воды пропускали через фильтры с диаметром пор 0,2 мкм. Фильтры гомогенизировали, растирая с жидким азотом, препарат метагеномной ДНК выделяли методом, основанным на лизисе клеток с последующей обработкой детергентом СТАВ (Wilson, 1987). Всего было выделено около 0,5 мкг ДНК. Для ПЦР-амплификации фрагмента гена 16S рРНК, включающего участки V3–V6, использовали «универсальные» праймеры U341F (5'-CCT ACG GGR SGC AGC AG-3') и PRK806R (5'-GGA STA CYV GGG TAT STA AT-3'). ПЦР-фрагменты генов 16S рРНК секвенировали на геномном анализаторе GS FLX («Roche», Швейцария) по протоколу Titanium. Для последующего анализа отбирали чтения, содержащие праймер U341F, и обрезали их до длины 250 нт. Последовательности низкого качества, а также встречающиеся только один раз (синглтоны) удаляли с помощью Usearch (Edgar, 2010). Кластеризацию в оперативные таксономические единицы (OTU) и удаление химерных последовательностей проводили с помощью Usearch. OTU определяли на уровне 97% идентичности последовательностей (всего 12155 чтений). Таксономическую идентификацию OTU проводили в результате их сравнения с базой данных 16S рРНК Silva. Также для классификации OTU использовали RDP Classifier (Cole et al., 2009) и поиск близких последовательностей в GenBank по протоколу BLASTN. При обнаружении последовательности, имеющей более 95% сходства с геном 16S рРНК описанного микроорганизма, OTU относили к соответствующему роду. Всего было классифицировано 271 OTU, к которым относились 11563 последовательности генов 16S рРНК.

Таблица 1. Физико-химические характеристики воды скважины Ku5

Параметр	Значение*
<i>T</i>	12.1°C
pH	7.87
Eh	-174 mV
Щелочность	17.6 mEq/л
Na	402 мг/л
Ca	28.7 мг/л
Sr	1.51 мг/л
Si	7.40 мг/л
K	2.71 мг/л
V	0.67 мг/л
Ba	1.29 мг/л
Mg	12.1 мг/л
Fe	0.18 мг/л
Li	0.48 мг/л
Mn	0.14 мг/л
Cr	0.03 мг/л
Cu	<0.001 мг/л
Al	0.02 мг/л
As	0.002 мг/л
Cl ⁻	293.2 мг/л
F ⁻	<0.05 мг/л
SO ₄ ²⁻	22.5 мг/л
NO ₃ ⁻	<0.05 мг/л**
H ₂ S	5.4 мг/л

* Концентрация элементов определена методом ICP-MS.

** Концентрация нитрата в январе 2017 г. составила 6,7 мг/л.

К бактериям было отнесено 74% всех классифицированных последовательностей генов 16S рРНК, остальные представляли археи (табл. 2). Большинство бактерий составили протеобактерии классов гамма (39.12% от общего числа последовательностей генов 16S рРНК) и эпсилон (18.65%), филогенетически близкие к известным организмам. Среди гаммапротеобактерий были обнаружены представители родов *Thiovirga* (18.52%), *Thiothrix* (9.52%) и *Thiomicrothabds* (2.25%). Культивируемые представители родов *Thiovirga* и *Thiomicrothabds* являются хемолитоавтотрофами, аэробно окисляющими восстановленные соединения серы (Ito et al., 2005; Boden et al., 2017), а *Thiomicrothabds hydrogeniphila* – также и водород (Boden et al., 2017). Окислять восстановленные соединения серы также способны и бактерии рода *Thiothrix*, часто встречающиеся в виде нитчатых биопленок в проточной воде, содержащей растворенный сульфид (Larkin, Strohl,

1983). Эти бактерии растут в аэробных или микроаэробных условиях и могут быть как автотрофами, так и хемоорганотрофами (Howard et al., 1999). Помимо *Thiovirga*, к семейству *Halothiobacillaceae* автотрофных сероокисляющих бактерий (Boden, 2017) было отнесено еще 7.84% последовательностей генов 16S рРНК, не классифицированных на уровне рода. Вторая основная группа бактерий, бетапротеобактерии, были представлены родами *Sulfurovum* (11.09%) и *Sulfuricurvum* (6.33%). Культивируемые представители этих родов являются хемолитоавтотрофами, окисляющими восстановленные соединения серы, используя в качестве акцептора электронов кислород или нитрат (Inagaki et al., 2004; Kodama et al., 2004). Окислять восстановленные соединения серы, возможно, также могут и обнаруженные представители некультивируемого филума Omnitrophica (OP3) составляющие 3.92% сообщества. Описанный на геномном уровне представитель этого филума “*Candidatus Omnitrophus magneticus*” SKK-01 является магнетотактической бактерией и, вероятно, может окислять серу в анаэробных условиях, используя в качестве акцептора электронов железо (Kolinko et al., 2012). Присутствие в воде организмов, способных к окислению восстановленных соединений серы с использованием альтернативных кислороду акцепторов электронов, согласуется с анаэробными условиями экосистемы.

Почти все обнаруженные археи представляли некультивируемые линии, которые удалось классифицировать только на уровне таксонов высокого уровня. Большинство архей (14.48% всех последовательностей) представляли недавно описанный суперфилум DPANN (Rinke et al., 2013; Castelle et al., 2015). Археи этой группы имеют небольшие размеры клеток и генома, лишены многих биосинтетических путей и рассматриваются как облигатные паразиты или симбионты (Castelle et al., 2015). Около 3.23% всех последовательностей генов 16S рРНК были отнесены к филуму *Euryarchaeota*. Среди эуриархей были обнаружены органотрофы группы Marine Benthic Group D (0.7%), метилотрофные метаногены порядка *Methanomassiliicoccales* (0.59%) (Paul et al., 2012) и “*Candidatus Methanoperedens*” (0.86%), – метанотрофные археи группы ANME-2d, анаэробно окисляющие метан и восстанавливающие нитрат или Fe(III) (Hagoon et al., 2013; Cai et al., 2018).

Несмотря на значительную долю некультивируемых микроорганизмов с неизвестным метаболизмом, полученные результаты позволяют сделать ряд предположений о функционировании исследуемого микробного сообщества. Присутствие в качестве доминирующих групп хемолитоавтотрофных сероокисляющих бактерий указывает на то, что именно этот процесс обеспечивает продукцию органического вещества. Необходи-

Таблица 2. Состав микробного сообщества подземных термальных вод скважины Ku5

Таксономическая группа	Доля в сообществе (% последовательностей генов 16S рРНК)
Бактерии:	74.18
<i>Gammaproteobacteria</i>	39.12
<i>Epsilonproteobacteria</i>	18.65
<i>Omnitrophica</i> (OP3)	3.92
Группа CPR**	3.22
<i>Chloroflexi</i>	1.77
<i>Actinobacteria</i>	0.71
<i>Betaproteobacteria</i>	0.49
<i>Cyanobacteria</i>	0.49
<i>Dependentiae</i>	0.48
<i>Chlamydiae</i>	0.47
<i>Nitrospirae</i>	0.42
Другие линии*	0.98
Неклассифицируемые бактерии	3.46
Археи:	25.82
DPANN суперфилум	14.48
<i>Euryarchaeota</i> (<i>Methanomicrobia</i>)	1.24
<i>Euryarchaeota</i> (MBGD)	0.70
<i>Euryarchaeota</i> (<i>Methanomassiliicoccales</i>)	0.59
<i>Euryarchaeota</i> (прочие)	0.70
<i>Bathyarchaeota</i>	0.47
Неклассифицируемые археи	7.64

* С долями менее 0.15%.

** Candidate phyla radiation.

мый кислород, возможно, поступает в подземный водоносный горизонт с фильтрующимися через горные породы поверхностными водами. В локальных анаэробных микрониахах могут проходить процессы метаногенеза и анаэробного окисления метана.

Остается загадкой источник восстановленных соединений серы, в частности сероводорода, в воде затопленной угольной шахты. В литературе нет свидетельств о возможном геологическом источнике сульфида в углях этой свиты. Высокое содержание сероводорода в воде может быть косвенным свидетельством процессов микробной сульфатредукции. Однако низкое содержание железа в воде свидетельствует об отсутствии развитых процессов окисления пирита и, следовательно, об отсутствии постоянного источника сульфата в воде. В то же время, в пробе воды мы не обнаружили организмы с известной способностью к диссимиляционному восстановлению сульфата. Решение этого вопроса требует дальнейших исследований, прежде всего по определению изотопного состава сульфатов и сероводорода.

Интересно, что наряду с сероокисляющими микроорганизмами значительную долю микробного сообщества составляют бактерии и археи, предположительно являющиеся паразитами или симбионтами других микроорганизмов (Brown et al. 2015; Castelle et al., 2015), – бактерии группы Candidate phyla radiation, доля которых составляет 3.22%, и археи суперфилума DPANN (14.48%). Возможно, именно они составляют гетеротрофную часть сообщества, потребляющую органику, которая могла бы ингибировать развитие хемолютоавтотрофов.

Дальнейшее изучение этого микробного сообщества с использованием метагеномных подходов, культивирования и измерения скорости микробных процессов позволит лучше понять его состав и функциональную роль отдельных групп входящих в него микроорганизмов.

Работы по молекулярному анализу микробного сообщества выполнены с использованием научного оборудования ЦКП “Биоинженерия” и поддержаны Российским научным фондом (грант № 14-14-01016). Работы по отбору проб,

определению физико-химических параметров воды и элементному анализу поддержаны РФФИ (грант № 18-34-00472).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Кадников В.В., Ивасенко Д.А., Белецкий А.В., Марданов А.В., Данилова Э.В., Пименов Н.В., Карначук О.В., Равин Н.В. Влияние содержания металлов на состав микробных сообществ кислых дренажных вод месторождения полиметаллических руд // Микробиология. 2016. Т. 85. № 6. С. 732–739.
- Kadnikov V.V., Beletsky A.V., Mardanov A.V., Ravin N.V., Ivasenko D.A., Karnachuk O.V., Danilova E.V., Pimenov N.V. Effect of metal concentration on the microbial community in acid mine drainage of a polysulfide ore deposit // Microbiology (Moscow). 2016. V. 85. P. 745–751.
- Boden R. Reclassification of *Halothiobacillus hydrothermalis* and *Halothiobacillus halophilus* to *Guyparkeria* gen. nov. in the *Thioalkalibacteraceae* fam. nov., with emended descriptions of the genus *Halothiobacillus* and family *Halothiobacillaceae* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2017. V. 67. P. 3919–3928.
- Boden R., Scott K.M., Rae A.W., Hutt L.P. Reclassification of *Thiomicrospira hydrogeniphila* (Watsuji et al., 2016) to *Thiomicrospira hydrogeniphila* comb. nov., with emended description of *Thiomicrospira* (Boden et al., 2017) // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2017. V. 67. P. 4205–4209.
- Brown C.T., Hug L.A., Thomas B.C., Sharon I., Castelle C.J., Singh A., Wilkins M.J., Wrighton K.C., Williams K.H., Banfield J.F. Unusual biology across a group comprising more than 15% of domain *Bacteria* // Nature. 2015. V. 523. № 7559. P. 208–211.
- Cai C., Leu A.O., Xie G.J., Guo J., Feng Y., Zhao J.X., Tyson G.W., Yuan Z., Hu S. A methanotrophic archaeon couples anaerobic oxidation of methane to Fe(III) reduction // ISME J. 2018. V. 12. P. 1929–1939.
- Castelle C.J., Wrighton K.C., Thomas B.C., Hug L.A., Brown C.T., Wilkins M.J., Frischkorn K.R., Tringe S.G., Singh A., Markillie L.M., Taylor R.C., Williams K.H., Banfield J.F. Genomic expansion of domain archaea highlights roles for organisms from new phyla in anaerobic carbon cycling // Curr. Biol. 2015. V. 25. P. 690–701.
- Cole J.R., Wang Q., Cardenas E., Fish J., Chai B., Farris R.J., Kulam-Syed-Mohideen A.S., McGarrell D.M., Marsh T., Garrity G.M., Tiedje J.M. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis // Nucleic Acids Res. 2009. V. 37 (Suppl. 1). P. D141–D145.
- Edgar R.C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST // Bioinformatics. 2010. V. 26. P. 2460–2461.
- Haroon M.F., Hu S., Shi Y., Imelfort M., Keller J., Hugenholtz P., Yuan Z., Tyson G.W. Anaerobic oxidation of methane coupled to nitrate reduction in a novel archaeal lineage // Nature. 2013. V. 500. № 7464. P. 567–570.
- Howarth R., Unz R.F., Seviour E.M., Seviour R.D., Blackall L.L., Pickup R.W., Jones J.G., Yaguchi J., Head I.M. Phylogenetic relationships of filamentous sulfur bacteria (*Thiothrix* spp. and Eikelboom type 021N bacteria) isolated from wastewater-treatment plants and description of *Thiothrix eikelboomii* sp. nov., *Thiothrix unzii* sp. nov., *Thiothrix fructosivorans* sp. nov. and *Thiothrix defrayvii* sp. nov. // Int. J. Syst. Bacteriol. 1999. V. 49. P. 1817–1827.
- Inagaki F., Takai K., Neilson K.H., Horikoshi K. *Sulfurovum lithotrophicum* gen. nov., sp. nov., a novel sulfur-oxidizing chemolithoautotroph within the epsilon-Proteobacteria isolated from Okinawa Trough hydrothermal sediments // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2004. V. 54. P. 1477–1482.
- Ito T., Sugita K., Yumoto I., Nodasaka Y., Okabe S. *Thiovirga sulfuroxydans* gen. nov., sp. nov., a chemolithoautotrophic sulfur-oxidizing bacterium isolated from a microaerobic waste-water biofilm // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2005. V. 55. P. 1059–1064.
- Kaksonen A.H., Dopson M., Karnachuk O., Tuovinen O.H., Puhakka S.J. Biological iron oxidation and sulfate reduction in the treatment of acid mine drainage at low temperatures // Psychrophiles: From Biodiversity to Biotechnology / Eds. Margesin R., Schinner F., Marx J.-C., Gerday C. Berlin–Heidelberg: Springer Verlag, 2008. P. 429–454.
- Kojima Y., Watanabe K. *Sulfuricurvum kujiense* gen. nov., sp. nov., a facultatively anaerobic, chemolithoautotrophic, sulfur-oxidizing bacterium isolated from an underground crude-oil storage cavity // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2004. V. 54. P. 2297–2300.
- Kolinko S., Jogler C., Katzmann E., Wanner G., Peplies J., Schüler D. Single-cell analysis reveals a novel uncultivated magnetotactic bacterium within the candidate division OP3 // Environ. Microbiol. 2012. V. 14. P. 1709–1721.
- Larkin J.M., Strohl W.R. *Beggiatoa*, *Thiothrix*, and *Thioploca* // Annu. Rev. Microbiol. 1983. V. 37. P. 341–367.
- Paul K., Nonoh J.O., Mikulski L., Brune A. “Methanoplasmatales,” *Thermoplasmatales*-related archaea in termite guts and other environments, are the seventh order of methanogens // Appl. Environ. Microbiol. 2012. V. 78. P. 8245–8253.
- Rinke C., Schwientek P., Sczyrba A., Ivanova N.N., Anderson I.J., Cheng J.F., Darling A., Malfatti S., Swan B.K., Gies E.A., Dodsworth J.A., Hedlund B.P., Tsiamis G., Sievert S.M., Liu W.T., Eisen J.A., Hallam S.J., Kyrpides N.C., Stepanauskas R., Rubin E.M., Hugenholtz P., Woike T. Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter // Nature. 2013. V. 499. № 7459. P. 431–437.
- Wilson K. Preparation of genomic DNA from bacteria // Current Protocols in Molecular Biology / Eds. Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., et al. New York: Wiley, 1987. P. 2.4.1.–2.4.5.