

СОДЕРЖАНИЕ

Том 87, номер 6, 2018

ОБЗОР

Гистидиновые кислые фитазы микроорганизмов

Н. П. Балабан, А. Д. Сулейманова, Е. В. Шакиров, М. Р. Шарипова

635

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Бактерии рода *Sphaerochaeta* из низкотемпературных месторождений тяжелой нефти (Россия)

С. Х. Биджиева, Д. Ш. Соколова, Т. П. Турова, Т. Н. Назина

649

Описание нового вида анаммокс-бактерии “*Candidatus Jettenia ecosi*”

Е. А. Бочкова, Ю. В. Литти, А. А. Новиков, Д. С. Груздев, Е. С. Бочкарева, А. В. Бескорвайный, Б. Б. Кузнецов, А. Н. Ножевникова

659

Способ выделения и учета грибов, развивающихся в морских грунтах

Е. Н. Бубнова, М. Л. Георгиева, О. А. Грум-Гржимайло

672

Представители некультивируемого таксона op1 (“*Acetothermia*”) доминируют в микробном сообществе щелочного горячего источника Восточно-Тувинского нагорья

А. А. Корженков, А. В. Теплюк, А. В. Лебединский, А. А. Хвощевская, Ю. Г. Копылова, К. Д. Аракчаа, П. Н. Гольшин, Е. А. Лунёв, О. В. Гольшина, И. В. Кубланов, С. В. Тоцаков, С. Н. Гаврилов

679

Малоизученные группы бактерий – источник новых ферментов: β-галактозидазы из планктомицетов и веррукомикробий

Д. Г. Наумов, С. Н. Дедыш

695

Спектр биологической активности грибов рода *Alternaria*, выявленных в филлосфере травянистых растений

А. О. Берестецкий, Ф. Б. Ганнибал, Е. В. Минкович, И. А. Остерман, Д. Р. Салимова, П. В. Сергиев, С. В. Сокорнова

706

Роль культивируемых микроорганизмов биопленок каменистых субстратов в системе самоочищения озера Байкал

М. Ю. Суслова, О. С. Пестунова, Е. В. Суханова, Ю. Р. Штыкова, Т. Я. Косторнова, И. В. Ханаев, М. В. Сакирко, В. В. Парфенова

718

Первые сведения о бактериальном сообществе пищеварительного тракта эндемичных байкальских брюхоногих моллюсков вида *Benedictia baicalensis*

Ю. Р. Штыкова, Т. Я. Ситникова, Н. В. Кулакова, Е. В. Суханова, И. В. Ханаев, В. В. Парфенова

727

Сравнительная оценка структуры микробиомов погребенных и современных почв при помощи анализа микробной ДНК

Т. И. Чернов, А. Д. Железова, О. В. Кутовая, А. О. Макеев, А. К. Тхакахова, Н. А. Бгажба, Ф. Г. Курбанова, А. В. Русаков, Т. А. Пузанова, О. С. Хохлова

737

ХРОНИКА

Академик Михаил Владимирович Иванов 06.12.1930–03.07.2018

747

ПРАВКА

Опечатка в статье: “Окисление метана в анаэробных условиях при культивировании накопительных культур из глубинных осадков района грязевого вулкана Песчанка (Южный Байкал)” [Микробиология, 2018, том 87, № 3, с. 242–251]

А. В. Ломакина, Е. В. Мамаева, Т. В. Погодаева, Г. В. Калмычков, И. А. Хальзов, Т. И. Земская

748

Contents

Vol. 87, No. 6, 2018

Rewiev

Histidine Acid Phytases of Microbial Origin

N. P. Balaban, A. D. Suleimanova, E. V. Shakirov, and M. R. Sharipova

635

Experimental Articles

Bacteria of the Genus *Sphaerochaeta* from Low-Temperature Heavy Oil Reservoirs (Russia)

S. Kh. Bidzhieva, D. Sh. Sokolova, T. P. Tourova, and T. N. Nazina

649

Description of “*Candidatus Jettenia ecosi*” sp. nov., a New Species of Anammox Bacteria

*E. A. Botchkova, Yu. V. Litt, A. A. Novikov, D. S. Grouzdev, E. S. Bochkareva,
A. V. Beskorovayny, B. B. Kuznetsov, and A. N. Nozhevnikova*

659

Method for Isolation and Enumeration of Fungi Developing in Marine Sediments

E. N. Bubnova, M. L. Georgieva, and O. A. Grum-Grzhimailo

672

Members of the Uncultured Taxon OP1 (“*Acetothermia*”) Predominate in the Microbial Community of an Alkaline Hot Spring at East-Tuvian Upland

*A. A. Korzhenkov, A. V. Teplyuk, A. V. Lebedinsky, A. A. Khvashchevskaya, Yu. G. Kopylova,
K. D. Arakchaa, P. N. Gloyshin, E. A. Lunyov, O. V. Golyshina, I. V. Kublanov,
S. V. Toshchakov, and S. N. Gavrilov*

679

Bacteria from Poorly Studied Phyla as a Potential Source of New Enzymes:

β -Galactosidases from *Planctomycetes* and *Verrucomicrobia*

D. G. Naumoff and S. N. Dedysh

695

Spectrum of Biological Activity of the *Alternaria* Fungi Isolated from the Phyllosphere of Herbaceous Plants

*A. O. Berestetskiy, F. B. Gannibal, E. V. Minkovich, I. A. Osterman, D. R. Salimova,
P. V. Sergiev, and S. V. Sokornova*

706

Role of Cultured Microorganisms from Biofilms Formed on Rocky Substrates in the Lake Baikal Self-Purification System

*M. Yu. Suslova, O. S. Pestunova, E. V. Sukhanova, Yu. R. Shtykova, T. Ya. Kostornova
I. V. Khanaev, M. V. Sakirko, and V. V. Parfenova*

718

First Reports on the Bacterial Community of the Digestive System of Endemic Baikal Gastropods *Benedictia baicalensis*

*Yu. R. Shtykova, T. Ya. Sitnikova, N. V. Kulakova, E. V. Sukhanova,
I. V. Khanayev, and V. V. Parfenova*

727

Comparative Analysis of the Structure of Buried and Surface Soils by Analysis of Microbial DNA

*T. I. Chernov, A. D. Zhelezova, O. V. Kutovaya, A. O. Makeev, A. K. Tkhakakhova,
N. A. Bgazhba, F. G. Kurbanova, A. V. Rusakov, T. A. Puzanova, and O. S. Khokhlova*

737

Chronicle

Academian M. V. Ivanov 06.12.1930–03.07.2018

747

Errata

Erratum: Anaerobic Methane Oxidation in Enrichment Cultures from Deep Sediments of a Mud Volcano Peschanka (South Baikal) [Microbiology, 2018, Vol. 87, No. 3, pp. 317–325]

*A. V. Lomakina, E. V. Mamaeva, T. V. Pogodaeva, G. V. Kalmychkov,
I. A. Khal'zov, and T. I. Zemskaya*

748

ГИСТИДИНОВЫЕ КИСЛЫЕ ФИТАЗЫ МИКРООРГАНИЗМОВ

© 2018 г. Н. П. Балабан^{а, *}, А. Д. Сулейманова^а, Е. В. Шакиров^{а, b}, М. Р. Шарипова^а^аКазанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, 420021 Россия^bУниверситет Техаса, Остин, Техас, 78712 США

*e-mail: Nellybalaban@yandex.ru

Поступила в редакцию 21.04.2018 г.

Обзор посвящен описанию многообразия микроорганизмов, способных продуцировать фитазы, расщепляющие труднодоступный фитат до неорганического фосфата. Обсуждаются общие подходы к классификации микробных фитаз, сделан акцент на характеристике гистидиновых кислых фитаз класса NARs, катализирующих специфическое расщепление *мио*-инозитолгексакисфосфата. Изложены сведения о влиянии гликозилирования и различных эффекторов на термостабильность и активность микробных ферментов. Рассматриваются данные о биосинтезе, субстратной специфичности гистидиновых кислых фитаз микроорганизмов и механизме гидролиза *мио*-инозитолгексакисфосфата. Сделано заключение о высоком практическом потенциале этой группы микробных ферментов.

Ключевые слова: гистидиновые кислые фитазы, микроорганизмы, *мио*-инозитолгексакисфосфат, свойства, субстратная специфичность, гидролиз фитата

DOI: 10.1134/S0026365618060022

ВВЕДЕНИЕ

Микроорганизмы – археи, бактерии, дрожжи и микроскопические грибы – населяют разнообразные экологические ниши и обладают высоким гидролитическим потенциалом. Они способны использовать для жизнедеятельности различные труднодоступные соединения, даже в самых загрязненных почвах. Одним из главных макроэлементов, необходимых для всех организмов, является фосфор. На земной поверхности фосфор находится в виде минералов, которые входят в состав природных фосфатов – апатитов и фосфоритов, большая часть которых используется для производства фосфатных удобрений. Из почвы растения потребляют фосфор практически исключительно в форме фосфатных анионов, главным образом, в форме HPO_4^{-2} и $\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$, но эта форма характеризуется низкой доступностью для почвенных растений и высокой сорбционной способностью (Secco et al., 2017; Farias et al., 2018). При этом естественное пополнение почвы фосфатными соединениями крайне незначительно, поэтому внесение в почву фосфорных удобрений является важнейшим мероприятием для повышения урожайности сельскохозяйственных культур. Большая часть фосфора в почве часто находится в виде фитатов, низкая растворимость которых приводит к ограниченному усвоению фосфора этого соединения растениями (Haefner et al., 2005; Singh, Satyanarayana, 2011). Фитат – это *мио*-ино-

зитолгексакисфосфат, сильный хелатирующий полианионный агент, который способен образовывать в почве и кормах животных нерастворимые комплексы с катионами металлов, белками, пептидами, аминокислотами, что приводит к понижению биодоступности фосфора и других компонентов фитатного комплекса. Фитаты также входят в состав зерновых кормов для животных, но они не усваиваются животными с однокамерным желудком и рассматриваются как антипитательный фактор, из-за которого сельхозпроизводители несут значительные убытки (Bohn et al., 2008). Кроме того, ограниченная способность к усвоению фитатных комплексов такими животными способствует увеличению экскреции непереваренных минерально-фитатных солей и загрязнению окружающей среды, что приводит к росту токсин-продуцирующих микроорганизмов, зарастанию водорослями водных поверхностей озер и рек, образованию оксида азота (Roy et al., 2016, Cangussu et al., 2018).

По химической структуре инозитол представляет циклическое производное шестиатомного спирта, конформация которого меняется в зависимости от расположения гидроксильных групп, которые ориентированы в пространстве аксиальным (по направлению оси) или экваториальным способом. В результате взаимодействия гидроксильных групп с шестью остатками фосфорной кислоты образуются девять стереоизомеров ино-

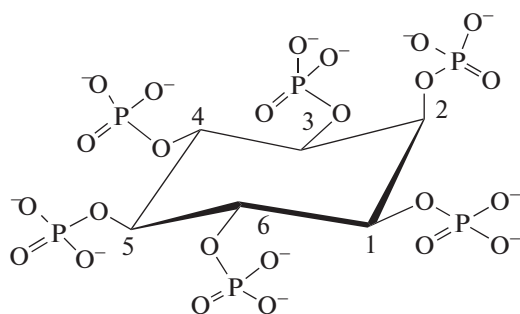


Рис. 1. *Мио*-инозитолгексакисфосфат.

зитолфосфата, доминирующим из которых является *мио*-инозитолгексакисфосфат (фитат, *мио*-InsP₆). Каждая гидроксильная группа фитата связана только с одним фосфатным остатком, причем фосфатная группа, связанная со вторым углеродным атомом инозитола (позиция d-2), ориентирована в пространстве аксиальным способом (рис. 1) (Kerovuo et al., 2000; Балабан и соавт., 2016).

Гидролиз фосфомоноэфирных связей органических соединений осуществляется ферментами большого класса фосфомоноэстераз (фосфатаз) и связан с регуляцией метаболизма и регуляторной сетью клеточной сигнальной трансдукции (Shin et al., 2001). Несмотря на большое разнообразие и широкое распространение фосфомоноэстераз, многие ферменты этого класса не могут гидролизовать фосфомоноэфирные связи в молекулах инозитолфосфатов. Ферменты, способные гидролизовать фитат и его комплексы, выделены в отдельный класс фитаз в обширном семействе фосфогидролаз.

В клетках корней растений обнаружены внутриклеточные фитазы с низкой каталитической активностью, но они не секретируются в ризосферу, и получение фосфора из почвенного фитата в необходимом для растений количестве малоэффективно (Singh, Satyanarayana, 2011; Richardson et al., 2001). Животные с однокамерным желудком (свиньи, птицы) не усваивают фосфор из растительных кормов из-за отсутствия или незначительного количества фитаз в пищеварительном тракте, недостаточного для утилизации фитата (Priyodip, Balaji, 2018). Поэтому в корм в качестве источника фосфора добавляют экзогенный неорганический фосфат, что приводит к удорожанию сельскохозяйственной продукции (Konietzny, Greiner 2004; Yao et al., 2011). Кроме того, в пищу животным часто добавляют микробные фитазы, что приводит к увеличению доступности фосфора из растительных кормов и уменьшению формирования комплексов между фитатом и минералами (Sommerfeld et al., 2017).

Внимание исследователей сконцентрировано на микробных фитазах, играющих важную роль в деградации фитата и его комплексов. Многие почвенные бактерии, грибы и дрожжи являются продуцентами внеклеточных фитаз с высокой каталитической активностью (Vats, Vanerjee, 2004). Внесение таких микроорганизмов в почву способствует эффективному увеличению биодоступности почвенного фитата. Так, коммерческий препарат Natuphos (“BASF”, Германия), полученный на основе рекомбинантного штамма *Aspergillus niger* NRRL 3135 с высокой фитазной активностью, приводит к значительной деградации фитата почвы. Его применение позволяет улучшить качество питательных кормов для домашней птицы и животных и способствует защите окружающей среды от загрязнений при использовании отходов животноводства в качестве удобрения (Lei, Stahl, 2001; Bohn et al., 2008; Rao et al., 2009; Ushasree et al., 2017).

В последние годы получены новые интересные данные по применению микробных фитаз пробиотических микроорганизмов в ферментированных пищевых продуктах. Известно, что пробиотические бактерии очень важны для здоровья человека. В частности, увеличение биодоступности фосфора может осуществляться при ферментации продуктов питания, содержащих пробиотики. Показано, что пробиотические бактерии *Bacillus subtilis*, *B. coagulans*, содержащиеся в ферментированной сое, а также *Lactobacillus acidophilus*, *L. fermentum*, *L. plantarum*, содержащиеся в ферментированном молоке, сыре и свекле, и другие пробиотики могут быть использованы для утилизации фитата более эффективно, чем фитазы растительного происхождения, что способствует улучшенному поглощению минералов и фосфора животными (Borgi et al., 2015, Priyodip et al., 2017).

Большинство изученных к настоящему времени внеклеточных фитаз имеет грибное происхождение. Продуцентами являются *A. niger*, *A. fumigatus*, *A. terreus*, *Emericia nidulans* и др. Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, *Schwanniomyces castellii*, *Debaryomyces castellii* также секретируют внеклеточные фитазы. Бактериальные фитазы, в основном, являются внутриклеточными ферментами, но грамположительные бактерии рода *Bacillus* синтезируют внеклеточные фитазы. Фитазы грамотрицательных бактерий *Aerobacter aerogenes*, *Pseudomonas* sp., *Klebsiella* sp. имеют внутриклеточную локализацию, а фитаза бактерий *Escherichia coli* локализована в периплазматическом пространстве (Konietzny, Greiner, 2004; Oh et al., 2004; Ахметова и соавт., 2012).

Продуценты микробных фитаз входят в основной состав микрофлоры ризосферы растений и микробиоты желудочно-кишечного тракта живот-

ных. Такой симбиоз с микроорганизмами оказывает благоприятное воздействие на жизнедеятельность растений и животных (Ахметова и соавт., 2012). Секвенирование большого числа геномов микроорганизмов различных филогенетических групп позволило установить присутствие генов фитаз в подавляющем большинстве бактериальных геномов. Кодированные ими белки относятся к разным классам фитаз, отличающихся по специфичности и механизму действия, активных при различных значениях pH. Микробные фитазы отличаются от эукариотических сравнительно высоким уровнем каталитической активности и представляют значительный практический потенциал для сельского хозяйства.

Ранее мы проанализировали структурные особенности щелочных бациллярных β -пропеллерных фитаз, их энзиматические свойства, субстратную специфичность, а также механизм катализа щелочной β -пропеллерной фитазой *B. amyloliquefaciens* DS11 кальций-субстратного комплекса Ca^{2+} - InsP_6 (Балабан и соавт., 2016). Бациллярные фитазы имеют уникальную пространственную структуру в виде шестилопастной β -пропеллерной архитектуры (Ha et al., 2000). Нуклеотидные последовательности генов фитаз внутри этого класса идентичны на 90–98%, однако они не имеют сходства ни с одной из групп кислых фитаз (Mullaney, Ullah, 2007; Tran et al., 2010). Бациллярные β -пропеллерные фитазы проявляют строгую субстратную специфичность к кальций-фитатному комплексу, обладают уникальной зависимостью каталитической активности от ионов кальция и, в меньшей степени, от других двухзарядных катионов (Tran et al., 2011; Lei et al., 2013). Каталитический механизм основан на последовательном отщеплении в фитатном комплексе каждой второй фосфатной группы, находящейся в смежном положении с первой фосфатной группой, то есть бидентатное хелатирование кальция в молекуле *мио*-инозитолгексакисфосфата является необходимым для осуществления катализа (Oh et al., 2006; Балабан и соавт., 2016).

В настоящей работе проводится анализ широкого спектра микробных фитаз – грибных, дрожжевых и бактериальных, относящихся к классу гистиридиновых кислых фитаз (НАPs). В частности, обсуждаются результаты анализа биохимических и энзиматических свойств наиболее известных и хорошо изученных ферментов НАPs, описываются их отличительные особенности по сравнению с другим большим классом – β -пропеллерными фитазами. Также проводится сравнительный анализ субстратной специфичности ферментов НАPs, путей гидролиза фитата и описание практического потенциала применения фитаз этого класса в биотехнологии.

КЛАССИФИКАЦИЯ МИКРОБНЫХ ФИТАЗ

Классификация микробных фитаз основана на определении первого сайта отщепления фосфатной группы от молекулы субстрата в процессе гидролиза. По этому признаку фитазы разделяются на три группы: 3-фитазы (*мио*-инозитолгексакисфосфат 3-фосфогидролазы, ЕС 3.1.3.8), инициирующие дефосфорилирование фитата по третьему (d-3) или первому (d-1) углеродному атому инозитола; 6-фитазы (*мио*-инозитолгексакисфосфат 6-фосфогидролазы, ЕС 3.1.3.26), дефосфорилирующие фитат по шестому (d-6) или четвертому (d-4) углеродному атому, и 5-фитазы (*мио*-инозитолгексакисфосфат 5-фосфогидролазы, ЕС 3.1.3.72), дефосфорилирующие фитат по пятому (d-5) углеродному атому кольца инозитола (Roy et al., 2016). К группе 3-фитаз относятся грибные и бактериальные фитазы, продуцентами которых являются *Aspergillus* sp., *Neurospora crassa*, *Pseudomonas* sp., *Klebsiella* sp. и др. 6-Фитазы обнаружены в семенах высших растений, а также у представителей семейства энтеробактерий, таких как *E. coli*, *Pantoea agglomerans* и у простейших (инфузория *Paramecium*) (Greiner et al., 2000; Greiner, 2007). 5-Фитаза обнаружена, в частности, в пыльце лилии *Lilium longiflorum* L. (Barrientos et al., 1994).

В зависимости от pH-оптимума активности фитазы разделяют на кислые и щелочные ферменты. Кислые фитазы обнаружены у дрожжей и грибов (*Saccharomyces cerevisiae*, *Candida tropicalis*, *Aspergillus* sp.), у микроорганизмов семейства *Enterobacteriaceae*: *E. coli*, *P. agglomerans*, *P. vagans*, *Shigella* sp., и у молочнокислых бактерий *Lactobacillus sanfranciscensis* (Мухаметзянова и соавт., 2012). Щелочную группу фитаз представляют β -пропеллерные фитазы (BPPs), выделенные из клеток грамположительных спорообразующих бактерий рода *Bacillus* (Yao et al., 2011).

Кислые фитазы разделяют на несколько классов ферментов: гистиридиновые кислые фитазы (НАPs), пурпурнокислые фитазы (РАPs), цистеиновые кислые фитазы СРs и тирозиновые фосфатазы с фитазной активностью (РТР-подобные инозитолполифосфатазы), к которым относится недавно обнаруженная фитаза PhvAme (инозитолполифосфатаза IРРазa) анаэробной бактерии *Megasphaera elsdenii* (Puhl et al., 2009; Yao et al., 2011). Среди кислых фитаз самую большую группу составляют ферменты класса НАPs.

Представители разных классов микробных фитаз имеют характерные структурные особенности, различные энзиматические свойства, субстратную специфичность и каталитические механизмы, способствующие эффективному осуществлению гидролиза природного *мио*-инозитолгексакисфосфата при разных значениях pH и температуры, в результате которого в качестве конечных продук-

Таблица 1. Биохимические свойства фитаз группы Phy A (Wyss et al., 1998, 1999a, 1999b)

Продуценты фитаз	Молекулярная масса, кДа	Оптimum pH	Оптimum температуры, °C	Термостабильность		Удельная активность по гидролизу фитата, ед/мг
				время преинкубации, мин	°C	
Phy A <i>A. niger</i> NRRL 3135	48–50	2.0–2.5 и 5.0–6.0	50–58	20	30–50	102.5
<i>A. fumigatus</i> 34625	48.3–48.9	4.0 и 5.0–6.5	58–60	20	90	23–28
<i>A. terreus</i> 9A1	48–49	5.0–5.5	70	20	50	142–196
<i>E. nidulans</i> (GenBank №U59803)	49	6.0–6.5	55	–	60	29–33

Таблица 2. Биохимические свойства фитаз группы Phy B (Sequeilha et al., 1992)

Продуценты фитаз	Молекулярная масса, кДа	Оптimum pH	Оптimum температуры, °C	Термостабильность		Удельная активность по гидролизу фитата, ед/мг
				время преинкубации, мин	°C	
Phy B <i>A. niger</i> NRRL 3135	50.8	2.0–2.5	55–65	20	30–70	126
<i>Sch. castellii</i> CBS 2863	Одна субъединица 125, три субъединицы по 70	4.4	77	60	74	522
<i>D. castellii</i> CBS 2923	51–53	4.0–4.5	60	60	60–66	157

тов образуются свободный фосфат, катионы металлов, свободный инозитол или менее фосфорилированный фитат (Kerovuo et al., 2000; Mullaney, Ullah, 2007). Все фитазы стереоспецифичны, имеют строгое предпочтение к экваториально расположенным фосфатным группам в молекуле *мио*-инозитолгексакисфосфата и не гидролизуют аксиально расположенные фосфатные группы (Greiner et al., 2000; Lei, Porres, 2003; Bohn et al., 2008).

Гистидиновые кислые фитазы класса *HAPs*

К хорошо изученным кислым фитазам класса *HAPs* относятся многие грибные, дрожжевые и некоторые бактериальные ферменты из *A. niger*, *A. fumigatus*, *A. ficum*, *Sch. castellii*, *Pichia rhodanensis*, *E. coli*, *K. oxytoca*, *K. terrigena*, *Pseudomonas* sp., и др. Общей характеристикой ферментов *HAPs* является наличие в активном центре консервативных N-концевого мотива – RHGXRXP, C-концевого мотива HD и цистеинового мотива, связанного с формированием дисульфидных мостиков (Nakamura et al., 2000; Mullaney, Ullah, 2005). pH-Оптimum активности гистидиновых кислых фитаз находится в об-

ласти 2.5–6.5, температурный optimum, в основном, определяется при 50–60°C, но существуют фитазы с высоким optimumом температуры (*A. terreus*, *Sch. castellii*) (табл. 1 и 2). На основании молекулярных и биохимических характеристик фитазы *HAPs* предложено разделить на три группы – PhyA, PhyB, PhyC (Oh et al., 2004).

Биохимические свойства микробных фитаз класса *HAPs*

Группа PhyA. К этой группе относят фитазы, продуцентами которых являются *A. niger*, *A. ficum*, *A. fumigatus*, *A. terreus*, *Emericella nidulans*, *A. nidulans* и др. (Vohra, Satyanarayana, 2003). Фитазы этой группы – мономерные белки, некоторые характеризуются двумя optimumами pH активности. Так, у фитазы PhyA *A. niger* NRRL 3135 два optimumа pH 2.0–2.5 и 5.0–5.5 и высокая удельная активность по гидролизу фитата (102 ед/мг белка) (табл. 1) (Mullaney, Ullah, 2003). В отличие от этой фитазы, у фитазы *A. fumigatus* ATCC 34625 pH optimum 4.0 и 5.0–6.0, а удельная активность в 4 раза меньше (Wyss et al., 1999; Konietzny, Greiner, 2002; Mullaney, Ullah, 2003).

Грибные фитазы PhyA *A. terreus* 9A1 и *E. nidulans* (GenBank N U59803) имеют один оптимум pH активности в интервале pH 5.0–6.5 (табл. 1), причем при снижении pH до 3.0 или увеличении до 7.5 активность фитаз резко уменьшается (Mullaney, Ullah, 2003; Oh et al., 2004; Mullaney, Ullah, 2007). Оптимум pH активности большинства исследованных дрожжевых фитаз (*Candida* sp., *Pichia* sp., *Saccharomyces* sp. и др.) при оптимальной температуре 60°C находится в интервале pH 4.0–5.0, но с понижением температуры до 37°C оптимум pH определяется при более низких значениях – 3.0–4.0 (Nakamura et al., 2000).

pH-Стабильность грибных фитаз варьирует в широком диапазоне pH – 2.5–7.5. Так, у фитазы *E. parum* ВСС17694 pH-стабильность находится в интервале значений pH 2.5–7.0, тогда как у фитазы *A. fumigatus* ATCC 34625 этот диапазон меньше (pH 4.0–7.5) (Pasamontes et al., 1997; Fugthong et al., 2010).

Температурный оптимум у дрожжевых фитаз выше 60°C, тогда как у грибных фитаз оптимум температуры, в основном, находится в пределах 45–60°C, но у фитазы *A. terreus* 9A1 оптимум температуры составляет 70°C (табл. 1). Термостабильность фитаз группы PhyA невелика (Pasamontes et al., 1997; Han et al., 1999; Nakamura et al., 2000; Rodriguez et al., 2000; Lei, Stahl, 2001). Так, фитаза Phy A *A.niger* сохраняет активность после предынкубации в интервале температур 30–50°C в течение 20 мин, но при увеличении температуры предынкубации до 60°C и выше в течение 10 мин активность резко падает. Фитаза *A. terreus* 9A1 теряет 50% активности после прогрева в течение 20 мин при температуре 50°C (табл. 1) (Pasamontes et al., 1997; Wyss et al., 1998; Han et al., 1999). На фоне невысокой термостабильности этой группы фитаз уникальной является термостабильность фитазы *A. fumigatus* ATCC 34625. При прогреве фермента при 90°C и выше в течение 20 мин сохраняется 90% активности, а при прогреве в течение 2 ч при 90°C остаточная активность составляет 70%. По мнению авторов, резистентность к высокой температуре связана со способностью фитазы *A. fumigatus* ATCC 34625 к правильному рефолдингу после тепловой денатурации (Pasamontes et al., 1997; Rao et al., 2009). Природа буфера может влиять на термостабильность. Эксперименты с рекомбинантной фитазой *A. fumigatus*, экспрессируемой в *P. pastoris*, показали, что белок при прогреве в Na-ацетатном буфере при 90°C в течение 20 мин сохраняет 70% исходной активности, тогда как в Na-цитратном буфере активность падает до 60% (Rodríguez et al., 2000). В отличие от высокой термостабильности фитазы *A. fumigatus* ATCC 34625, фитазы из четырех других штаммов *A. fumigatus* не были устойчивы к нагреванию. Предположительно, различия в термостабильности фитаз разных штаммов *A. fu-*

migatus связаны с посттрансляционной модификацией белков (Mullaney et al., 2000).

Группа PhyB. Эта группа включает фитазу PhyB, выделенную из того же продуцента *A. niger* NRRL 3135, что и фитаза PhyA, а также дрожжевые фитазы *Sch. castellii* и *D. castellii* (вторую авторы обозначили Phy Dc). Фитазы имеют один оптимум в области pH 2.5–4.5 и температурный оптимум 50–60°C, однако у дрожжевой фитазы *Sch. castellii* оптимум температуры составлял 77°C (табл. 2) (Sequelha et al., 1992; Konietzny, Greiner, 2002; Ragon et al., 2008). Изначально фитаза PhyB из *A. niger* NRRL 3135 была описана как кислая фосфатаза с оптимумом активности при pH 5.0. Дальнейшее изучение показало, что фермент проявляет максимальную активность по гидролизу фитата при pH 2.5. Эта фитаза отличается от фитазы PhyA *A. niger* NRRL 3135 не только наличием одного оптимума pH, но и структурой, активная форма которой представляет собой тетрамер. Тетрамерная структура фитазы PhyB способствует увеличению термостабильности фермента, но фитаза не способна к рефолдингу после денатурации (Kostrewa et al., 1999; Mullaney, Ullah, 2003). Тетрамерная структура обнаружена у фитаз *Sch. castellii* CBS 2863 и *D castellii* CBS 2923 с высоким оптимумом температуры – 77 и 60°C соответственно (табл. 2). Фитаза *Sch. castellii* обладает высокой термостабильностью: после предынкубации в течение 60 мин при температуре 74°C фитаза не теряет своей активности, тогда как у нативной фитазы PhyDc в тех же условиях потеря активности составляет 70% (Sequelha et al., 1992; Konietzny, Greiner, 2002; Vohra, Satyanarayana, 2003).

Группа PhyC. В эту группу ферментов входят бактериальные гистидиновые кислые фитазы AppA из *E. coli*, *Shigella* sp. CD2 и *Citrobacter braakii* YH-15, а также кислые фитазы крысы и человека, кристаллические структуры которых похожи на структуру фитазы *E. coli* (Lim et al., 2000; Oh et al., 2004). Две микробные фитазы (P1 и P2) выделены впервые в 1993 г. из граммотрицательных бактерий *E. coli* K12 (ATCC 33965), получены гомогенные препараты белков и исследованы их биохимические свойства (Greiner et al., 1993). Это периплазматические мономерные негликозилированные белки с оптимумом pH 4.5 и температуры 55°C. pH-Стабильность ферментов при 4°C определяется в широком интервале pH 3.0–9.0 в течение 14 сут. Фитазы *E. coli* не термостабильны, после предынкубации в течение 60 мин при 60°C активность резко падала, а при 70°C полностью исчезала (табл. 3).

Гистидиновая кислая фитаза, выделенная из клеток *Shigella* sp. CD2 и обозначенная авторами как фитаза AppAs, локализована в периплазматическом пространстве и ее нуклеотидная последо-

Таблица 3. Биохимические свойства фитаз группы Phy C (Greiner et al., 1993; Ray et al., 2012; Kim et al., 2003)

Продуценты фитаз	Молекулярная масса, кДа	Оптимум pH	Оптимум температуры, °С	Термостабильность		Удельная активность по гидролизу фитата, ед/мг
				время предынкубации, мин	°С	
AppA <i>E. coli</i> K-12 ATCC 33965	42	4.5	55	60	30–50	1800
<i>Shigella</i> sp. CD2	45	5.5	60	30	15–80	780
<i>C. braakii</i> УН-15	47	4.0	50	30	25–50	3457

вательность идентична на 98% последовательности фитазы AppA *E. coli* (Roy et al., 2016). Фитаза AppAs, в отличие от фитазы AppA *E. coli*, термостабильна и сохраняет 100% своей активности после предынкубации фермента при 70°С в течение 30 мин. Фитаза AppAs, как и грибная фитаза *A. fumigatus* ATCC 34625, после тепловой денатурации способна восстановить активную конформацию белковой молекулы с сохранением активности (Roy et al., 2012).

К группе ферментов PhyC также относится внутриклеточная фитаза *C. braakii* УН-15, нуклеотидная последовательность которой на 62% идентична последовательности фитазы *Shigella* sp. CD2. Максимальная активность определяется при оптимальном pH 4.0 и температуре 50°С, удельная активность почти в 2 раза выше, чем у фитазы AppA *E. coli*. Термостабильность фитазы невелика, после предынкубации в течение 30 мин при температуре 55°С сохраняется лишь 40% активности (табл. 3) (Kim et al., 2003). Однако рекомбинантная фитаза, экспрессируемая в *S. cerevisiae*, показывает высокую термостабильность: после предынкубации в течение 30 мин при 70°С остаточная активность составляет 66% (Kim et al., 2006).

В целом, ферменты групп PhyA и PhyB относятся к 3-фитазам, ферменты группы PhyC – к 6-фитазам.

ВЛИЯНИЕ ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЯ И ЭФФЕКТОРОВ НА ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТЬ, МОЛЕКУЛЯРНУЮ МАССУ И АКТИВНОСТЬ ФИТАЗ

Гликозилирование способствует правильному белковому фолдингу и увеличивает термостабильность и молекулярную массу ферментов. Грибные фитазы класса NARs – гликозилированные белки, молекулярная масса которых варьируется и зависит от степени гликозилирования фрагментами углеводов N-гликозилированных сайтов ферментов, но гликозилирование не влияет на оптимальные значения pH и температуры

(Oh et al., 2004; Mullaney, Ullah, 2007). Так, молекулярная масса фитазы *A. fumigatus*, содержащей до семи сайтов гликозилирования, составляет 60–100 кДа, в то время как молекулярная масса негликозилированного фермента – 48.27 кДа (Pasamontes et al., 1997; Lei, Stahl, 2001). Молекулярная масса негликозилированной фитазы PhyA *A. niger* NRRL 3135, имеющей десять сайтов гликозилирования, составляет 48–50 кДа, но у гликозилированной фитазы, экспрессируемой в *S. cerevisiae*, она варьирует в широком диапазоне (62–128 кДа) и имеет высокую термостабильность – 75% активности остается после прогрева в течение 15 мин при 80°С (Ha et al., 1999; Oh et al., 2004). Бактериальная фитаза *C. braakii*, экспрессируемая в клетках дрожжей *S. cerevisiae*, имеет пять сайтов гликозилирования и показывает высокую термостабильность (Kim, 2006). N-гликозилированные фитазы из *Yersinia kristensentii* и *Y. rohdei*, экспрессируемые в *P. pastoris*, улучшали термостабильность на 5°С, а активность этих фитаз сохранялась до 80% при понижении pH до 1.5 (Niu et al., 2016). Термостабильность фитаз может быть связана не только с гликозилированием, но и с буферными системами, используемыми при определении активности ферментов, со степенью чистоты ферментных препаратов, а также может зависеть от взаимодействия белка и организма, в котором происходит экспрессия белка (Rao et al., 2009).

Гликозилирование может влиять не только на термостабильность, но и на другие свойства фитаз: на каталитические свойства, на pI фермента, которое может изменить поведение белка при очистке; гликозилирование также может понизить уровень экспрессии гетерологичных фитаз (Wyss et al., 1999a). Установлено, что дегликозилирование эндогликозидазой Endo-N рекомбинантной фитазы PhyA *E. parum* BCC17604, экспрессируемой в *P. pastoris*, приводит к полной потере активности, то есть гликозилирование является критически важным для сохранения активности рекомбинантного фермента (Fugthong et al., 2010).

Эффекторы. На активность гистидиновых кислых микробных фитаз не оказывают значительного влияния катионы двухвалентных металлов в небольших концентрациях (0.1–1.0 мМ), но увеличение концентрации до 2 мМ приводит к ингибированию активности фитаз *A. fumigatus*, *A. terreus* CBS, *E. nidulans*, *Shigella* CD2, *C. braakii* УН-15 (Sequelha et al., 1992; Greiner et al., 1993; Kim et al., 2003; Rao et al., 2009; Roy et al., 2012). При этом катионы Cu(II), Zn(II), Fe(II) даже в небольших концентрациях (1 мМ) ингибируют активность всех групп гистидиновых кислых фитаз. Ингибирующее действие объясняется, по-видимому, образованием нерастворимых комплексов фитата с катионами металлов, что приводит к уменьшению доступности субстрата для фермента (Konietzny, Greiner, 2002).

Исследование влияния химических реагентов на активность гистидиновых кислых микробных фитаз показало, что ЭДТА не влияет на активность таких ферментов, как PhyA *A. niger*, *Shigella* sp. CD2, *E. coli*, *S. castellii* (Sequelha et al., 1992; Wyss et al., 1999a; Konietzny, Greiner, 2002). На активность фитаз *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. terreus* CBS и *E. nidulans* не оказывает значительного влияния *n*-а-хлормеркурибензоат (*n*-ХМБ), так как активность ферментов в его присутствии уменьшалась не более чем на 11%. По-видимому, в структуре этих фитаз отсутствуют свободные SH-группы, или же сульфгидрильные группы играют незначительную роль для проявления активности (Wyss et al., 1999a). Показано, что *n*-ХМБ в концентрации 1 мМ подавляет активность фитазы *S. castellii* на 95%, что позволило предположить, что SH-группы связаны с каталитическим центром фермента (Sequelha et al., 1992). Детергент додецилсульфат натрия (SDS-Na) полностью ингибирует активность фитаз класса NAPs, что связано, вероятно, с взаимодействием между негативным зарядом детергента и позитивным зарядом активного центра фитаз, которое приводит к недоступности субстрата активному центру фермента (Fugthong et al., 2010).

Фитаза патогенной бактерии *Shigella* sp. CD2 и рекомбинантная фитаза *C. braakii*, экспрессируемая в клетках *S. cerevisiae*, устойчивы в присутствии пепсина и трипсина. Папаин, эластаза и панкреатин незначительно ингибируют активность фитазы *C. braakii* (остаточная активность фитазы при инкубации с этими ферментами составляет 85, 80 и 70% соответственно) (Kim et al., 2003).

Субстратная специфичность гистидиновых кислых фитаз

Так как комплекс фитата с катионами металлов положительно заряжен, то микробные гистидиновые кислые фитазы, имеющие в области ак-

тивного центра положительно заряженные группы, не могут гидролизовать фосфомоноэфирные связи субстрата из-за возникающего электростатического отталкивания. При пониженном значении pH фитазы класса NAPs гидролизуют лишь фитат, свободный от катионов металлов (Lim et al., 2000; Oh et al., 2004).

Известно, что щелочные фитазы обладают узкой субстратной специфичностью, гидролизуют при pH 7.0–8.0 кальций-фитатный комплекс, но не расщепляют фосфомоноэфирные связи в других фосфорилированных субстратах (Oh et al., 2004). Фитазы класса NAPs, в отличие от β -пропеллерных фитаз, могут гидролизовать не только *мио*-инозитолгексакисфосфат, но и другие фосфорные эфиры. Описаны гистидиновые кислые фитазы с широкой субстратной специфичностью, но с низкой удельной активностью, такие как фитазы *A. fumigatus*, *E. nidulans*, PhyB *A. niger*. Другие микробные фитазы показывают высокую удельную активность по гидролизу фитата и узкую субстратную специфичность по гидролизу других фосфорилированных субстратов, например, фитазы PhyA *A. niger*, *A. terreus* и *E. coli* (табл. 4) (Wyss et al., 1999b; Bohn et al., 2008). К таким фитазам относятся также фитазы *Sch. castellii* CBS 2863 и *D. castellii* CBS 2923. На основе фитазы AppA *E. coli*, удельная активность которой на порядок выше, чем у фитазы PhyA *A. niger*, создан и широко используется коммерческий препарат Phyzyme XP (“Danisco”, Дания) (Youn et al., 2011). Предпочтительную специфичность к фитату показывают фитазы *Shigella* sp. CD и *C. braakii* УН-15, по сравнению с низкой активностью на других фосфорилированных субстратах (АТФ, АДФ, глюкозо-6-фосфат, фруктозо-6-фосфат и *n*-нитрофенилфосфат (pNPP)). Интересно отметить, что фитаза *C. braakii* УН-15 обладает уникальной способностью гидролизовать до свободного инозитола все шесть фосфатных групп *мио*-инозитолгексакисфосфата, в том числе и фосфатную группу в d-2 позиции, которая связана аксиально с молекулой инозитола (Kim et al., 2003; Roy et al., 2012). Высокая удельная активность, термостабильность и устойчивость к протеолитической деградации делают микробные фитазы перспективными для производства кормовых добавок для животных.

Механизм гидролиза *мио*-инозитолгексакисфосфата фитазой AppA *E. coli*

Механизм гидролиза микробными фитазами класса NAPs основан на последовательном отщеплении от молекулы *мио*-инозитолгексакисфосфата остатков фосфорной кислоты; конечными продуктами такого гидролиза являются молекула *мио*-инозитолмонофосфата и пять молекул

Таблица 4. Субстратная специфичность фитаз по гидролизу фосфорилированных субстратов (Wyss et al., 1998, 1999a, 1999b)

Продуценты фитаз	Удельная активность по гидролизу субстратов, ед/мг:					
	фитат	pNPP	фруктозо-6-фосфат	глюкозо-6-фосфат	фенил-фосфат	АТФ
Phy A <i>A. niger</i> NRRL 3135	102.5	18	0	5	15	18
<i>A. terreus</i> 9A1	148	15	2	45	10	48
<i>A. fumigatus</i> 34625	26.5	108	5	30	110	20
<i>E. nidulans</i> (GenBank № U59803)	28.0	34	10	12	48	15
Phy B <i>A. niger</i> NRRL 3135	120	900	250	900	900	700
AppA <i>E. coli</i> K-12	812	25	0	0	0	3

неорганического фосфата. Образующиеся низкофосфорилированные промежуточные продукты высвобождаются в разной последовательности и с разной скоростью (Wyss et al., 1999b). Гидролиз фитата осуществляется по двустадийному механизму. На первой ступени происходит нуклеофильная атака гистидиновым остатком консервативного мотива RHGXRР на атом фосфора с образованием ковалентного промежуточного продукта (интермедиата). На второй ступени остаток аспартата С-концевого мотива HD, служащий донором протона для атома кислорода, осуществляет гидролиз образовавшейся фосфогистидиновой связи промежуточного продукта (Oh et al., 2004, Yao et al., 2011). Так, реакция гидролиза *мио*-инозитолгексагисфосфата Ins(1,2,3,4,5,6)P₆ фитазой AppA *E. coli* начинается отщеплением фосфатной группы в d-6 позиции фитата с образованием интермедиата Ins(1,2,3,4,5)P₅, который, как показали эксперименты, не накапливается и быстро гидролизуется до *мио*-инозитолтетрагисфосфатов. Экспериментально установлено, что освобождение фосфатной группы из *мио*-инозитолпентагисфосфата Ins(1,2,3,4,5)P₅ проходит, в основном, по мажорному пути гидролиза с образованием интермедиата Ins(2,3,4,5)P₄, тогда как два другие интермедиата Ins(1,2,3,4)P₄ и Ins(1,2,4,5)P₄ образуются в незначительном количестве (Greiner et al., 1993). *Мио*-инозитолтетрагисфосфат Ins(2,3,4,5)P₄ накапливается, так как скорость гидролиза снижается из-за ингибирования освобождающимся неорганическим фосфатом. Дальнейший гидролиз протекает с низкой скоростью до менее фосфорилированных продуктов с образованием конечного продукта *мио*-инозитолмонофосфата Ins(2)P₁, фосфорный остаток которого связан аксиально в позиции d-2 с молекулой инозитола (Greiner, 2007). При гидролизе 3-фитазами класса NAPPs *мио*-инозитолгексагисфосфата конечным продуктом также является *мио*-инозитолмонофос-

фат, но гидролиз начинается в позиции d-3 *мио*-инозитолгексагисфосфата (рис. 2).

БИОСИНТЕЗ МИКРОБНЫХ ФИТАЗ И ЕГО РЕГУЛЯЦИЯ

У большинства микроорганизмов фитаза является индуцибельным ферментом, экспрессия которого подвергается комплексной регуляции, однако биосинтез фитазы контролируется по-разному у различных микроорганизмов. Регуляция продукции фитазы детально изучена только у *E. coli*, *Raoultella terrigena* (*Klebsiella terrigena*) и *S. cerevisiae* (Touati et al., 1987; Greiner et al., 1993; Greiner et al., 1997; Zamudio et al., 2001; Andlid et al., 2004). У микромицетов биосинтез фитазы ассоциирован с ростом; ферментативная активность увеличивается с начала роста клеток до начала стационарной фазы. Однако в нелимитирующих условиях образование многих бактериальных фитаз начинается, когда культуры входят в стационарную фазу роста. Таким образом, ограниченность в питательных веществах или энергии, которая происходит в стационарной фазе, может индуцировать продукцию фитазы.

Клетки *Bacillus* и *E. coli* иницируют синтез фитазы при истощении неорганического фосфата в среде, в то время как ограничения по углероду, азоту и сере не оказывали такого действия (Touati et al., 1987). Регуляторное ингибирование биосинтеза фитазы фосфатом наблюдалось у всех продуцентов микробных фитаз, включая микромицеты, дрожжи и бактерии, за исключением *R. terrigena* и бактерий, выделенных из рубца жвачных животных (Greiner et al., 1997).

Кроме того, экспрессия фитазы зависит от pH среды и источника углерода, используемого при культивировании (Konietzny, Greiner, 2004). При наличии простых сахаров (глюкоза) в среде наблюдалась репрессия синтеза фитаз. Было установлено, что сAMP-САР, а не источник углерода,

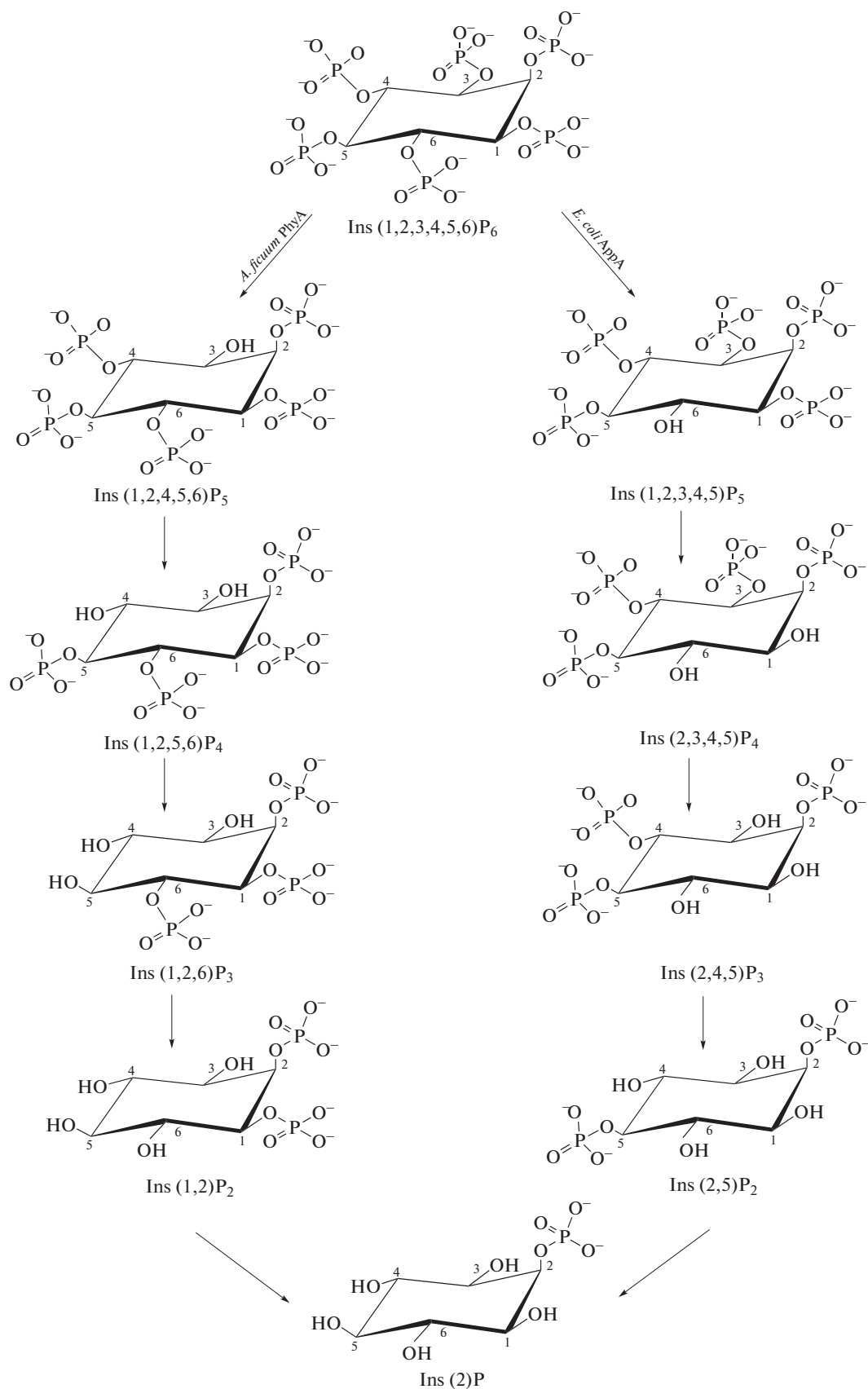


Рис. 2. Пути гидролиза *мио*-инозитолгексагисфосфата Ins(1,2,3,4,5,6)P₆ фитазами AppA *E. coli* и PhxA *A. ficuum*.

непосредственно участвует в регуляции синтеза фитазы в *E. coli*. Продукция фитазы как в *E. coli*, так и в *R. terrigena* отрицательно регулируется сАМР (Touati et al., 1987; Zamudio et al., 2002). Для нескольких штаммов *Raoultella* sp. было показано, что присутствие фитата в среде является необходимым условием для биосинтеза фитазы (Greiner et al., 1997). Индукция субстратом была также обнаружена у анаэробов *Mitsuokella jalaludinii*, тогда как присутствие фитата в среде никак не влияло на образование фитазы у *E. coli* (Greiner et al., 1993; Lan et al., 2002). Эффективная индукция или репрессия биосинтеза фитазы при фосфатном голодании у большинства микроорганизмов ставит вопрос о важной функциональной роли фитазы в обеспечении микробных клеток фосфатом при гидролизе фитата.

ПРАКТИЧЕСКОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МИКРОБНЫХ ФИТАЗ

Почвенные микроорганизмы оказывают благоприятное воздействие на рост и развитие растений, повышая доступность фосфора из трудно растворимых фитатов и других важных, но труднодоступных питательных веществ, таких как азот, витамины группы В и аминокислоты. Микроорганизмы как продуценты фитаз являются идеальными кандидатами для создания биоудобрений. Показано, что пастбищные растения способны утилизировать фитатный фосфор при наличии почвенных микроорганизмов родов *Pseudomonas*, *Enterobacter* и *Pantoea*, которые широко распространены в ризосфере различных видов растений (Richardson et al., 2001b; Jorquera et al., 2008). Микробные фитазы также способствуют освобождению из фитатных комплексов микроэлементов, которые в дальнейшем усваиваются растениями. Инновационные микробные биотехнологии по разработке биоудобрений на основе продуцентов фитаз приведут к экономически выгодному и экологичному способу увеличения биодоступности почвенного фосфора, что будет альтернативой для использования неорганических фосфорных удобрений. Фундаментальные знания о микробных фитазах и многообразии продуцентов этих ферментов необходимы для создания новых технологических разработок.

Для использования микробных фитаз с целью увеличения биодоступности фосфора в питании животных важными являются несколько факторов. Необходимо, чтобы фитазы обладали высокой термостабильностью и специфической активностью, поскольку питательные добавки производятся при высокой температуре (70–80°C), при которой нетермостабильный фермент быстро инактивируется (Oh et al., 2004). Для усвоения биодобавок важно, чтобы фитазы были активны в широком диапазоне рН и имели высокую рези-

стентность к деградации протеолитическими ферментами и воздействию ингибиторов животного происхождения. Новые фитазы, полученные из *Enterobacter cloacae* PSB-45 (Genbank Accession № KR133282) и из *Serratia* sp. PSB-15 (Genbank Accession № KR133277), характеризуются термостабильностью при 50–70°C и рН-стабильностью в широком диапазоне (рН 3.0–8.0), что создает определенные перспективы для их практического использования в сельском хозяйстве (Kalsi et al., 2016). Микробные фитазы с оптимумом рН в области низких значений и устойчивостью к пепсину являются приоритетными при использовании их с целью повышения питательной ценности растительных кормов (Lei, Stahl, 2001). Так, для увеличения количества неорганического фосфата в кормовых добавках для цыплят была получена рекомбинантная фитаза AppA *E. coli*, названная авторами Хланазой, с оптимумом температуры 60°C и рН 4.5, которая экспрессировалась в клетках морских водорослей. При использовании трансгенной Хланазы в питании бройлерных цыплят количество свободного неорганического фосфата увеличивалось на 41%, фекальная экскреция фитатов уменьшалась на 43% по сравнению с таковыми для цыплят, получавшими традиционное питание (Yoon et al., 2011). Благодаря низкой себестоимости бактериальных ферментов, доступности культивирования и их безопасности, а также положительному влиянию продуктов гидролиза на метаболизм организма животного, новые биотехнологии в будущем позволят широко использовать микробные фитазы в качестве добавок в питании домашних птиц и животных (Konietzny, Greiner, 2004). В настоящее время, кроме известных коммерческих препаратов фитаз Natuphos и Хланазы, промышленность выпускает препараты фитаз Ronozyme TM (DSM, *Peniophora lycii*), Phyzyme TM (Diversa/Danisco A/S, *Schizosaccharomyces pimbe*) и Quantum TM (Diversa/Syngenta, *E. coli*) (Kalsi et al., 2016). Отметим также, что продукты специфического гидролиза мио-инозитолгексакисфосфата бактериальными фитазами имеют высокий потенциал практического применения в качестве лекарственных средств, в отличие от многоэтапного и дорогостоящего химического синтеза (Shamsuddin, Vucenic, 2005; Balaban et al., 2014).

Работа выполнена в рамках государственной программы повышения конкурентоспособности Казанского (Приволжского) федерального университета среди ведущих мировых научно-образовательных центров и поддержана грантом РФ № 16-16-04062.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Ахметова А.И., Мухаметзянова А.Д., Шарипова М.Р. Микробные фитазы как основа новых технологий в

- кормлении животных // Ученые записки Казанского университета. Естественные науки. 2012. Т. 154. Кн. 2. С. 1–8.
- Балабан Н.П., Сулейманова А.Д., Валеева Л.Р., Шакиров Е.В., Шарипова М.Р.* Структурные особенности и механизм катализа β -пропеллерных фитаз бацилл // Биохимия. 2016. Т. 81. № 8. С. 1013–1022.
- Balaban N.P., Suleimanova A.D., Valeeva L.R., Shakirov E.V., Sharipova M.R.* Structural characteristics and catalytic mechanism of Bacillus β -propeller phytases // Biochemistry (Moscow). 2016. V. 81. P. 785–793.
- Мухаметзянова А.Д., Ахметова А.И., Шарипова М.Р.* Микроорганизмы как продуценты фитаз // Микробиология. 2012. Т. 81. С. 291–300.
- Mukhametzyanova A.D., Akhmetova A.I., Sharipova M.R.* Microorganisms as phytase producers // Microbiology (Moscow). 2012. V. 81. P. 267–275.
- Abel S., Ticconi C., Delatorre C.* Phosphate sensing in higher plants // Physiol. Plantarum. 2002. V. 115. P. 1–8.
- Andlid T.A., Veide J., Sandberg A.S.* Metabolism of extracellular inositol hexaphosphate (phytate) by *Saccharomyces cerevisiae* // Int. J. Food Microbiol. 2004. V. 97. P. 157–169.
- Balaban N.P., Suleimanova A.D., Valeeva L.R., Chastukhina I.B., Rudakova N.L., Sharipova M.R., Shakirov E.V.* Microbial phytases and phytate: exploring opportunities for sustainable phosphorus management in agriculture // Amer. J. Mol. Biol. 2017. V. 7. P. 11–29.
- Balaban N.P., Suleimanova A.D., Valeeva L.R., Chastukhina I.B., Sharipova M.R.* Inositol phosphates and their biological effects // Biomed. Pharmacol. J. 2014. V. 7. P. 433–437.
- Barrientos L., Scott J.J., Murthy P.P.N.* Specificity of hydrolysis of phytic acid by alkaline phytase from lily pollen // Plant Physiol. 1994. V. 106. P. 1489–1495.
- Bohn L., Meyer A.S., Rasmussen S.K.* Phytate: impact on environment and human nutrition. A challenge for molecular breeding // J. Zhejiang Univ. (Sci.). 2008. V. 9. P. 165–191.
- Borgi M.A., Boudebouze S., Mkaouar H., Maguin E., Rhimi M.* Bacillus phytases: Current status and future prospects // Bioengineered. 2015. V. 6. P. 233–236.
- Cangussu A.S.R., Almeida D.A., Aguiar R.W.S., Bordignon-Junior S.E., Viana K.F., Barbosa L.C., Cangussu E.W., Brandi I.V., Portella A.C.F., Santos G.R., Sobrinho E.M., Lima W.J.N.* Characterization of the catalytic structure of plant phytase, protein tyrosine phosphatase-like phytase, and histidine acid phytases and their biotechnological applications // Hindawi Enzyme Research. Vol. 2018. Article ID 8240698. P. 12. <https://doi.org/10.1155/2018/8240698>.
- Chen C.C., Cheng K.J.* Current progresses in phytase research: Three-dimensional structure and protein engineering // ChemBioEng Rev. 2015. V. 2. P. 1–12.
- Dionisio G., Brinch-Pedersen H., Welinder K.G., Jorgensen M.* Different site-specific N-glycan types in wheat (*Triticum aestivum* L.) PAP phytase // Phytochemistry. 2011. V. 72. P. 1173–1179.
- Doolette A.L., Smernik R.J., Dougherty W.J.* Rapid decomposition of phytate applied to a calcareous soil demonstrated by a solution ^{31}P NMR study // Europ. J. Soil Sci., 2010. V. 61. P. 563–575.
- Erlich K.C., Montalbano B.G., Mullaney E.J., Dischinger H.C.* Identification and cloning of a second phytase gene (*phyB*) from *Aspergillus niger* (*ficuum*) // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1993. V. 195. P. 53–57.
- Farias N., Almeida I., Meneses C.* New bacterial phytase through metagenomic prospection // Molecules. 2018. V. 23. P. 448.
- Fugthong A., Boonyapakron K., Sornlek W., Tanapongpipat S., Eurwilaichitr L., Pootanakit K.* Biochemical characterization and *in vitro* digestibility assay of *Eupenicillium parvum* (BCC17694) phytase expressed in *Pichia pastoris* // Protein Expr. Purif. 2010. V. 70. P. 60–67.
- Gaxiola R.A., Edwards M., Elser J.J.* A transgenic approach to enhance phosphorus use efficiency in crops as part of a comprehensive strategy for sustainable agriculture // Chemosphere. 2011. V. 84. P. 840–845.
- Greiner R., Carlsson N.G., Alminger M.L.* Stereospecificity of myo-inositol hexakisphosphate dephosphorylation by a phytate-degrading enzyme of *Escherichia coli* // J. Biotechnol. 2000. V. 84. P. 53–62.
- Greiner R.* Phytate-degrading enzymes: Regulation of synthesis in microorganisms and plants // Inositol phosphates: Linking agriculture and the environment / Eds. Turner B.L., Richardson A.E., Mullaney E.J. CABI, 2007. P. 78–96.
- Greiner R., Haller E., Konietzny U., Jany K.-D.* Purification and characterization of a phytase from *Klebsiella terrigena* // Arch. Biochem. Biophys. 1997. V. 341. P. 201–206.
- Greiner R.* Purification and characterization of three phytases from germinated lupine seeds (*Lupinus albus* var. *Amiga*) // J. Agric. Food Chem. 2002. V. 50. P. 6858–6864.
- Greiner R., Konietzny U., Jany K.-D.* Purification and characterization of two phytases from *Escherichia coli* // Arch. Biochem. Biophys. 1993. V. 303. P. 107–113.
- Gupta R.K., Gangoliya S.S.* Reduction of phytic acid and enhancement of bioavailable micronutrients in food grains // J. Food Sci. Technol. 2015. V. 52. P. 676–684.
- Ha N.-C., Oh B.-C., Shin S., Kim H.-J., Oh T.-K., Kim Y.-O., Choi K.-Y., Oh B.-H.* Crystal structures of a novel thermostable phytase in partially and fully calcium-loaded states // Nature Struct. Mol. Biol. 2000. V. 7. P. 147–153.
- Haefner S., Knietzsch A., Sholten E., Braun J., Lohscheidt M., Zelder O.* Biotechnological production and applications of phytases // Microbiol. Biotechnol. 2005. V. 68. P. 588–597.
- Han Y., Wilson D.B., Lei X.G.* Expression of an *Aspergillus niger* phytase gene (*phyA*) in *Saccharomyces cerevisiae* // Appl. Environ. Microbiol. 1999. V. 65. P. 1915–1918.
- Jorquera M.A., Hernander M.T., Rengel Z., Marschner P., Luz Mora M.* Isolation of culturable phosphobacteria with both phytate-mineralization and phosphate-solubilization activity from the rhizosphere of plants grown in a volcanic soil // Biol. Fert. Soils. 2008. V. 44. P. 1025–1034.
- Kalsi H.K., Singh R., Dhaliwal H.S., Kumar V.* Phytases from *Enterobacter* and *Serratia* species with desirable characteristics for food and feed applications // Biotech. 2016. V. 6. P. 64. doi 10.1007/s13205-016-0378-x
- Kerovuo J., Rouvinen J., Hatzack F.* Analysis of myo-inositol hexakisphosphate hydrolysis by Bacillus phytase: indication of a novel reaction mechanism // Biochem J. 2000. V. 352. P. 623–628.
- Kim H.W., Kim Y.O., Lee J.H., Kim K.K., Kim Y.J.* Isolation and characterization of a phytase with improved properties

- from *Citrobacter braakii* // Biotechnol. Lett. 2003. V. 25. P. 1231–1234.
- Kim Y.O., Kim H.W., Lee J.H., Kim K.K., Lee S.J. Molecular cloning of the phytase gene from *Citrobacter braakii* and its expression in *Saccharomyces cerevisiae* // Biotechnol Lett. 2006. V. 28. P. 33–38.
- Konietzny U., Greiner R. Molecular and catalytic properties of phytate-degrading enzymes (phytases) // Int. J. Food Technol. 2002. V. 37. P. 781–812.
- Konietzny U., Greiner R. Bacterial phytase: potential application, in vivo function and regulation of its synthesis // Brazil. J. Microbiol. 2004. V. 35. P. 11–18.
- Kostrewa D., Leitch F.G., D'Arcy A., Broger C., Mitchell D., van Loon A.P.G.M. Crystal structure of phytase from *Aspergillus ficuum* at 2.5 Å resolution // Nature Struct. Biol. 1997. V. 4. P. 185–190.
- Kostrewa D., Wyss M., D'Arcy A., van Loon A.P. Crystal structure of *Aspergillus niger* pH 2.5 optimum acid phosphatase at 2.4 Å resolution // J. Mol. Biol. 1999. V. 288. P. 965–974.
- Lan G.Q., Abdullah N., Jalaludin S., Ho Y.W. Culture condition influencing phytase production of *Mitsuokella jalaludinii*, a new bacterial species from the rumen of cattle // J. Appl. Microbiol. 2002. V. 93. P. 668–674.
- Lei X.G., Weaver J.D., Mullaney E.J., Ullah A.H., Azain M.J. Phytase, a new life for an “old” enzyme // Annu. Rev. Anim. Biosci. 2013. V. 1. P. 283–309.
- Lei X.G., Porres J.M. Phytase enzymology, applications, and biotechnology // J. Biotechnol. Lett. 2003. V. 25. P. 1787–1794.
- Lei X.G., Stahl C.H. Biotechnological development of effective phytases for mineral nutrition and environmental protection // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2001. V. 57. P. 474–481.
- Lim D., Golovan S., Forsberg C.W., Jia Z. Crystal structures of *Escherichia coli* phytase and its complex with phytate // Nature Struct. Biol. 2000. V. 7. P. 108–113.
- Ma X.F., Tudor S., Butler T., Ge Y., Xi Y., Bouton J., Harrison, Wang Z.Y. Molecular breeding in plants: moving into the mainstream // Mol. Breeding. 2012. V. 29. P. 831–832.
- Mullaney E.J., Ullah A.H.J. Phytases: attributes, catalytic mechanisms and applications // Inositol phosphates: Linking agriculture and the environment // Eds. Turner B.L., Richardson A.E., Mullaney E.J. CABI, 2007. P. 97–111.
- Mullaney E.J., Ullah A.H. Conservation of cysteine residues in fungal histidine acid phytases // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2005. V. 328. P. 404–408.
- Mullaney E.J., Ullah A.H.J. The term phytase comprises several different classes of enzymes // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2003. V. 312. P. 179–184.
- Mullaney E.J., Daly C.B., Kim T., Porres J.M., Lei X.G., Sethumadhavan K. Site-directed mutagenesis of *Aspergillus niger* NRRL 3135 phytase at residue 300 to enhance catalysis at pH 4.0. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2002. V. 297. P. 1016–1020.
- Mullaney E.J., Daly C.B., Sethumadhavan K., Rodriguez E., Lei X.G., Ullah A. Phytase activity in *Aspergillus fumigatus* isolates // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2000. V. 275. P. 759–763.
- Nakamura Y., Fukuhara H., Sano K. Secreted phytase activities of yeasts // Biosci. Biotechnol. Biochem. 2000. V. 64. P. 841–844.
- Niu C., Luo H., Shi P., Huang H., Wang Y., Yang P., Yao B. N-Glycosylation improves the pepsin resistance of histidine acid phosphatase phytases by enhancing their stability at acidic pHs and reducing pepsin's accessibility to its cleavage sites // Appl. Environ. Microbiol. 2015. V. 82. P. 1004–1014.
- Oh B.C., Choi W.C., Park S., Kim Y.O., Oh T.K. Biochemical properties and substrate specificities of alkaline and histidine acid phytases // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2004. V. 63. P. 362–372.
- Oh B.-C., Kim M.H., Yun B.-S., Choi W.-C., Park S.-C., Bae S.-C., Oh T.-K. Ca²⁺-inositol phosphate chelation mediates the substrate specificity of β-propeller phytase // Biochemistry. 2006. V. 45. P. 9531–9539.
- Pasamontes L., Haiker M., Wyss M., Tessier M., van Loon A.P. Gene cloning, purification, and characterization of a heat-stable phytase from the fungus *Aspergillus fumigatus* // Appl. Environ. Microbiol. 1997. V. 63. P. 1696–1700.
- Promdonkoy P., Tang K., Sornlake W., Harnpicharnchai P., Kobayashi S.R., Ruanglek V., Upathanpreecha T., Vesaratchavest M., Eurwilaichitr L., Tanapongpipat S. Expression and characterization of *Aspergillus* thermostable phytases in *Pichia pastoris* // FEMS Microbiol. Lett. 2009. V. 290. P. 18–24.
- Priyodip P., Prakash P.Y., Balaji S. Phytases of probiotic bacteria: Characteristics and beneficial aspects // Indian J. Microbiol. 2017. V. 57. P. 148–154.
- Priyodip P., Balaji S. Microbial degradation of myo-inositol hexakisphosphate (IP6): specificity, kinetics, and simulation // 3 Biotech, 2018. V. 8. P. 268.
- Puhl A., Greiner R., Selinger L.B. Stereospecificity of myo-inositol hexakisphosphate hydrolysis by a protein tyrosine phosphatase-like inositol polyphosphatase from *Megasphaera elsdenii* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2009. V. 82. P. 95–103.
- Ragon M., Hoh F., Aumelas A., Chiche L., Moulin G., Boze H. Structure of *Debaryomyces castellii* CBS 2923 phytase // Acta Cryst. 2009. V. 65. P. 321–326.
- Ragon M., Neugnot-Roux V., Chemardin P., Moulin G., Boze H. Molecular gene cloning and overexpression of the phytase from *Debaryomyces castellii* CBS 2923 // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2008. V. 78. P. 47–53.
- Rao K.V., Rao T.P., Reddy V.D. Molecular characterization, physicochemical properties, known and potential applications of phytases: An overview // Crit. Rev. Biotechnol. 2009. V. 29. P. 182–198.
- Richardson A.E., Hadobas P.A., Hayes J.E., O'Hara C.P., Simpson R.J. Utilization of phosphorus by pasture plants supplied with myo-inositol hexakisphosphate is enhanced by the presence of soil microorganisms // Plant Soil. 2001. P. 47–56.
- Richardson A.E., Hadobas P.A., Hayes J.E. Extracellular secretion of *Aspergillus* phytase from *Arabidopsis* roots enables plants to obtain phosphorus from phytate // Plant J. 2001. V. 25. P. 641–649.
- Rodriguez E., Mullaney E.J., Lei X.G. Expression of the *Aspergillus fumigatus* phytase gene in *Pichia pastoris* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2000. V. 268. P. 373–378.

- Roy M.P., Mazumdar D., Dutta S., Saha S.P. Cloning and expression of phytase *appA* gene from *Shigella* sp. CD2 in *Pichia pastoris* and comparison of properties with recombinant enzyme expressed in *E. coli* // PLoS ONE. 2016. V. P. 11–14.
- Roy M.P., Poddar M., Singh K.K., Ghosh S. Purification, characterization and properties of phytase from *Shigella* sp. CD2 // Ind. J. Biochem. Biophys. 2012. V. 49. P. 266–271.
- Secco D., Bouain N., Rouached A., Prom-U-Thai C., Hanin M., Pandey A.K., Rouached H. Phosphate, phytate and phytases in plants: from fundamental knowledge gained in *Arabidopsis* to potential biotechnological applications in wheat // Crit. Rev. Biotechnol. 2017. V. 37. P. 898–910.
- Sequeilha L., Lambrechts C., Boze H., Moulin G., Galzy P. Purification and properties of the phytase from *Schwanniomycetes castellii* // J. Ferment. Bioeng. 1992. V. 74. P. 7–11.
- Shamsuddin A.M., Vucenik I. IP6 and inositol in cancer prevention and therapy // Curr. Cancer Ther. Rev. 2005. V. 1. P. 259–269.
- Shen Y., Wang H., Pan G. Improving inorganic phosphorus content in maize seeds by introduction of phytase gene // Biotechnol. 2008. V. 7. P. 323–327.
- Shi X-W., Sun M-L., Zhou B., Wang X-Y. Identification, characterization and overexpression of a phytase with potential industrial interest // Can. J. Microbiol. 2009. V. 55. P. 599–604.
- Shin S., Ha N.C., Oh B.C., Oh T.K., Oh B.H. Enzyme mechanism and catalytic property of β -propeller phytase // Structure. 2001. V. 9. P. 851–858.
- Singh B., Satyanarayana T. Microbial phytases in phosphorus acquisition and plant growth promotion // Physiol. Mol. Biol. Plants. 2011. V. 17. P. 93–103.
- Sommerfeld V., Schollenberger M., Kuhn I., Rodehutschord M. Interactive effects of phosphorus, calcium, and phytase supplements on products of phytate degradation in the digestive tract of broiler chickens // Poultry Sci. 2018. V. 97. P. 1177–1188.
- Stahl C.H., Wilson D.B., Lei X.G. Comparison of extracellular *Escherichia coli* AppA phytases expressed in *Streptomyces lividans* and *Pichia pastoris* // Biotechnol. Lett. 2003. V. 25. P. 827–831.
- Suleimanova A.D., Beinhauer A., Valeeva L.R., Chastukhina I.B., Balaban N.P., Shakirov E.V., Greiner R., Sharipova M.R. Novel glucose-1-phosphatase with high phytase activity and unusual metal ion activation from soil bacterium *Pantoea* sp. strain 3.5.1. // Appl. Environm. Microbiol. 2015. V. 81. P. 1–10.
- Tomschy A., Tessier M., Wyss M., Brugger R., Broger C. Optimization of the catalytic properties of *Aspergillus fumigatus* phytase based on the three-dimensional structure // Protein Science. 2000. V. 9. P. 1304–1311.
- Touati E., Dassa E., Dassa J., Boquer P.I. Acid phosphatase (pH 2.5) of *Escherichia coli*: regulatory characteristics // Phosphat metabolism and cellular regulation in microorganisms / Eds. Torriani-Gorini A., Rothman F.G., Silver S., Wrigt A., Yagil E. Washington, DC: American Soc. Microbiol. 1987. P. 31–40.
- Tran T.T., Mamo G., Bo M., Hatti-Kaul R. A thermostable phytase from *Bacillus* sp. MD2: cloning, expression and high-level production in *Escherichia coli* // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2010. V. 37. P. 279–287.
- Tran T.T., Mamo G., Buxo L., Le N.N., Gaber Y., Mattiasson B., Hatti-Kaul R. Site-directed mutagenesis of an alkaline phytase influencing specificity, activity and stability in acidic milieu // Enzyme Microb. Technol. 2011. V. 49. P. 177–182.
- Turner B.L. Inositol phosphates in soil: Amounts, forms and significance of the phosphorylated inositol stereoisomers // Inositol Phosphates: Linking agriculture and the environment / Eds. Turner B.L., Richardson A.E., Mulvaney E.J. CABI, 2007. P. 186–203.
- Ushasree M.V., Shyam K., Vidya J., Pandey A. Microbial phytase: Impact of advances in genetic engineering in revolutionizing its properties and applications // Bioresource Technol. 2017. V. 245. Pt. B. P. 1790–1799.
- Vats P., Banerjee U.C. Production studies and catalytic properties of phytases (*myo*-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases): an overview // Enzyme Microb. Technol. 2004. V. 35. P. 3–14.
- Vohra A., Satyanarayana T. Phytases: microbial sources, production, purification and potential biotechnological applications // Crit. Rev. Biotechnol. 2003. V. 23. P. 29–60.
- Wyss M., Pasamontes L., Friedlein A., Remy R., Tessier M., Kronenberger A., van Loon A. Biophysical characterization of fungal phytases (*myo*-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases): molecular size, glycosylation pattern, and engineering of proteolytic resistance // Appl. Environ. Microbiol. 1999b. V. 65. P. 359–366.
- Wyss M., Brugger R., Kronenberger A., Remy R., Fimbel R., Oesterhelt G., Lehmann M., van Loon A.P. Biochemical characterization of fungal phytases (*myo*-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases): catalytic properties // Appl. Environ. Microbiol. 1999a. V. 65. P. 367–373.
- Wyss M., Pasamontes L., Remy R., Kohler J., Kuszniir E., Gadiant M., Muller F., van Loon A.P.G.M. Comparison of the thermostability properties of three acid phosphatases from molds: *Aspergillus fumigatus* phytase, *A. niger* phytase, and *A. niger* pH 2.5 acid phosphatase // Appl. Environ. Microbiol. 1998. V. 64. P. 4446–4451.
- Yao M.Z., Zhang Y.H., Lu W.L., Hu M.Q., Wang W., Liang A.H. Phytases: crystal structures, protein engineering and potential biotechnological applications // J. Appl. Microbiol. 2011. V. 112. P. 1–14.
- Yip W., Wang L., Cheng C., Wu W., Lung S., Lim B.-L. The introduction of a phytase gene from *Bacillus subtilis* improved the growth performance of transgenic tobacco // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2003. V. 310. P. 1148–1154.
- Yoon S.M., Kim S.Y., Li K.F., Yoon B.H., Choe S., Kuo M.M. Transgenic microalgae expressing *Escherichia coli* AppA phytase as feed additive to reduce phytate excretion in the manure of young broiler chicks // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2011. V. 91. P. 553–563.
- Zamudio M., Gonzalez A., Medina J.A. *Lactobacillus plantarum* phytase activity is due to non-specific acid phosphatase // Lett. Appl. Microbiol. 2001. V. 32. P. 181–184.

Histidine Acid Phytases of Microbial Origin

N. P. Balaban^{1,*}, A. D. Suleimanova¹, E. V. Shakirov^{1,2}, and M. R. Sharipova¹

¹*Kazan (Volga region) Federal University, Kazan, Russia*

²*The university of Texas at Austin, Texas, United States*

**e-mail: Nellybalaban@yandex.ru*

Received April 24, 2018

Abstract—This review is focused on analysis of the biological diversity of phytase-producing microorganisms capable of degrading phytate to inorganic phosphate. General approaches to microbial phytase classification are discussed, with a particular emphasis on histidine acid phytases (HAPs), which catalyze specific cleaving of *myo*-inositol hexakisphosphate. The effect of glycosylation and various effectors on enzyme thermostability and activity of phytases are described. The data on the biosynthesis of histidine acid phytases, their substrate specificity, and on the mechanism of *myo*-inositol hexakisphosphate hydrolysis are considered. A conclusion is made concerning the biotechnological potential of this group of microbial enzymes.

Keywords: histidine acid phytases, microorganisms, *myo*-inositol hexakisphosphate, biochemical properties, substrate specificity, phytate hydrolysis

БАКТЕРИИ РОДА *SPHAEROCHAETA* ИЗ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНЫХ
МЕСТОРОЖДЕНИЙ ТЯЖЕЛОЙ НЕФТИ (РОССИЯ)© 2018 г. С. Х. Биджиева^а, Д. Ш. Соколова^а, Т. П. Турова^а, Т. Н. Назина^а, *^аИнститут микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, 117312, Россия

*e-mail: nazina@inmi.ru

Поступила в редакцию 13.06.2018 г.

Бродильные бактерии являются постоянными компонентами микробного сообщества нефтяных пластов. Выделенные чистые культуры бродильных бактерий используют углеводы и белки и не растут на нефти, что обуславливает необходимость изучения их разнообразия и взаимоотношений в сообществе. В настоящей работе исследованы накопительные и чистые культуры бродильных бактерий, выделенные из пластовой воды низкотемпературных нефтяных месторождений России. Выполнено высокопроизводительное секвенирование V3–V4 региона гена 16S рРНК накопительной культуры. В полученной библиотеке выявлены гены анаэробных бактерий рода *Halanaerobium*, способных при росте на полисахаридах восстанавливать тиосульфат до сероводорода, и гены бактерии *Abyssivirga alkaniphila*, способной расти на C₅–C₂₅ n-алканах нефти в присутствии тиосульфата как акцептора электронов или синтрофно с водород-использующими метаногенами. Минорными компонентами сообщества были представители рода *Sphaerochaeta*. Из накопительных культур выделены три штамма (4-11, 5-8-5 и 17-50) анаэробных мезофильных галотолерантных бактерий, которые сбраживали ряд углеводов с образованием биомассы в виде биопленок. Последовательности генов 16S рРНК этих штаммов имели 99.5–100% сходства между собой и 97.2–98.0% сходства с генами ближайших видов *Sphaerochaeta associata* и *S. globosa*, что свидетельствует о принадлежности штаммов к новому виду рода *Sphaerochaeta*. Продуктами брожения мальтозы были ацетат, пропионат, CO₂, H₂ и иногда изопропанол. Штаммы не росли на сырой нефти. Высказано предположение, что в нефтяном пласте сферохеты потребляют продукты биodeградации нефти, образуемые другими микроорганизмами, участвуют в формировании биопленок и поставляют молекулярный водород метаногенам и другим компонентам сообщества.

Ключевые слова: нефтяные пласты, бродильные бактерии, высокопроизводительное секвенирование, ген 16S рРНК, *Sphaerochaeta*

DOI: 10.1134/S0026365618060046

Представители филума *Spirochaetes* являются минорной, но часто встречающейся группой прокариот в низкотемпературных нефтяных пластах и метаногенных накопительных культурах, деградирующих n-алканы (Grabowski et al., 2005; Dahle et al., 2008; Pham et al., 2009; van der Kraan et al., 2010; Tang et al., 2012; Silva et al., 2013). Грей и соавт. (Gray et al., 2010) суммировали материалы 26 публикаций, посвященных изучению состава микробных сообществ нефтяных пластов и загрязненных нефтью водоносных горизонтов, осадков и почв, исследованных методом клонирования генов 16S рРНК. Гены представителей *Firmicutes* встречались в 86% из 26 проанализированных библиотек, гены *Gamma*-, *Delta*-, *Epsilon*-, *Beta*- и *Alphaproteobacteria* встречались в 62, 62, 42, 46 и 58% библиотек соответственно; гены бактерий *Chloroflexi*, *Thermotogae*, *Nitrospira* и *Spirochaetes* присутствовали в 50, 23, 35 и 23% библиотек соответственно. Клонированные последова-

тельности спирохет встречались также в библиотеке, созданной на основе РНК микроорганизмов нефтяного пласта, и, таким образом, принадлежали к группе метаболически активных прокариот (Nazina et al., 2017). Использование метода высокопроизводительного секвенирования генов 16S рРНК позволило выявить в составе микробных сообществ нефтяных пластов представителей редко встречающихся таксонов *Acidobacteria*, *Armatimonadetes*, филумов кандидатов OD1, OP9 и TM7, *Chlorobi*, *Chloroflexi*, *Dictyoglomi*, *Elusimicrobia*, *Fusobacteria*, *Gemmatimonadetes*, *Lentisphaerae* и *Spirochaetes* (Folarin et al., 2013; Wang et al., 2014; Gao et al., 2015).

Первая чистая культура анаэробных спирохет, выделенная из нефтяных пластов (Конго), была отнесена к новому виду *Spirochaeta smaragdinae* (Magot et al., 1997). Типовой штамм SEBR 4228^T рос в присутствии 5% NaCl, в интервале температуры от 20 до 40°C и pH от 5.5 до 8.0. Штамм сбра-

живал углеводы, пептиды, нуждался в дрожжевом экстракте для роста. В среде с глюкозой и тиосульфатом продуктами брожения были лактат, ацетат, CO_2 и H_2S ; в отсутствие тиосульфата в среде накапливались лактат, этанол, CO_2 и H_2 . Недавно бактерия была перенесена в новый род *Sediminispirochaeta smaragdinae* comb. nov. (Shivani et al., 2016). Вторая анаэробная спирохета, выделенная из нефтяного пласта (Конго), отнесена к новому роду и виду *Pleomorphochaeta caudata* (Argoia et al., 2017). Какие компоненты нефти или продукты ее биодеградации используются спирохетами в нефтяном пласте, остается неясным.

Накопительные культуры бродильных бактерий, выделенные из заводняемых нефтяных пластов Восточно-Анзирского и Черёмуховского месторождений, образовывали от 300 до 1800 мг ацетата/л при росте в средах с пептоном и глюкозой (Назина и соавт., 2018) и содержали филогенетически разнообразное микробное сообщество, включающее бактерий рода *Sphaerochaeta*. Растворение карбонатных пород органическими кислотами и снижение вязкости нефти растворителями, продуцируемыми бродильными бактериями из сахаросодержащих субстратов типа мелассы — известные механизмы повышения нефтеизвлечения, что и обусловило особое внимание к группе бродильных бактерий.

Целью настоящей работы было изучение филогенетического разнообразия бродильных бактерий, полученных из пластовой воды низкотемпературных нефтяных месторождений, выделение чистых культур и изучение их таксономического положения и метаболического потенциала.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования. В июне 2016 г. были отобраны пробы пластовой воды из добывающей скважины 245Д на Восточно-Анзирском месторождении и из скважин 5454 и 5452 на Черёмуховском нефтяном месторождении. Оба нефтяных месторождения эксплуатируются путем заводнения пресной водой, смешанной с пластовой водой, оставшейся после сепарации нефти. В связи с поступлением пресных вод происходит разбавление природной высокоминерализованной пластовой воды хлоридно-натриевого типа, и ее общая соленость снижается со 187 до 12–72 г/л в районе исследованных добывающих скважин. Нефтяные пласты имели температуру 20–23°C. Пластовая вода из скважин 5454 и 245Д содержала, соответственно, 26 и 12 мг ацетата/л, 293 и 171 мг HCO_3^- /л, pH — 7.70 и 6.27; скорость сульфатредукции составляла 1.911 и 1.982 мкг S^{2-} /(л · сут), скорость метаногенеза — 262 и 9045 нл CH_4 /(л · сут). Основные физико-химические и микробиологические параметры исследованных проб пласто-

вой воды приведены в ранее опубликованной работе (Назина и соавт., 2017). Пробы отбирали на устье добывающих скважин в стерильные бутылки и герметично закрывали. В течение 4–6 ч аликвоты каждой пробы инокулировали в стерильную селективную среду методом предельных разведений для получения накопительных культур бродильных микроорганизмов.

Состав сред. Для получения накопительных культур бродильных микроорганизмов использовали среду с пептоном (4 г/л) и глюкозой (10 г/л) (Postgate, 1984). Для последующих пересевов использовали модифицированную среду Пфеннига, содержащую (г/л): $\text{MgCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ — 0.33; $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ — 0.33; KCl — 0.33; NH_4Cl — 0.33; KH_2PO_4 — 0.33; в среду вносили 1 мл раствора микроэлементов (Кевбрин, Заварзин, 1992), 1 мл раствора витаминов (Wolin et al., 1963), дрожжевой экстракт (50–100 мг/л) и при необходимости $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (0.6 г/л); pH среды составлял 7.0. В среду вносили 5 или 40 г NaCl /л. Среду готовили в атмосфере аргона, очищенного от кислорода. В предварительно продутые аргоном пробирки Хангейта (15 мл) вносили по 10 мл анаэробно приготовленной среды, затем шприцом вносили пластовую воду из скважины 245Д Восточно-Анзирского месторождения и скважин 5454 и 5452 Черёмуховского месторождения. Посевы инкубировали при 28°C. Рост полученных накопительных культур бродильных бактерий, обозначенных f245D, f5454 и f5452, определяли микроскопированием по увеличению числа клеток и газохромографически по образованию молекулярного водорода в средах с углеводами.

Выделение чистых культур. Чистые культуры анаэробных бродильных бактерий получали методом десятикратных разведений из накопительных культур в жидкой модифицированной среде Пфеннига с добавлением 0.1 г/л дрожжевого экстракта, 2 г/л сахарозы и 5 г/л NaCl . В ходе последовательных пересевов из наибольших разведений были получены 3 штамма. Для проверки культур на чистоту из последнего разведения, показавшего рост (10^{-7}), производили пересев на среду с пептоном и глюкозой, инкубировали при 28°C в течение 5–7 сут, а затем определяли последовательность гена 16S рПНК. В качестве источников углерода и энергии для роста штаммов использовали глюкозу, сахарозу, галактозу, фруктозу, целлобиозу, мальтозу, рибозу, рафинозу, трегалозу, лактозу, арабинозу, ксилозу, крахмал, пептон, дрожжевой экстракт, ксилан, лактат, ацетат, фумарат или пируват (по 2 г/л) и сырую девонскую нефть (1% об./об.). В качестве акцепторов электронов служили натриевые соли тиосульфата (3.2 г/л), сульфата (3.5 г/л) и нитрата (2.0 г/л) или фумарата (2 г/л). Способность выделенных чистых культур использовать разные ак-

цепторы электронов проверяли в среде с мальтозой и дрожжевым экстрактом. Способность к денитрификации устанавливали на среде с нитратом натрия (50 мМ) по образованию N_2 (газохроматографически) и нитрита (с реактивом Грисса). Восстановление сульфата и тиосульфата определяли по образованию H_2S . Все эксперименты по определению доноров и акцепторов электронов проводили в трех повторностях в трех последовательных пересевах. Морфологию и численность клеток и физиологическое состояние культур оценивали с помощью светового микроскопа с фазово-контрастным устройством.

Аналитические методы. Молекулярный водород, азот и метан в газовой фазе определяли хроматографическим методом; сероводород определяли колориметрически по методу Пахмайра с *N,N*-диметил-*p*-фенилендиамином, как описано ранее (Bonch-Osmolovskaya et al., 2003). Летучие кислоты и низшие спирты анализировали на газовом хроматографе Shimadzu GC 2010 Plus (Япония) с колонкой Zebron ZB-FFAP (30 м × 0.32 мм × 0.25 мкм). Анализ проводили с программированием температуры на колонке от 40 до 150°C, со скоростью изменения 10°C/мин. Температура испарителя и детектора составляла 250°C. В качестве газа-носителя использовали гелий, который подавали со скоростью 34 мл/мин.

Выделение ДНК, амплификация и секвенирование. ДНК из накопительной культуры f245D и из чистых культур выделяли стандартным методом (Maniatis et al., 1982). Бактерии идентифицировали методом анализа гена 16S рРНК с праймерами 8-27f/1492r (Lane, 1991). Для получения библиотеки генов 16S рРНК бродильной накопительной культуры был амплифицирован V3–V4 гипервариабельный регион этого гена, и на основе двойного баркодирования были приготовлены библиотеки, как описано ранее (Fadrosh et al., 2014). Смысловые участки праймеров были взяты в соответствии с парой праймеров Pro341F–Pro805R (Takahashi et al., 2014). Секвенирование проводили на платформе MiSeq (“Illumina”, США) с использованием набора реагентов MiSeq Reagent Kit v3 (600 cycles) (“Illumina”, США) в соответствии с рекомендациями производителя.

Биоинформатический анализ. Полученные фрагменты генов 16S рРНК были обрезаны с помощью программы trimmomatic-0.36 по алгоритму SLIDINGWINDOW:4:15 (Bolger et al., 2014), правосторонние и левосторонние прочтения были объединены с помощью программы SeqPrep (<https://github.com/jstjohn/SeqPrep>). Далее обработка последовательностей проводилась при помощи программы Qiime (Sarogaso et al., 2010) и включала в себя демультиплексирование и фильтрацию химер. Последовательности с уровнем сходства >98% объединяли в операционные так-

сономические единицы (ОТЕ) и идентифицировали с использованием онлайн-ресурса SILVA (Quast et al., 2014).

Филогенетический анализ последовательностей генов 16S рРНК выделенных штаммов проводили с использованием программы BLAST сервера NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/). Для выравнивания последовательностей использовали программу Clustal X (Thompson et al., 1997). Для построения деревьев использовали программу TREECONW (Van de Peer, De Wachter, 1994).

Последовательности генов 16S рРНК штаммов 17-50, 5-8-5 и 4-11 были депонированы в Генбанк под номерами MN456877, MN456878 и MN456879 соответственно. Библиотека фрагментов гена 16S рРНК микроорганизмов накопительной культуры f245D депонирована в NCBI SRA под номером SRP144671.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Филогенетическое разнообразие культуры бродильных бактерий из пластовой воды низкотемпературного нефтяного месторождения. Накопительные культуры бродильных бактерий f245D, f5454 и f5452, полученные путем посева пластовой воды из добывающих скважин 245Д, 5454 и 5452 на среде с пептоном и глюкозой, содержащую 5 и 40 г NaCl/л, охарактеризовались обильным ростом в среде с большей соленостью. Культуры продуцировали 400, 1750 и 1844 мг ацетата/л среды; при этом рН среды снижали с 7.0 до 5.0, 5.6 и 5.4 соответственно. В газовой фазе всех трех культур было зарегистрировано образование молекулярного водорода и углекислоты. В жидкой среде культура f245D накапливала большую биомассу и росла в виде слизистых нитей, заполненных многочисленными газовыми пузырьками, которые обеспечивали их вертикальный рост (рис. 1а). Образующийся газ скапливался внутри биопленок в виде окруженных слизью пузырьков (рис. 1б). При микроскопировании жидкой среды отмечено большое морфологическое разнообразие накопительных культур, содержащих палочковидные, вибриоидные и кокковидные клетки, тогда как в биопленках преобладали кокковидные клетки разного размера, морфологически напоминающие сферохет (рис. 1в) (Troshina et al., 2015).

Одна из первичных накопительных культур – f245D, полученная в среде с соленостью 40 г NaCl/л, была исследована методом высокопроизводительного секвенирования V3–V4 региона гена 16S рРНК, что позволило выявить уникальное микробное сообщество. С помощью онлайн-ресурса SILVA показано, что все полученные 10000 фрагментов генов 16S рРНК принадлежали представителям домена *Bacteria*. В состав библиотеки входили 43 операционные таксономические

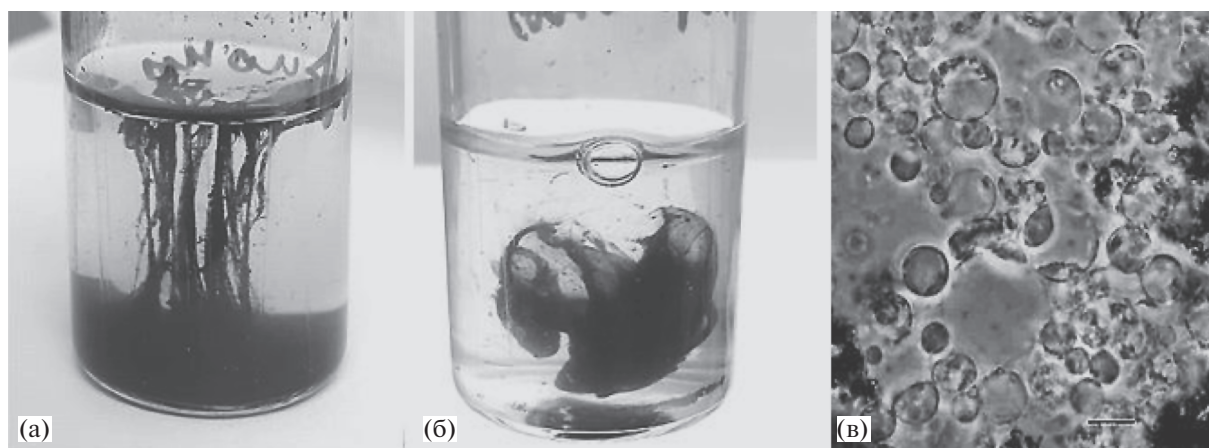


Рис. 1. Рост накопительной культуры f245D броидильных бактерий в среде с пептоном и глюкозой в виде слизистых нитей (а) и биопленок (б), заполненных газовыми пузырьками, и морфологическое разнообразие клеток в биопленках, демонстрирующее преобладание кокковидных клеток, напоминающих сферохет (в).

единицы (филотипы) с уровнем сходства более 98%, таксономическое разнообразие которых представлено в табл. 1. В библиотеке численно преобладали последовательности бактерий филума *Firmicutes* (88% от общего числа последовательностей), принадлежащие *Halanaerobium praevalens* (37%), *Abyssivirga alkaniphila* (32%) и Arctic bacterium NP25 (19%); филум *Epsilonproteobacteria* был представлен последовательностями *Arcobacter marinus* (11%). Бактерии *H. praevalens* и *A. alkaniphila* являются облигатными анаэробами, сбраживающими сахара, белки и/или аминокислоты при повышенной солености среды (Zeikus et al., 1983; Schouw et al., 2016). Бактерии рода *Halanaerobium* распространены в нефтяных пластах, они способны восстанавливать тиосульфат с образованием сероводорода, сбраживая полисахаридные по-

лимеры, нагнетаемые в нефтяной пласт (Liang et al., 2016). Бактерия *A. alkaniphila* растет на *n*-алканах нефти с длиной цепи C_5-C_{25} в присутствии тиосульфата как акцептора электронов или синтрофно с водород-использующим метаногеном *Methanothermococcus okinawensis* (Schouw et al., 2016). Органотрофная бактерия *A. marinus* способна расти аэробно и микроаэробно при морской солености среды. Минорные филотипы были представлены анаэробными бактериями родов *Sphaerochaeta* и *Geotoga*, факультативно анаэробной органотрофной бактерией *Enterobacter xiangfangensis* и аэробными *Pseudomonas plecoglossicida* и *Aquabacterium commune*.

Выделение чистых культур броидильных бактерий и их идентификация. Из накопительных культур f245D, f5454 и f5452 были выделены, соответ-

Таблица 1. Таксономическое разнообразие представителей домена *Bacteria* в накопительной культуре броидильных бактерий f245D, определенное на основании высокопроизводительного секвенирования ампликонов гена 16S рНК (V3–V4 регион)

Филум, ближайший культивируемый родственник (% сходства генов 16S рНК)	% от количества последовательностей в библиотеке
Доминантные филотипы (>1% от общего количества последовательностей)	
<i>Firmicutes</i> , <i>Halanaerobium praevalens</i> (99)	37
<i>Firmicutes</i> , <i>Abyssivirga alkaniphila</i> (99)	32
<i>Firmicutes</i> , Arctic bacterium NP25 (97)	19
<i>Epsilonproteobacteria</i> , <i>Arcobacter marinus</i> (98)	11
Минорные филотипы (<1% от общего количества последовательностей)	
<i>Thermotogae</i> , <i>Geotoga subterranea</i> (100)	0.8
<i>Betaproteobacteria</i> , <i>Aquabacterium commune</i> (99)	0.01
<i>Gammaproteobacteria</i> , <i>Pseudomonas plecoglossicida</i> (99)	0.01
<i>Gammaproteobacteria</i> , <i>Enterobacter xiangfangensis</i> (99)	0.01
<i>Spirochaetes</i> , <i>Sphaerochaeta globosa</i> (97)	0.03

ственно, три чистые культуры – штаммы 4-11, 5-8-5 и 17-50. Все штаммы были представлены клетками кокковидной формы диаметром 1–3 мкм и проявляли плеоморфный рост. Хотя плеоморфные клетки присутствовали в культурах бродильных бактерий, растущих в присутствии 5 и 40 г NaCl/л, в среде с меньшей соленостью было проще избавиться от сопутствующей микробиоты. Последовательности генов 16S рРНК новых изолятов имели 99.5–100% сходства между собой и 99.2–99.8% сходства с фрагментом гена (OTU-f245d) из библиотеки накопительной культуры f245D. Таким образом, оказалось возможным выделить в чистую культуру минорный компонент, доля которого не превышала 0.03% в составе сообщества накопительной культуры. Высокий уровень сходства генов 16S рРНК (99–100%) новых штаммов был обнаружен также с геном *Spirochaeta* sp. MET-E из нефтяного пласта (Конго) и клонированными последовательностями генов некультивируемых спирохет, полученных при исследовании бактериальных сообществ нефтяных пластов (Dahle et al., 2008; Pham et al., 2009). Таким образом, представители семейства *Spirochaetaceae*, близкородственные выделенным нами штаммам, широко распространены в экосистемах нефтяных пластов.

На филогенетическом дереве (рис. 2) последовательности генов 16S рРНК штаммов 4-11, 5-8-5 и 17-50 располагались в кластере генов бактерий рода *Sphaerochaeta* и имели 97.2–98.0% сходства с генами ближайших видов *Sphaerochaeta associata* GLS2^T и *Sphaerochaeta globosa* Buddy^T (Ritalahti et al., 2012; Troshina et al., 2015). Низкий уровень сходства с генами бактерий рода *Sphaerochaeta* свидетельствует о принадлежности выделенных штаммов к новому виду этого рода.

Род *Sphaerochaeta* относится к семейству *Spirochaetaceae* и включает анаэробные мезофильные, нейтрофильные бактерии с бродильным типом метаболизма (Ritalahti et al., 2012). В настоящее время род представлен четырьмя видами – *Sphaerochaeta associata*, *S. coccoides*, *S. globosa* и *S. pleomorpha* (Dröge et al., 2006; Ritalahti et al., 2012; Abt et al., 2012; Troshina et al., 2015). Представители рода – это свободноживущие неподвижные бактерии преимущественно кокковидной формы. Отличительной особенностью рода является отсутствие в геноме представителей генов, кодирующих характерный для спирохет жгутиковый аппарат, а также пенициллинсвязывающих белков, придающих жесткость бактериальной клеточной стенке и способствующих устойчивости *Sphaerochaeta* к β-лактамам антибиотикам (например, ампицилину). Предположительно, с этим связана и сферическая форма клеток. Другой особенностью сферохет является наличие крупных генных кластеров, характерных для представителей порядка *Clostridiales*, кодирую-

щих белки метаболических путей, в частности, углеводного метаболизма. Бактерии рода *Sphaerochaeta* встречаются в местообитаниях с анаэробными условиями, в том числе, в пресноводных осадочных отложениях, кишечнике термитов, метаногенных реакторах, в нефтяных пластах.

Филогенетический анализ генов 16S рРНК и ростовые эксперименты показали, что штаммы 4-11, 5-8-5 и 17-50 практически идентичны, поэтому штамм *Sphaerochaeta* sp. 4-11 был выбран для дальнейших исследований в качестве репрезентативного штамма. Наилучший рост штамма 4-11 наблюдали при 35°C и pH 6.0–6.5, близких таковым *S. coccoides* SPN1^T и *S. globosa* Buddy^T (табл. 2) (Abt et al., 2012). Штамм 4-11 рос в широком интервале солености среды, с оптимумом 1% NaCl; в присутствии 1 и 80 г/л NaCl рост не наблюдался, что позволяет отнести штамм к группе слабо галофильных бактерий. Штамм 4-11 сбраживал ряд углеводов (табл. 2, 3), снижая pH среды с 7.0 до 4.8–5.0. Рост культуры на сахарозе, галактозе и трегалозе сопровождался образованием крупных пузырьвидных плеоморфных структур, ассоциированных с кокками разного диаметра. Продуктами брожения мальтозы были ацетат, пропионат и иногда изопропанол, в газовой фазе накапливались CO₂ и H₂. Сульфат, тиосульфат или нитрат, внесенные в среду в качестве акцепторов электронов, не стимулировали рост штамма на мальтозе и продукты их восстановления (H₂S, NO₂⁻ и N₂) не были обнаружены.

Исследовано отношение штамма 4-11 к сырой нефти. Культивирование штамма в стационарном режиме в жидкой среде с сырой девонской нефтью в течение 145 сут в отсутствие других субстратов не позволило выявить его рост (хроматографические данные не представлены). Обогащение среды с нефтью дополнительным источником углерода (сахарозой) и/или фумаратом, используемым для активации анаэробного окисления *n*-алканов, стимулировало рост культуры и сопровождалось увеличением продуктов метаболизма (табл. 3). Отметим, что фумарат не использовался штаммом в качестве источника углерода, но стимулировал его рост в среде с сахарозой (табл. 3), что выражалось в замене ацетата на изопропанол в составе продуктов брожения, увеличении содержания углекислоты в газовой фазе с 13.2 до 25.1%; концентрация молекулярного водорода почти не изменялась (10.8 и 10.5%). Таким образом, распространение сферохет в нефтяном пласте зависит от других компонентов микробного сообщества, способных воздействовать на нефть. Вероятно, сферохеты потребляют продукты биодеградации нефти, участвуют в формировании биопленки и поставляют молекулярный водород метаногенам и другим компонентам сообщества. Учитывая, что при брожении сферохеты накапливают продукты (ацетат, пропи-

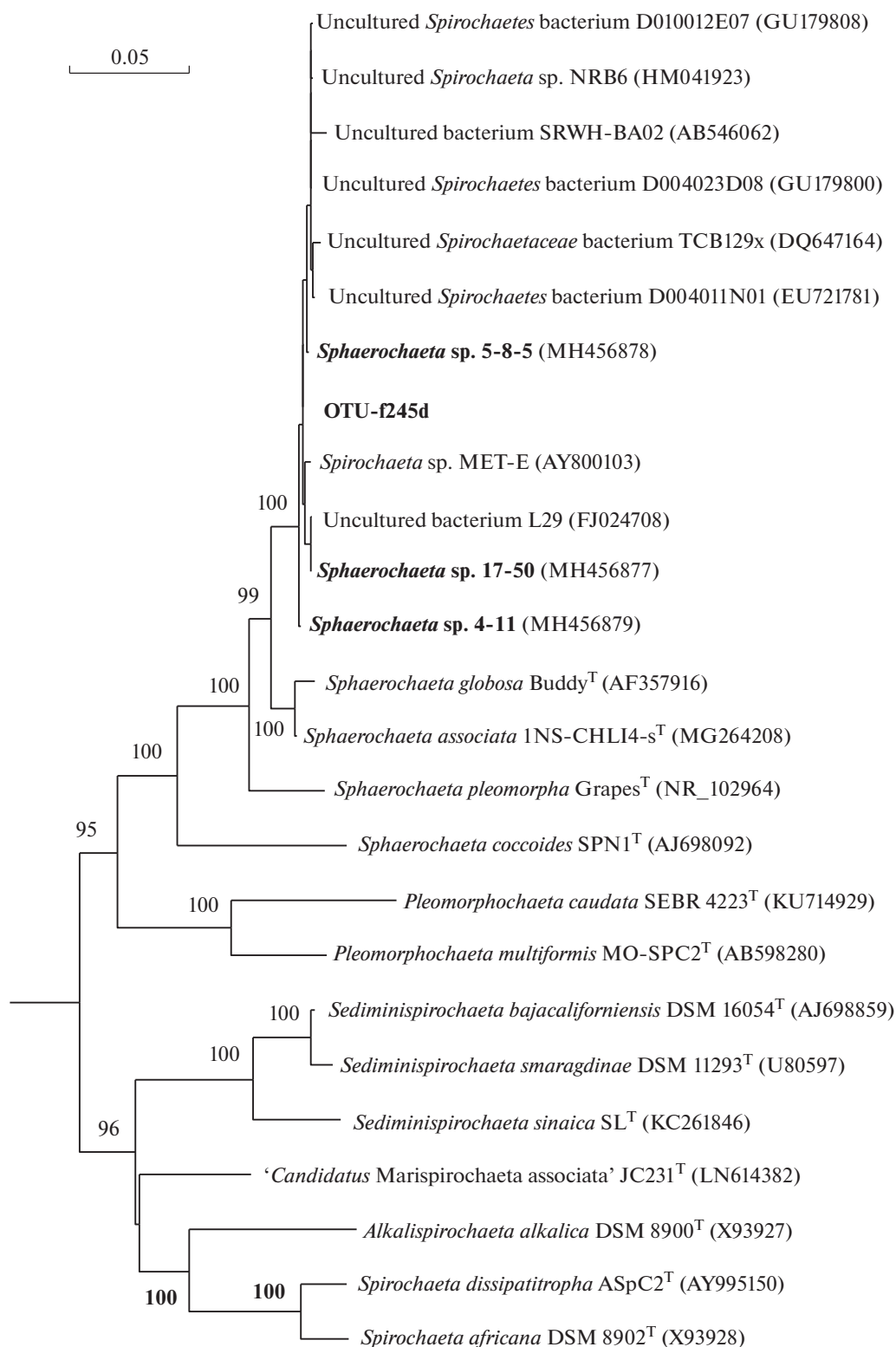


Рис. 2. Филогенетическое дерево бактерий семейства *Spirochaetaceae*, основанное на анализе последовательностей генов 16S рРНК типовых штаммов видов рода *Sphaerochaeta* и некоторых других родов, новых штаммов, выделенных из нефтяных пластов, а также ближайших к ним клонированных последовательностей некультивируемых сферохет из GenBank. Дерево построено с использованием алгоритма neighbor-joining (в качестве внешней группы использована последовательность *Escherichia coli*). Масштаб показывает эволюционное расстояние, соответствующее 5 заменам на каждые 100 нуклеотидов. Цифрами показана достоверность ветвления на основании "bootstrap"-анализа 100 альтернативных деревьев (значимыми признаются значения больше 85%).

Таблица 2. Диагностические признаки *Sphaerochaeta* sp. 4-11 и типовых штаммов известных видов рода *Sphaerochaeta*

Признак	Штамм 4-11	<i>S. associata</i> GLS2 ^T	<i>S. globosa</i> Buddy ^T	<i>S. pleomorpha</i> Grapes ^T	<i>S. coccoides</i> SPN1 ^T
Размер клеток, мкм	1–3	0.2 × 1.2–2(4)	0.5–1.2	0.8–2	0.5–2
$T_{\min/opt/\max}$, °C	20/35/40	20/30–34/40	20/30/37	15/20–25/30	15/30/40
pH, opt	6.0–6.5	6.8–7.5	6.5–7.5	6.5–7.5	7.4
NaCl, opt, г/л	10–15	1–2	1	1	1
Г + Ц, мол. %	Н.д.	47.2	46.5 ± 0.4	48.1 ± 1.1	56.6–57.4
Источники углерода:					
D-галактоза	+	+	+	+	–
D-фруктоза	+	–	+	+	Н.д.
D-ксилоза	+	+	+	+	+
Сахароза	+	(+)	+	+	Н.д.
Мальтоза	+	+	+	–	+
Рафиноза	+	+	+	+	Н.д.
Арабиноза	+	+	(+)	(+)	+
Целлобиоза	+/-	+	Н.д.	Н.д.	+
D-Глюкоза	–	(+)	+	+	–
Лактоза	–	(+)	+	–	Н.д.
Лактат	–	+	Н.д.	Н.д.	–
Крахмал	–	(+)	+	+	Н.д.
Дрожжевой экстракт	–	–	Н.д.	Н.д.	+
Ацетат	–	–	Н.д.	Н.д.	Н.д.
Пропионат	–	–	Н.д.	Н.д.	Н.д.
Ксилан	–	–	–	Н.д.	–
Фумарат	–	–	Н.д.	Н.д.	Н.д.
Пируват	–	–	Н.д.	Н.д.	–
Бензоат	Н.д.	–	Н.д.	Н.д.	Н.д.
Продукты брожения:					
Ацетат	+	Н.д.	Н.д.	+	+
Формиат	–	Н.д.	Н.д.	+	+
Этанол	–	Н.д.	Н.д.	+	+
Изопропанол	+	Н.д.	Н.д.	–	–
CO ₂ /H ₂	+	Н.д.	Н.д.	–	–
Акцепторы электронов:					
Сульфат	–	–	–	–	Н.д.
Тиосульфат	–	–	–	–	Н.д.
Фумарат	+ (сахароза)	–	–	–	Н.д.
Нитрат	–	–	–	–	Н.д.
Fe(III)		+ (ксилоза)	–	–	Н.д.
Источник выделения	Нефтяной пласт	Синтрофная ассоциация	Анаэробные осадки реки		Кишечник термитов
Ссылка	Настоящая работа	Troshina et al., 2015	Ritalahti et al., 2012		Dröge et al., 2006

Обозначения: Н.д. – нет данных; “+” – положительный результат; “–” – отрицательный результат; “(+)” – слабый рост.

Таблица 3. Продукты метаболизма штамма *Sphaerochaeta* sp. 4-11, образуемые при росте на разных субстратах

Вариант опыта, субстрат	Продукты				
	CO ₂ , %	H ₂ , %	ацетат, мг/л	пропионат, мг/л	изопропанол, мг/л
Контроль (среда с посевным материалом)	0.28	0.46	0	0	0
Нефть	0.86	0.51	0	0	0
Фумарат	0.59	0.53	0	0	0
Сахароза	13.22	10.83	124.3	0	106.2
Сахароза + фумарат	25.1	10.6	0	0	307.2
Сахароза + фумарат + нефть	23.95	6.95	0	0	282.6
Мальтоза	14	9	162.4	88.3	0
Галактоза	9.8	3.8	0	0	121.4

онат или изопропанол) в невысокой концентрации, сложно надеяться на большой биотехнологический потенциал этой малочисленной группы прокариот. Вероятно, в накопительных культурах за образование большого количества ацетата отвечали доминирующие компоненты сообщества, которые в ходе настоящей работы не были выделены. Присутствие сферохет в накопительной культуре f245D, полученной в среде с соленостью 40 г NaCl/л, совместно с галофильной бактерией *Halanaerobium praevalens* и галотолерантными *Abyssivirga alkaniphila* и *Arcobacter marinus* обусловлено галотолерантностью сферохет. Способность штамма 4-11 к росту в присутствии 5–80 г NaCl/л является его основным фенотипическим отличием от *S. associata* GLS2^T, *S. globosa* Buddy^T и *S. coccoides* SPN1^T, характеризующихся ростом в слабоминерализованной среде (1–2 г/л) (табл. 2).

Ряд диагностических признаков штамма *Sphaerochaeta* sp. 4-11, приведенных в табл. 2, позволяет дифференцировать штамм от других видов рода *Sphaerochaeta*. Штамм 4-11, как и представители филогенетически близких видов *S. associata* и *S. globosa*, сбрасывал моно-, олиго- и полисахариды. От бактерии *S. associata* штамм 4-11 отличался отсутствием роста в средах с глюкозой, лактозой, лактатом (Troshina et al., 2015). Необходимы дальнейшие фенотипические и геномные исследования выделенных галотолерантных штаммов рода *Sphaerochaeta* для определения их таксономического положения и функциональной роли в микробном сообществе нефтяного пласта.

Авторы выражают благодарность А.Ю. Меркелю (ФИЦ Биотехнологии РАН) за выполнение работы по высокопроизводительному секвенированию генов 16S рРНК культуры бродильных бактерий. Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (проект № 16-14-00028).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Кевбрин В.В., Заварзин Г.А. Влияние соединений серы на рост галофильной гомоацетатной бактерии *Acetohalobium arabaticum* // Микробиология. 1992. Т. 61. С. 812–817.
- Назина Т.Н., Соколова Д.Ш., Бабич Т.Л., Семенова Е.М., Еришов А.П., Биджиева С.Х., Борзенков И.А., Полтараус А.Б., Хисаметдинов М.Р., Турова Т.П. Микроорганизмы низкотемпературных месторождений тяжелой нефти (Россия) и возможность их применения для вытеснения нефти // Микробиология. 2017. Т. 86. № 6. С. 748–761.
- Nazina T.N., Sokolova D.Sh., Babich T.L., Semenova E.M., Ershov A.P., Bidzhieva S.Kh., Borzenkov I.A., Poltaraus A.B., Khisametdinov M.R., Tourova T.P. Microorganisms of low-temperature heavy oil reservoirs (Russia) and their possible application for enhanced oil recovery // Microbiology (Moscow). 2017. V. 86. P. 773–785.
- Abt B., Han C., Scheuner C., Lu M., Lapidus A., Nolan M., Lucas S., Hammon N., Deshpande S., Cheng J.-F., Tapia R., Goodwin L., Pitluck S., Mavromatis K., Mikhailova N., Huntemann M., Pati A., Chen A., Palaniappan K., Land M., Hauser L., Brambilla E., Rohde M., Spring S., Gronow S., Goker M., Woyke T., Bristow J., Eisen J.A., Markowitz V., Hugenholtz P., Kyrpides N.C., Klenk H.-P., Dettler J.C. Complete genome sequence of the termite hindgut bacterium *Spirochaeta coccoides* type strain (SPN1T), reclassification in the genus *Sphaerochaeta* as *Sphaerochaeta coccoides* comb. nov. and emendations of the family *Spirochaetaceae* and the genus *Sphaerochaeta* // Stand. Genom. Sci. 2012. V. 6. P. 194–209.
- Arroua B., Ranchou-Peyruse A., Ranchou-Peyruse M., Magot M., Urios L., Grimaud R. *Pleomorphochaeta caudata* gen. nov., sp. nov., an anaerobic bacterium isolated from an offshore oil well, reclassification of *Sphaerochaeta multiformis* MO-SPC2T as *Pleomorphochaeta multiformis* MO-SPC2T comb. nov. as the type strain of this novel genus and emended description of the genus *Sphaerochaeta* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2017. V. 67. P. 417–424.
- Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data // Bioinformatics. 2014. V. 30. P. 2114–2120.
- Bonch-Osmolovskaya E.A., Miroshnichenko M.L., Lebedinsky A.V., Chernyh N.A., Nazina T.N., Ivoilov V.S., Belyaev S.S.,

- Boulygina E.S., Lysov Yu.P., Perov A.N., Mirzabekov A.D., Hippe H., Stackebrandt E., L'Haridon S., Jeanthon C.* Radioisotopic, culture-based, and oligonucleotide microchip analyses of thermophilic microbial communities in a continental high-temperature petroleum reservoir // *Appl. Environ. Microbiol.* 2003. V. 69. P. 6143–6151.
- Caporaso J.G., Kuczynski J., Stombaugh J., Bittinger K., Bushman F.D., Costello E.K., Fierer N., Peña A.G., Goodrich J.K., Gordon J.I., Huttley G.A., Kelley S.T., Knights D., Koenig J.E., Ley R.E., Lozupone C.A., McDonald D., Muegge B.D., Pirrung M., Reeder J., Sevinsky J.R., Turnbaugh P.J., Walters W.A., Widmann J., Yatsunenko T., Zaneveld J., Knight R.* QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data // *Nat Methods.* 2010. V. 7. P. 335–336.
- Dahle H., Garshol F., Madsen M., Birkeland N.* Microbial community structure analysis of produced water from a high-temperature North Sea oil-field // *Antonie van Leeuwenhoek.* 2008. V. 93. P. 37–49.
- Dröge S., Fröhlich J., Radek R., König H.* *Spirochaeta coccoides* sp. nov., a novel coccoid spirochete from the hindgut of the termite *Neotermes castaneus* // *Appl. Environ. Microbiol.* 2006. V. 72. P. 392–397.
- Fadrosh D.W., Ma B., Gajer P., Sengamalay N., Ott S., Brotman R.M., Ravel J.* An improved dual-indexing approach for multiplexed 16S rRNA gene sequencing on the Illumina MiSeq platform // *Microbiome.* 2014. V. 2. P. 6.
- Folarin Y., An D., Caffrey S., Soh J., Sensen C.W., Voordouw J., Jack T., Voordouw G.* Contribution of make-up water to the microbial community in an oilfield from which oil is produced by produced water re-injection // *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 2013. V. 81. P. 44–50.
- Gao P., Tian H., Li G., Sun H., Ma T.* Microbial diversity and abundance in the Xinjiang Luliang long-term water-flooding petroleum reservoir // *Microbiology Open.* 2015. V. 4. P. 332–342.
- Grabowski A., Nercessian O., Fayolle F., Blanchet D., Jeanthon C.* Microbial diversity in production waters of a low-temperature biodegraded oil reservoir // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2005. V. 54. P. 427–443.
- Gray N.D., Sherry A., Hubert C., Dolfing J., Head I.M.* Methanogenic degradation of petroleum hydrocarbons in subsurface environments remediation, heavy oil formation, and energy recovery // *Adv. Appl. Microbiol.* 2010. V. 72. P. 137–161.
- Lane D.J.* 16S/23S rRNA sequencing // *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics* / Eds. Stackebrandt E., Goodfellow. M. New York: John Wiley & Sons, 1991. P. 115–175.
- Liang R., Davidova I.A., Marks C.R., Stamps B.W., Harri-man B.H., Stevenson B.S., Duncan K.E., Suflita J.M.* Metabolic capability of a predominant *Halanaerobium* sp. in hydraulically fractured gas wells and its implication in pipeline corrosion // *Front. Microbiol.* 2016. 7:988. doi 10.3389/fmicb.2016.00988
- Magot M., Fardeau M.-L., Arnauld O., Lanau C., Ollivier B., Thomas P., Patel B.K.C.* *Spirochaeta smaragdinae* sp. nov., a new mesophilic strictly anaerobic spirochete from an oil field // *FEMS Microbiol. Lett.* 1997. V. 155. P. 185–191.
- Maniatis T., Fritsh E.F., Sambrook J., Engel J.* *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982.
- Nazina T.N., Shestakova N.M., Semenova E.M., Korshunova A.V., Kostrukova N.K., Tourova T.P., Min L., Feng Q., Poltarau A.B.* Diversity of metabolically active *Bacteria* in water-flooded high-temperature heavy oil reservoir // *Front. Microbiol.* 2017. 8:707. doi 10.3389/fmicb.2017.00707
- Pham V.D., Hnataw L.L., Zhang S., Fallon R.D., Jackson S.C., Tomb J.F., DeLong E.F., Keeler S.J.* Characterizing microbial diversity in production water from an Alaskan mesothermic petroleum reservoir with two independent molecular methods // *Environ. Microbiol.* 2009. V. 11. P. 176–187.
- Postgate J.R.* *The sulfate-reducing bacteria.* 2nd ed. Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press, 1984.
- Quast C., Pruesse E., Yilmaz P., Gerken J., Schweer T., Yarza P., Peplies J., Glöckner F.O.* The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools // *Nucl. Acids Res.* 2013. V. 41. Iss. D1. P. D590–D596.
- Ritalahti K.M., Justicia-Leon S.D., Cusick K.D., Ramos-Hernandez N., Rubin M., Dornbush J., Löffler F.E.* *Sphaerochaeta globosa* gen. nov., sp. nov. and *Sphaerochaeta pleomorpha* sp. nov., free-living, spherical spirochaetes // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2012. V. 62. P. 210–216.
- Schouw A., Eide T.L., Stokke R., Pedersen R.B., Steen I.H., Bodtke G.* *Abyssivirga alkaniphila*, gen. nov., sp. nov., an alkane-degrading, anaerobic bacterium from a deep-sea hydrothermal vent system, and emended descriptions of *Natranaerovirga pectinivora* and *Natranaerovirga hydrolytica* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2016. V. 66. P. 1724–1734.
- Shivani Y., Subhash Y., Sasikala C., Ramana C.V.* Description of '*Candidatus* Marispirochaeta associata' and reclassification of *Spirochaeta bajacaliforniensis*, *Spirochaeta smaragdinae* and *Spirochaeta sinaica* to a new genus *Sediminispirochaeta* gen. nov. as *Sediminispirochaeta bajacaliforniensis* comb. nov., *Sediminispirochaeta smaragdinae* comb. nov. and *Sediminispirochaeta sinaica* com. nov. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2016. V. 66. P. 5485–5492.
- Silva T.R., Verde L.C.L., Santos Neto E.V., Oliveira V.M.* Diversity analyses of microbial communities in petroleum samples from Brazilian oil fields // *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 2013. V. 81. P. 57–70.
- Takahashi S., Tomita J., Nishioka K., Hisada T., Nishijima M.* Development of a prokaryotic universal primer for simultaneous analysis of *Bacteria* and *Archaea* using next-generation sequencing // *PLoS ONE.* 2014. V. 9(8):e105592.
- Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J.* CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions specific gap penalties and weight matrix choice // *Nucl. Acids Res.* 1994. V. 9. P. 3251–3270.
- Troshina O., Oshurkova V., Suzina N., Machulin A., Ariskina E., Vinokurova N., Kopitsyn D., Novikov A., Shcherbakova V.* *Sphaerochaeta associata* sp. nov., a spherical spirochaete isolated from cultures of *Methanosarcina mazei* JL01 // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2015. V. 65. P. 4315–4322.
- Van de Peer Y., De Wachter R.* TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment // *Comput. Appl. Biosci.* 1994. V. 10. P. 569–570.
- Van der Kraan G.M., Bruining J., Lomans B.P., van Loosdrecht M.C.M., Muyzer G.* Microbial diversity of an oil-water processing site and its associated oil field: the possible

role of microorganisms as information carriers from oil-associated environments // FEMS Microbiol. Ecol. 2010. V. 71. P. 428–443.

Wang L.Y., Ke W.J., Sun X.B., Liu J.F., Gu J.D., Mu B.Z. Comparison of bacterial community in aqueous and oil phases of water-flooded petroleum reservoirs using pyrosequencing and clone library approaches // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2014. V. 98. P. 4209–4221.

Wolin E.A., Wolin M.J., Wolfe R.S. Formation of methane by bacterial extracts // J. Biol. Chem. 1963. V. 238. P. 2882–2888.

Zeikus G., Hegge P.W., Thompson T.E., Phelps T.J., Langworthy T.A. Isolation and description of *Haloanaerobium praevalens* gen. nov. and sp. nov., an obligately anaerobic halophile common to Great Salt Lake sediments // Curr. Microbiol. 1983. V. 9. P. 225–234.

Zhang F., She Y-H., Chai L-J., Banat I.M., Zhang X-T., Shu F-C., Wang Z-L., Yu L-J., Hou D-J. Microbial diversity in long-term water-flooded oil reservoirs with different *in situ* temperatures in China // Sci. Rep. 2012. V. 2. Article 760. doi 10.1038/srep00760

Bacteria of the Genus *Sphaerochaeta* from Low-Temperature Heavy Oil Reservoirs (Russia)

S. Kh. Bidzhieva¹, D. Sh. Sokolova¹, T. P. Tourova¹, and T. N. Nazina¹, *

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

*e-mail: nazina@inmi.ru

Received June 13, 2018

Abstract—Fermenting bacteria are usual components of oilfield microbial communities. Since pure cultures of fermenting bacteria utilize carbohydrates and do not grow on oil, their diversity and relationships in the community are of great interest. In the present work, enrichment and pure cultures of fermenting bacteria obtained from formation water of Russian low-temperature oilfields were studied. High-throughput sequencing of the V3–V4 region of the 16S rRNA gene was carried out for an enrichment culture. The library was found to contain the genes of anaerobic bacteria of the genus *Halanaerobium*, which are capable of growth on polysaccharides with thiosulfate reduction to sulfide, as well as the genes of *Abyssivirga alkaniphila*, which grows on C₅–C₂₅ n-alkanes of oil with thiosulfate as an electron acceptor or in a syntrophic association with hydrogenotrophic methanogens. Members of the genus *Sphaerochaeta* were minor components of the community. Three strains (4-11, 5-8-5, and 17-50) were isolated from enrichment cultures. The isolates were anaerobic mesophilic halotolerant bacteria, which fermented a number of carbohydrates and grew as biofilms. The 16S rRNA gene sequences of the new strains exhibited 99.5–100% similarity between each other and 97.2–98.0% similarity to the sequences of the most closely related species *Sphaerochaeta associata* and *Sphaerochaeta globosa*, which indicated their affiliation to a new *Sphaerochaeta* species. The products of maltose fermentation were acetate, propionate, CO₂, H₂, and sometimes *iso*-propanol. The strains did not grow on crude oil. In oilfields *Sphaerochaeta* species probably consume the products of oil biodegradation by other microorganisms, are involved in biofilms formation, and provide H₂ for methanogens and other components of the community.

Keywords: oilfields, fermenting bacteria, high-throughput sequencing, the 16S rRNA gene, *Sphaerochaeta*

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИ

ОПИСАНИЕ НОВОГО ВИДА АНАММОКС-БАКТЕРИИ
“*CANDIDATUS JETTENIA ECOSI*”

© 2018 г. Е. А. Бочкова^{a, b, *}, Ю. В. Литти^a, А. А. Новиков^b, Д. С. Груздев^a,
Е. С. Бочкарева^c, А. В. Бескорвайный^b, Б. Б. Кузнецов^a, А. Н. Ножевникова^a

^aФедеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии”
Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

^bРоссийский государственный университет (Национальный исследовательский университет)
нефти и газа им. И.М. Губкина, Москва, 119991 Россия

^cМосковский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, 119991 Россия

*e-mail: botchkovaekat@gmail.com

Поступила в редакцию 21.03.2018 г.

Новая анаммокс-бактерия выявлена в микробном сообществе лабораторного вертикального анаэробного проточного биореактора с восходящим потоком среды (up-flow) и иммобилизацией биомассы на ершовом носителе, функционирующем в течение пяти лет на минеральной среде. Реактор был инокулирован активным илом из денитрификатора станции очистки хозяйственно-бытовых сточных вод в долине реки Мзымта (Краснодарский край, Россия). При постоянном увеличении концентрации субстратов роста (NH_4^+ и NO_2^-) в реакторе за пять лет развилось микробное сообщество, в состав которого входит новый вид анаммокс-бактерий. Особенностью нового вида является стабильная активность в широком диапазоне суммарной концентрации субстратов аммония и нитрита в среде реактора от 0.02 до 5.6 г N/л и pH от 7.2 до 8.8, а также в микроаэрофильных условиях при содержании 3% кислорода в газовой фазе. Температурный оптимум составляет 30°C. Время удвоения биомассы физиологически активных анаммокс-бактерий 13 сут. Клетки новой бактерии диаметром около 1 мкм обладают типичной для анаммокс-бактерий ультраструктурой, имеют тенденцию к прикрепленному росту и формированию биопленок. В мембранах клеток новой анаммокс-бактерии выявлены ладдерановые липиды. По результатам филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК, новая бактерия отнесена к роду-кандидату “*Candidatus Jettenia*” филума *Planctomycetes*, и для нее предложено название “*Candidatus Jettenia ecosi*” sp. nov.

Ключевые слова: анаммокс-бактерии, анаэробное окисление аммония, описание, “*Candidatus Jettenia ecosi*” sp. nov., ладдерановые липиды, очистка сточных вод

DOI: 10.1134/S0026365618060058

Анаммокс-бактерии — группа микроорганизмов, осуществляющих процесс анаэробного окисления аммония нитритом (анаммокс). Ни один из видов анаммокс-бактерий не выделен в чистую культуру. Все они описаны в статусе кандидатов (*Candidatus*) на принадлежность к новым видам в соответствии с рекомендациями международной комиссии по номенклатуре бактерий (Sneath, 1990; Murray, Stackebrandt, 1995).

По данным “List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature” (Euzéby, 1997), на сегодняшний день известно 14 валидных видов-кандидатов анаммокс-бактерий, принадлежащих к 5 родам. В большинстве антропогенных и природных экосистем наблюдается сосуществование двух и более видов анаммокс-бактерий.

Род “*Candidatus Jettenia*” был впервые описан в 2008 году (Quan et al., 2008) и на сегодняшний

день включает три вида: “*Candidatus Jettenia asiatica*” (Quan et al., 2008), “*Ca. Jettenia moscovienalis*” (Николаев и соавт., 2015) и “*Ca. Jettenia caeni*” (Ali et al., 2015). Из всех описанных на сегодняшний день анаммокс-бактерий, представители рода “*Ca. Jettenia*” демонстрируют наименьшую эврибионтность (способность существовать в различных биотопах). Более половины случаев обнаружения “*Ca. Jettenia* sp.” приходится на антропогенные экосистемы, такие как биореакторы и системы очистки сточных вод. Виды этого рода принадлежит к числу редко встречающихся анаммокс-бактерий, по сравнению, например, с более эврибионтными видами рода “*Candidatus Brocadia*” (Sonthiphand et al., 2014). Бактерии рода “*Ca. Jettenia*” устойчивы к постоянной аэрации, обычно являющейся сильным ингибитором анаммокс-процесса (Long et al., 2013). Также они демонстрируют устойчивость к высоким нагрузкам

Таблица 1. Сравнение условий в верхней и нижней частях реактора к 5 году культивирования микробного сообщества (средние значения)

	pH	Концентрация растворенного кислорода, мг/л	Концентрация аммонийного азота, мг N-NH ₄ ⁺ /л	Удаленный аммонийный азот, мг N-NH ₄ ⁺ /л	Концентрация нитритного азота, мг N-NO ₂ ⁻ /л	Удаленный нитритный азот, мг N-N-NO ₂ ⁻ /л
Нижняя часть реактора	7.2	2.88	400 ± 15	355 ± 15	400 ± 20	385 ± 17
Верхняя часть реактора	8.8	1.36	45 ± 5	10 ± 5	15 ± 2	5 ± 2

по азотным субстратам. Бактерии “*Ca. Jettenia asiatica*” способны в течение длительного времени существовать даже в реакторах, очищающих сточные воды с содержанием нитрита более 1 г/л, осуществляя процесс анаммокс с эффективностью 86% (Rep et al., 2014).

Для биотехнологии большой интерес представляет поиск новых видов анаммокс-бактерий, способных одинаково эффективно и стабильно осуществлять процесс анаммокс в условиях как высоких, так и низких нагрузок по субстратам и значений кислотности среды. Такие микроорганизмы могут быть использованы для эффективной очистки стоков различного происхождения и состава, содержащих как высокие, так и средние концентрации азотсодержащих веществ, что в настоящее время является исключительно важной прикладной задачей (Каллистова и соавт., 2016). Не менее важной задачей является и поиск видов анаммокс-бактерий, устойчивых к аэрации, поскольку в основе наиболее эффективных современных биологических систем очистки стоков лежит принцип сосуществования в одном реакторе нитрифицирующих и анаммокс-бактерий в условиях пониженной аэрации или чередования аэробных и анаэробных фаз (van Kessel et al., 2018).

Исследуемое в настоящей работе микробное сообщество было накоплено в течение длительного (более 5 лет) культивирования на минеральной среде в проточных условиях в лабораторном биореакторе с восходящим током среды через слой активного ила (up-flow), снабженном ершовым носителем для прикрепления и равномерного распределения биомассы анаммокс-бактерий по высоте реактора. Реактор был инокулирован активным илом из денитрификатора одной из станций очистки хозяйственно-бытовых сточных вод “БХ-ЭКОС” в долине реки Мзымта (Краснодарский край) в вахтовых поселках строителей комбинированной автомобильно-железнодорожной, соединяющей Адлер с поселками Красная поляна и Роза-хутор. Величина химического потребления кислорода (ХПК) инокулята составляла не более 200 мг/л. Вывод на рабочий режим и работа лабораторного реактора подробно описаны в работе Ножевниковой и соавт. (2012). В лабораторном биореакторе микробное сообщество

формирует биопленки-гранулы диаметром до 15 мм в осадке на дне биореактора и до 2–3 мм на волокнах ершей-носителей, а также плоские биопленки-обрастания на стенках реактора из оргстекла (Botchkova et al., 2014).

Элективные условия в биореакторе способствуют накоплению преимущественно анаммокс-бактерий и препятствуют развитию других групп микроорганизмов, в частности, гетеротрофов-денитрификаторов: отсутствие аэрации; отсутствие органических соединений в подаваемой в реактор питательной среде; высокая нагрузка по субстратам, аммонию и нитриту, содержащихся в среде в соотношении 1 : 1.23 (в сумме до 8.5 г N/л в сутки). Свежая среда поступает в реактор не постоянно, а циклами по 6 мин каждые полтора часа. Присутствие полимерного носителя создает возможность для прикрепленного роста анаммокс-бактерий, что является для них предпочтительным, а также задерживает биопленки-гранулы и предотвращает нежелательное вымывание медленно растущей биомассы анаммокс-бактерий из реактора. Благодаря конструкции и режиму работы биореактора (вертикальная вытянутая форма, подача среды снизу, отсутствие активного перемешивания, наличие ершового носителя для иммобилизации биомассы), по его высоте формируются стратифицированные условия, что подтверждается тем, что в нижней части реактора (0–15 см) выше концентрация субстратов и ниже pH, и наоборот, в верхней части реактора концентрация субстратов ниже, а pH выше. В табл. 1 приведены значения концентраций субстратов в пробах из верхней и нижней частей реактора в период работы реактора с 1910 по 2065 сутки. Видно, что сообщество нижней части реактора удаляет значительную часть субстратов из среды, однако окончательная очистка осуществляется благодаря сообществу средней и верхней части реактора. Величины pH также различаются весьма значительно.

К началу второго года с момента запуска биореактора, в состав микробного сообщества входили анаммокс-бактерии, принадлежавшие к трем флотипам (Botchkova et al., 2014). По данным клонирования и секвенирования последовательностей гена 16S рРНК, доминирующая группа,

составлявшая 48% от общего числа клонов, включала 42 клон очень близких между собой (более 99.5% сходства). Этот филотип имеет сходство 98% с ранее описанными анаммокс-бактериями "*Ca. Jettenia asiatica*". Две других группы представляли собой минорный компонент сообщества и включали каждая по 1 клон: группа 2 имела 96% сходство с "*Ca. Brocadia fulgida*", группа 3 – 96% сходство с "*Ca. Brocadia caroliniensis*". Две минорные группы присутствовали лишь в нижней части реактора, а доминирующий филотип был обнаружен в пробах по всей высоте реактора (Botchkova et al., 2014).

Целью данной работы было исследовать физиологические, морфологические, филогенетические характеристики анаммокс-бактерий биореактора для их описания как кандидата на принадлежность к новому виду анаммокс-бактерий.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Культивирование. Для накопления биомассы использовали вертикальный анаэробный up-flow биореактор, функционирующий на минеральной среде при температуре 30°C. Биореактор представляет собой квадратную в сечении (квадрат со сторонами 5 см) колонку из оргстекла высотой 30 см, снабженную по высоте пробоотборниками. Рабочий объем реактора составляет 0.8 л. Свежая среда подается в нижнюю часть реактора с помощью перистальтического насоса. Состав среды для культивирования (г/л): NaHCO_3 – 0.9; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.12; $\text{CaCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.18; KH_2PO_4 – 0.027; 1 мл/л раствора микроэлементов (г/л): ЭДТА – 1.5; H_3BO_3 – 0.004; $\text{CoCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0.078; ZnSO_4 – 0.128; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0.324, CuCl_2 – 0.051; Na_2MoO_4 – 0.009; $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0.057; Na_2SeO_3 – 0.034. В качестве субстратов для анаммокс-процесса в среду добавляли хлористый аммоний и нитрит натрия в молярном соотношении 1 : 1.32. Суммарная нагрузка по азотным субстратам, аммоний и нитриту не оставалась неизменной на протяжении всего периода работы реактора: в период с 30 по 1060 сутки удельную нагрузку постоянно увеличивали с 0.09 до 8.5 г N/л в сут; рН среды поддерживали в пределах 7.6–7.8.

Химические анализы. Концентрацию аммония и нитрита измеряли спектрофотометрически с использованием спектрофотометра Nach Lange DR 5000 ("Nach", Германия): NH_4^+ – фотометрически с реактивом Несслера, NO_2^- – фотометрически с реактивом Грисса, а также фотометрически с помощью метода, основанного на восстановлении сульфатом железа нитрит-иона до оксида азота (I), по стандартным методикам производителя. Значение рН измеряли с помощью рН-метра HANNA pH-211 ("Hanna Instruments",

Германия). Концентрацию растворенного кислорода в реакторе измеряли при помощи портативного кислородомера Seven2Go Pro, оснащенного датчиком InLab OptiOX ("Mettler Toledo", Швейцария).

Содержание N_2 и N_2O в газовой фазе определяли хроматографически с использованием газового хроматографа Кристалл 5000.2 (ЗАО "Хроматек", Россия). В качестве сорбента для определения N_2 использовали цеолит NaX 60/80 меш, а для определения N_2O – Porapak Q 80/100 меш. Длина стальной колонки составляла 3 м, внутренний диаметр – 2 мм, температура колонки – 60°C, температура испарителя – 200°C, ДТП – 200°C, расход газа-носителя аргона – 25 мл мин⁻¹.

Массу сухого вещества измеряли гравиметрически высушиванием при 105°C в течение 24 ч. Зольный остаток (неорганическое вещество) определяли при сжигании сухого образца в муфельной печи до постоянной массы при 650°C. Органическое вещество (ОВ) вычисляли как разницу по массе между массой беззольного вещества и сухого остатка.

Исследование физиологии анаммокс-бактерий. Опыты по определению оптимума температуры и рН и изучение активности процесса анаммокс при разных начальных концентрациях субстратов и в присутствии кислорода проводили по методикам, описанным ранее (Darpena-Mora et al., 2007; Николаев и соавт., 2015), путем периодического культивирования в стеклянных флаконах объемом 30 мл с резиновыми пробками и металлическими колпачками. Объем жидкой фазы составил 20 мл. В каждый флакон вносили по 1 г сырой биомассы (32 мг органического вещества) из проточного анаммокс-реактора и продували аргоном. Каждый эксперимент ставили в 3-х повторностях. Культивирование проводили при 30°C на среде того же состава, что и среда для культивирования анаммокс-бактерий в биореакторе. Суммарная концентрация аммонийного и нитритного азота в экспериментах по определению оптимума температуры и рН и исследованию влияния кислорода составила 600 мг N/л. В экспериментах по определению активности процесса анаммокс при разных начальных концентрациях субстратов содержание аммонийного и нитритного азота для экспериментов с низкой, средней, высокой и сверхвысокой начальной концентрацией азотных субстратов составляли, соответственно: 45 мг N- NH_4^+ /л и 80 мг N- NO_2^- , 190 мг N- NH_4^+ /л и 215 мг N- NO_2^- , 330 мг N- NH_4^+ /л и 350 мг N- NO_2^- , 1930 мг N- NH_4^+ /л и 1620 мг N- NO_2^- /л. В экспериментах по определению оптимального рН для диапазона значений от 4.5 до 5.5 к среде добавляли ацетатный буфер, содержащий 0.5 N CH_3COOH и 0.5 N CH_3COONa . Для рН от 6.0 до 7.5 добавляли

фосфатный буфер, содержащий 0.2 М KH_2PO_4 и 0.2 М Na_2HPO_4 . Для pH от 8 до 9 добавляли буфер *tris*-HCl, содержащий 0.2 М *tris*-(оксиметил)-аминометан и 0.1 N HCl. При исследовании влияния аэробных условий на процесс анаммокс во флаконы после продувки их аргоном вносили при помощи шприца воздух в количестве, при котором в газовой фазе флаконов содержалось 1, 3, 5, 10, 21 объемных % кислорода. При этом для создания в газовой фазе начальной концентрации кислорода 21 об. %, флаконы аргоном не продували и закрывали в атмосфере воздуха.

Удельную активность биомассы выражали в ммоль N_2 , образованных 1 г органического вещества (ОВ) биомассы за 1 ч (ммоль N/(г ОВ ч)) или в ммоль N аммония и нитрита, потребленных 1 г органического вещества (ОВ) биомассы за 1 ч (ммоль N/(г ОВ ч)).

Определение скорости роста в проточном биореакторе в условиях увеличения нагрузки по основным субстратам. Для определения скорости роста анаммокс-бактерий биореактора в проточных условиях пользовались ранее описанным методом (Николаев и соавт., 2015). Активность анаммокс-бактерий считали пропорциональной скорости потребления аммония и нитрита при росте в проточном биореакторе. Скорости потребления аммония и нитрита рассчитывали по скорости снижения концентраций этих соединений. Определение проводили в условиях отсутствия лимитирования по субстратам. Для того чтобы анаммокс-бактерии не были лимитированы по субстрату, из реактора с биомассой, плотно обросшей ершовый носитель, была удалена часть биомассы (перенесена в другой реактор). С оставшейся биомассой был поставлен эксперимент по определению скорости роста. Удельную нагрузку по азоту в реакторе увеличивали, начиная с $800 \text{ мг N} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$, и поддерживали в течение эксперимента по определению скорости потребления азотных субстратов на таком уровне, который превышал скорость потребления азота примерно в 2–2.5 раза. Культивирование продолжалось в течение 37 сут при температуре 30–31°C и pH исходной среды 7.5–7.8.

Микроскопия. Фазово-контрастную и эпифлуоресцентную микроскопию проводили с использованием микроскопа Zeiss Lab.A1 (“CarlZeiss”, Германия), с цифровой камерой AxioCamHR со светофильтром Zeiss 20 для Cy3-меченых зондов для флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH). Ультроструктурную организацию анаммокс-бактерий исследовали с помощью трансмиссионного электронного микроскопа JEM 100C марки “JEOL” (Япония). Для приготовления ультратонких срезов клеток образцы фиксировали 2.5% глутаровым альдегидом, приготовленным на 0.05 М какодилатном буфере (pH 7.0) течение 1 ч при 4°C. Затем материал трижды отмывали тем же

буфером и дополнительно фиксировали 1% раствором OsO_4 в том же буфере в течение ночи при 4°C, докрашивали 3% раствором уранилацетата в 30% этаноле (Kellenberger et al., 1958). После обезвоживания в возрастающих концентрациях этилового спирта и ацетона материал заключали в смесь смол эпона и аралдита. Ультратонкие срезы изготавливали на ультратрикатоме LKB-4800, контрастировали водным уранилацетатом и цитратом свинца по методу Рейнольдса (Reynolds, 1963) и исследовали в электронном микроскопе.

Исследование липидного состава мембран клеток анаммокс-бактерий. Определение липидного состава и обнаружение ладдерановых липидов проводилось на базе Центра коллективного пользования РГУ нефти и газа (НИУ) имени И.М. Губкина методом газовой хромато-масс-спектрометрии по ранее описанной методике (Normans et al., 2006), с некоторыми изменениями. Липиды экстрагировали из лиофилизированной биомассы смесью метанол–дихлорметан в соотношении 2 : 1 и получали из органического слоя упариванием растворителей под током аргона. Изолированные липиды подвергались либо метилированию метанольным раствором BF_3 , либо дериватизации триметилхлоросиланом. Затем модифицированные липиды растворяли в дихлорметане и анализировали на хромато-масс-спектрометре Trace GC Ultra DSQ II (“Thermo Scientific”, США), калибровку проводили по стандартным смесям жирных кислот (“Supelco”), идентификацию соединений проводили по базе данных NIST MS Search 3.0.

Флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH). Фиксацию и подготовку образцов для флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) проводили согласно методике, описанной ранее (Ножевникова и соавт., 2012; Botchkova et al., 2014). Для гибридизации использовали меченый флуоресцентным красителем Cy3 олигонуклеотидный зонд Apx368 (5'-CCTTTCGGGCATTGCGAA-3'), специфичный по отношению к анаммокс-планктомицетам (Schmid et al., 2003). Процедуру гибридизации проводили при температуре 46°C по стандартной схеме (Amann et al., 1990). Синтез зонда осуществляла компания “Синтол” (Россия).

Анализ нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК. Известно, что выделение ДНК из клеток анаммокс-бактерий представляет собой непростую задачу, поскольку активные гранулы анаммокс-бактерий имеют ригидную структуру, а сами клетки состоят из нескольких компартментов, ограниченных прочными мембранами. Это затрудняет доступ к ДНК и препятствует ее выделению. Кроме того, проблемы при выделении ДНК связаны с содержащимися внутри клетки анаммокс-бактерий интермедиатами анаммокс-

реакции, в частности, гидразином. Это вещество крайне реакционноспособно и легко повреждает молекулу ДНК, что делает невозможной дальнейшую работу с образцом. По этим причинам, с целью оптимизации выделения ДНК, было решено предварительно выдержать биомассу некоторое время в условиях голодания. Отобранные образцы биомассы помещали в пластиковые флаконы со стерильной средой без добавления субстратов для анаммокс-процесса и выдерживали при комнатной температуре без доступа света в течение 7–10 сут. Выделение ДНК производили модифицированным методом, описанным ранее (Birnbom, Doly, 1979; Krsek, Wellington, 1999) и успешно использованным при работе с исследуемыми сообществами микроорганизмов. Для амплификации нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК использовались следующие планктомицет-специфичные праймеры Pla 46F-1385R (Schmid et al., 2000). Клоны *E. coli* были трансформированы плазмидой рGEM-T с интегрированными ПЦР-фрагментами. Выделение ДНК из клонов осуществляли описанным выше методом. Секвенирование осуществляли методом Сэнгера (Sanger et al., 1977) с использованием Big Dye Terminator v. 3.1 kit (“Applied Biosystems, Inc.”, США) на секвенаторе ABI PRIZM 3730 (“Applied Biosystems, Inc.”, США) согласно рекомендациям производителя. Полученные последовательности проверяли на отсутствие химерных с помощью сервиса Find Chimeras (<http://decipher.cce.wisc.edu/Find-Chimeras.html>), редактировали и выравнивали с помощью редактора BioEdit, сравнивали с последовательностями базы данных GenBank с помощью программы NCBI Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Сиквенсы с уровнем сходства 97% и выше объединяли между собой в группы. Для построения филогенетических деревьев (дендрограмм) использовали программу MEGA 5.2 (Tamura et al., 2011).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Селекция и накопление анаммокс-бактерии “Candidatus Jettenia ecosi” в ходе длительного культивирования в биореакторе

В результате селекции при длительном проточном культивировании в биореакторе удалось получить активное микробное сообщество, эффективно очищающее воду от азотсодержащих соединений, аммония и нитрита. Максимальная достигнутая эффективность удаления азота составила 96%, что является достаточно высоким показателем для сообщества лабораторного реактора подобной конструкции (Lotti et al., 2015; Li et al., 2016). Еще одной важной особенностью является стабильная активность в присутствии значительного количества растворенного кислорода (табл. 1), который, как известно, является инги-

битором анаммокс-процесса (van Kessel et al., 2018). Это, очевидно, связано с тем, что в сообществе биореактора анаммокс-бактерии входят в состав биопленок. Ригидная структура биопленки, а также присутствие других микроорганизмов, в том числе и аэробных, потребляющих кислород до того, как он достигнет клеток анаммокс-бактерий, способствуют защите анаммокс-бактерий и создают возможность для их эффективного функционирования. По данным флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) с зондом amx368, специфичным по отношению к анаммокс-планктомицетам, большая часть популяции биопленок состояла из микроколоний коккоидных клеток, гибридизовавшихся с зондом amx368. Микроколонии и входящие в их состав клетки анаммокс-бактерий имели сходную морфологию в пробах как из верхней, так и из нижней частей реактора и, по визуальной оценке, составляли не менее 70% общей микробной популяции.

Стабильная активность при столь существенно различающихся условиях в верхней и нижней частях реактора (табл. 1) свидетельствует о том, что анаммокс-бактерии биореактора являются микроорганизмами, активными в широком диапазоне значений pH и концентраций субстратов в среде и в присутствии кислорода. По данным секвенирования гена 16S рРНК, к началу 5-го года с момента запуска биореактора ни одна из минорных групп анаммокс-бактерий, присутствовавших в сообществе в первые два года с момента запуска биореактора (Botchkova et al., 2014), не обнаруживалась в составе сообщества. В пробах как из верхней, так и из нижней частей реактора присутствовал лишь один флотип анаммокс-бактерий, присутствовавший в составе сообщества и ранее (номер последовательности в базе данных GenBank MN220407). Таким образом, в проточном биореакторе при длительном культивировании было получено микробное сообщество, обогащенное клетками одного вида анаммокс-бактерий, растущих в широком диапазоне концентраций субстратов и остающихся стабильным компонентом сообщества в течение длительного времени.

Строение клеток анаммокс-бактерии “Ca. Jettenia ecosi”

По данным световой и электронной микроскопии, клетки анаммокс-бактерий “*Ca. Jettenia ecosi*” коккоидной или неправильной формы, имеют диаметр 0.7–1 мкм, формируют микроколонии, в которых примерно 20–30 отдельных клеток погружены в слой внеклеточного полимерного матрикса, микроколонии объединяются в гранулы. Клетки анаммокс-бактерий имеют типичную для этой группы ультраструктуру с отчетливо выделяющейся анаммоксосомой (рис. 2).

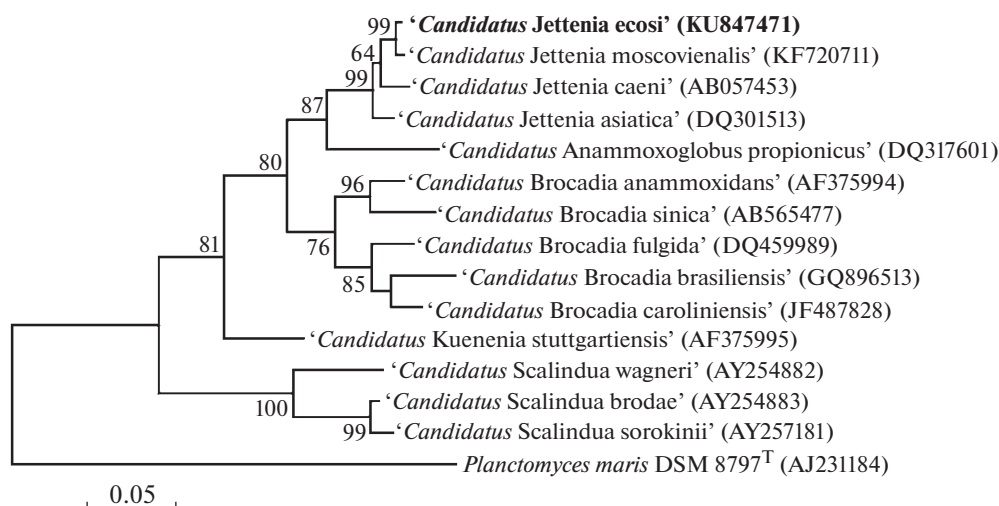


Рис. 1. Филогенетическое дерево, отражающее положение анаммокс-бактерий “*Candidatus Jettenia ecosi*” (выделены жирным шрифтом) относительно известных видов анаммокс-бактерий. Дендрограмма построена путем сравнения последовательностей длиной 658 нуклеотидов на основании анализа 1000 альтернативных деревьев, алгоритм построения maximum likelihood.

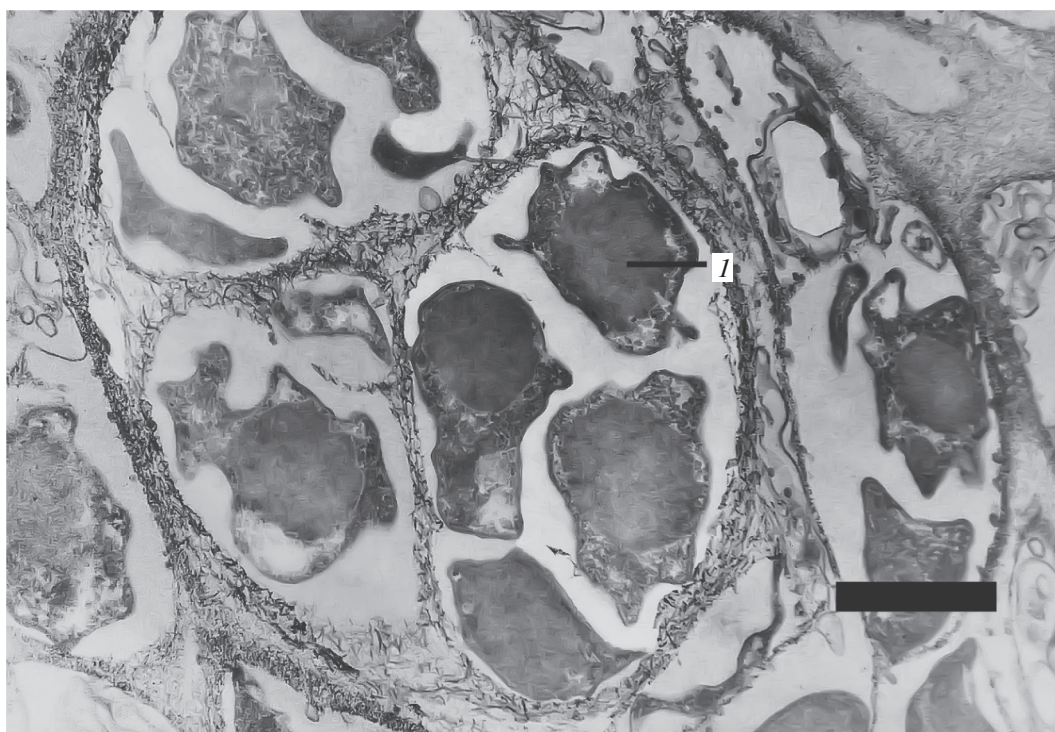


Рис. 2. Электронная микроскопия ультратонкого среза микроколонии анаммокс-бактерий. Видны отдельные клетки неправильной формы, погруженные в слой внеклеточного полимерного матрикса. 1 – анаммоксосома. Масштабная линейка – 1 мкм.

Липидный состав клеточных мембран

Хроматограмма метиловых эфиров жирных кислот микроорганизмов сообщества биореактора представлена на рис. 3. Большая часть липидов представлена насыщенными жирными кислота-

ми нормального (36.8%) и *изо*-строения (28.6%), а также мононенасыщенными жирными кислотами (3.6%). Фракция ладдерановых липидов составляла 19.3%. Эти соединения являются уникальными компонентами клеточных мембран анаммокс-бактерий; кроме них, ни у каких иных

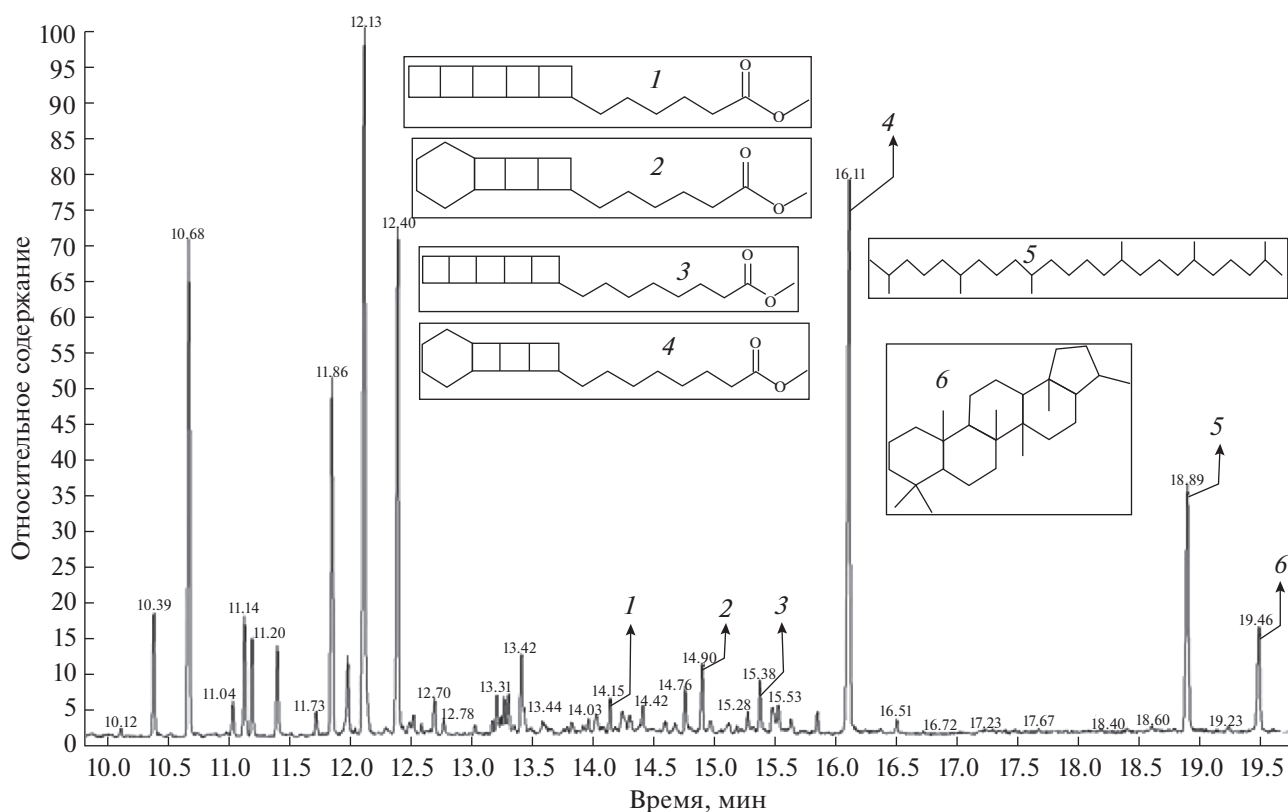


Рис. 3. Хроматограмма метиловых эфиров жирных кислот микроорганизмов сообщества биореактора: 1 – C_{18} -[5]-ладдерановая кислота; 2 – C_{18} -[3]-ладдерановая кислота; 3 – C_{20} -[5]-ладдерановая кислота; 4 – C_{20} -[3]-ладдерановая кислота; 5 – сквален; 6 – гопан.

живых существ они не были обнаружены (Sinninghe Damste et al., 2004), поэтому обнаруженные в данном исследовании ладдерановые липиды, по всей видимости, принадлежат анаммокс-бактериям биореактора. В числе выявленных ладдерановых липидов C_{18} -[3]-, C_{18} -[5]-, C_{20} -[3]-, C_{20} -[5]-ладдерановые кислоты. Подобный состав ладдерановых липидов описан для сообщества, включавшего “*Ca. Jettenia*” и “*Ca. Brocadia*”, исходно полученного из заболоченной почвы и затем накопленного в лабораторном SBR-реакторе (Hu et al., 2011), а также для сообщества анаммокс-бактерий термальных источников Калифорнии и Невады, включавшего “*Ca. Brocadia*”, “*Kuenenia*” и “*Scalindua*” (Jaeschke et al., 2009).

Похожая картина наблюдалась и при анализе липидного состава микробного сообщества, обладающего анаммокс-активностью, в пилотной установке на Курьяновских очистных сооружениях Мосводоканала (Козлов и соавт., 2013). Однако в описанной в этой статье пилотной установке осуществляются процессы аэробной нитрификации и анаэробной денитрификации и анаммокс путем чередования периодов аэрации и анаэробноза. Традиционные жирные кислоты (т.е. не содержащие ладдерановых компонентов)

в этих условиях составляли 95%, а на долю ладдерановых липидов приходилось лишь 5%. Поскольку ладдерановые липиды встречаются лишь у анаммокс-бактерий, то такое соотношение может быть связано с тем, что в сообществе лабораторного реактора доля анаммокс-бактерий выше, чем в пилотной установке, где преобладают денитрифицирующие гетеротрофные бактерии. Также у микроорганизмов исследуемого биореактора были обнаружены углеводороды изопреноидного состава, в том числе и гопаноиды, которые часто обнаруживаются в мембранах анаммокс-бактерий (Sinninghe Damste et al., 2004), где они составляют 10.8% от общей фракции липидов. Аналогично, эти же гопаноиды являлись основными углеводородами в клетках “*Ca. Brocadia anammoxidans*”, которые были получены с помощью градиентного центрифугирования и составляли 99.5% микробной популяции (Sinninghe Damste et al., 2005).

Скорость потребления субстратов анаммокс-бактерий в проточных условиях

Кривая зависимости скорости удаления общего минерального азота (аммония и нитрита) от

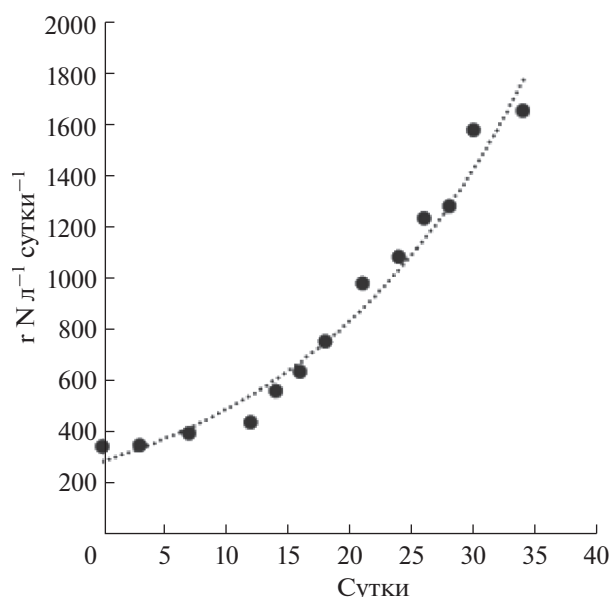


Рис. 4. Динамика скорости удаления азота субстратов (сумма аммонийного и нитритного азота) ($\text{г N л}^{-1} \text{сут}^{-1}$) в ходе эксперимента по определению скорости роста биомассы анаммокс-бактерий.

времени (рис. 4) описывается экспоненциальным уравнением с константой скорости 0.0538 сут^{-1} (коэффициент корреляции $r = 0.97$), что соответствует времени удвоения биомассы физиологически активных анаммокс-бактерий в 13 сут. Этот результат сравним с имеющимися в литературе данными по времени удвоения анаммокс-бактерий, которое составляет 12–30 сут (Strous et al., 1998), и выше, чем данные Nu et al., 2011, полученные для накопительной культуры двух видов анаммокс-бактерий, филогенетически наиболее близких к “*Ca. Jettenia asiatica*” и “*Ca. Brocadia fulgida*” (27 сут).

Исследование физиологии анаммокс-бактерий “*Ca. Jettenia ecosi*”

Потребление азотных субстратов при периодическом культивировании. Для эксперимента по изучению потребления субстратов при периодическом культивировании были выбраны три варианта начальных концентраций (низкие, высокие и сверхвысокие) субстратов, аммония и нитрита (рис. 5). Низкие ($45 \text{ мг N-NH}_4^+/\text{л}$ и $80 \text{ мг N-NO}_2^-/\text{л}$) и высокие ($190 \text{ мг N-NH}_4^+/\text{л}$ и $215 \text{ мг N-NO}_2^-/\text{л}$) значения концентрации близки к концентрации субстратов в среде для культивирования в биореакторе в первые 2 года функционирования биореактора. Таким образом, к моменту проведения экспериментов по периодическому культивированию биомасса была уже адаптирована к подобным нагрузкам, и такие концентрации субстратов не оказывали

ингибирующего эффекта на процесс анаммокс. Среди этих концентраций скорость потребления азотных субстратов была максимальной при начальных концентрациях $190 \text{ мг N-NH}_4^+/\text{л}$ и $215 \text{ мг N-NO}_2^-/\text{л}$. Скорость и количество выделившегося молекулярного азота были также выше при высоких начальных концентрациях азотных субстратов. Ожидаемый баланс между потребленным нитритом и аммонием и образованным азотом наблюдался не с самого начала эксперимента: вначале имело место резкое снижение концентрации аммония и нитрита, напоминающее своего рода “глоток субстратов”, и затем, с отсрочкой, регистрировалось образование азота. К 72 ч количество потребленных субстратов и образованного продукта пришло в строгое соответствие друг с другом. Интересно отметить, что в газовой фазе, помимо молекулярного азота, наблюдалось образование небольшого количества (до 1.54% объема) оксида азота (I). Вероятно, образование N_2O было вызвано деятельностью денитрифицирующих микроорганизмов (Carlson, Ingraham, 1983) или нитрификаторов, способных осуществлять так называемую “нитрификационную денитрификацию” в анаэробных условиях (Schmidt et al., 2004). Представители обеих групп микроорганизмов присутствуют в составе сообщества исследуемого биореактора (Botchkova et al., 2014). Известно, что сами анаммокс-бактерии не образуют в качестве конечного продукта оксид азота (I) (Okabe et al., 2011), однако показано, что при окислении Fe (II) нитритом или образующимся в результате деятельности анаммокс-бактерий NO может наблюдаться выделение N_2O (Kampschreur et al., 2011). При истощении нитрита в жидкой фазе после 75 ч культивирования, концентрация накопленного в газовой фазе N_2O начала снижаться, возможно, в результате его потребления гетеротрофными денитрификаторами (Ishii et al., 2011).

Помимо низких и высоких концентраций, исследуемая биомасса из проточного анаммокс-реактора была подвергнута воздействию также сверхвысоких концентраций азотных субстратов ($1930 \text{ мг N-NH}_4^+/\text{л}$ и $1620 \text{ мг N-NO}_2^-/\text{л}$), что ранее не изучалось другими исследователями при периодическом культивировании анаммокс-бактерий. Более того, ранее было показано, что присутствие уже $400 \text{ мг N-NO}_2^-/\text{л}$ ингибирует процесс анаммокс при периодическом культивировании на 50% (Lotti et al., 2012). В рассматриваемом нами случае, ингибирование было также очевидным, на что указывает высокое содержание N_2O , составлявшее 30% от общего количества измеряемых газообразных продуктов (N_2 и N_2O). В то же время, как видно на рис. 5, начальные скорости потребления субстратов при их сверхвысоких

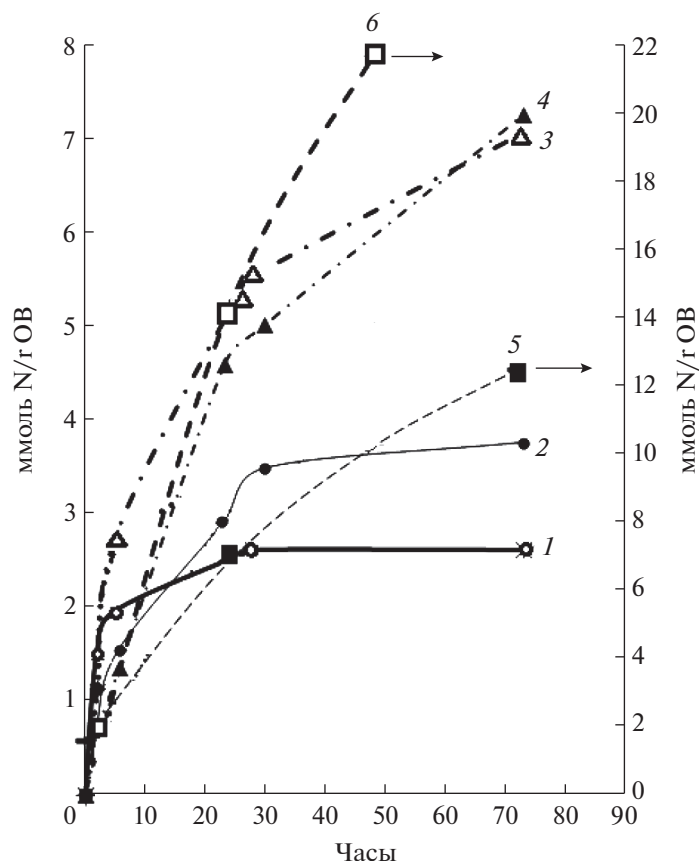


Рис. 5. Динамика потребления азотных субстратов (сумма N-NH_4^+ и N-NO_2^-) и образования газообразных азотных продуктов (сумма N_2 и N_2O) при различных начальных концентрациях азотных субстратов: 1 – концентрация субстратов и 2 – концентрация продуктов при исходной концентрации 45 мг N-NH_4^+ /л и 80 мг N-NO_2^- /л; 3 – концентрация субстратов и 4 – концентрация продуктов при исходной концентрации 190 мг N-NH_4^+ /л и 215 мг N-NO_2^- /л; 5 – концентрация субстратов и 6 – концентрация продуктов при исходной концентрации 1930 мг N-NH_4^+ /л и 1620 мг N-NO_2^- /л.

концентрациях были в 3–4 раза больше, чем при низких и высоких концентрациях субстратов. При этом количество газовых продуктов (N_2 и N_2O) было намного меньше, чем потребленных субстратов, что говорит о вероятном накоплении каких-то других промежуточных или конечных продуктов, которые нами не анализировались.

Определение оптимальной температуры и pH.

На рис. 6 представлены графики активности процесса анаммокс в условиях периодического культивирования при температуре от 10 до 45°C и при pH от 4.5 до 9. Оптимальной температурой для процесса анаммокс является 30°C, что на 5–10°C ниже, чем у других видов рода (Quan et al., 2008; Ali et al., 2014; Николаев и соавт., 2015). Оптимальным значением pH было 7.5, что является близким к нейтральному, по сравнению с оптимумами pH для других видов рода (8–8.5) (Quan et al., 2008; Ali et al., 2014; Николаев и соавт., 2015).

Исследуемые анаммокс-бактерии демонстрировали высокую активность в широком диапазоне pH (6–9). При этом оптимум pH лежит в диапазоне 6–8 и характеризуется двумя экстремумами (pH 6 и 7.5). Такой широкий диапазон устойчивости к кислотности среды ранее не был известен для анаммокс-бактерий рода “*Ca. Jettenia*” и представляет собой особенность анаммокс-бактерий “*Ca. Jettenia ecosi*”.

Влияние аэробных условий на активность процесса анаммокс. Результаты экспериментов по оценке влияния аэробных условий на активность процесса анаммокс приведены в табл. 2. Видно, что активность потребления азота субстратов максимальна при 10% содержании кислорода в газовой фазе. Однако в этом случае не выполняется ожидаемая для анаммокс-процесса стехиометрия. Соотношение между потребленными нитритом и аммонием было наиболее близко к

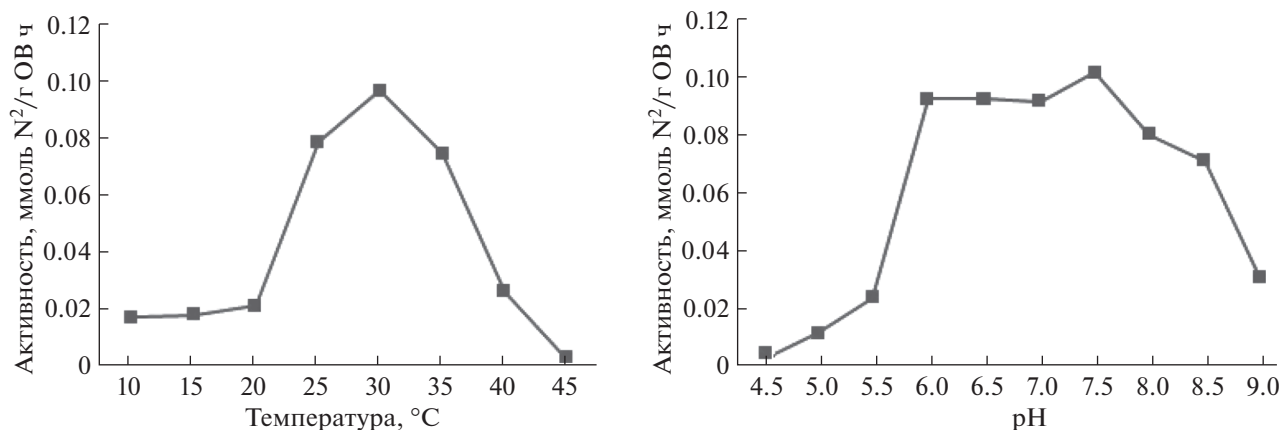


Рис. 6. Активность процесса анаммокс при различных значениях температуры и pH.

ожидаемому 1 : 1.2–1.32, приведенному в литературных данных (Lotti et al., 2014), при начальном содержании кислорода в газовой фазе 3% об. Потребление субстратов было максимальным при содержании 10% кислорода, очевидно, за счет деятельности нитрифицирующих микроорганизмов, присутствующих в составе исследуемого сообщества (Botchkova et al., 2014). Интересно, что в аэробных условиях потребление субстратов шло менее активно, чем при 10% содержании кислорода. Вероятно, причиной было то, что за прошедшие годы в результате селекции в биореакторе сформировалось микробное сообщество, выдерживающее пониженную аэрацию и включающее присутствие микроаэрофильных нитрификаторов. Подобные результаты были описаны в работе Ли и соавт. (2016), где в сообществе мембранного up-flow биореактора при содержании растворенного кислорода 0.6 мг/л сформировались биопленки, наиболее важными и многочисленными компонентами которых были “*Ca. Jettenia asiatica*” и нитрификаторы семейства *Nitrosomonadaceae*.

Описание нового вида. В результате длительной селекции в условиях лабораторного проточного

upflow-биореактора накоплена биомасса с преобладанием клеток новой анаммокс-бактерии. Поскольку бактерия не выделена в чистую культуру, то может быть описана как вид-кандидат в соответствии с рекомендациями международной комиссии по номенклатуре бактерий (Sneath, 1990; Murray, Stackebrandt, 1995).

По молекулярно-генетическим данным, новая бактерия имеет 98% сходство с ранее описанным видом анаммокс-бактерий “*Candidatus Jettenia asiatica*”. Приводим описание новой бактерии “*Candidatus Jettenia ecosi*” sp. nov.

Клетки новой бактерии коккоидной или неправильной формы, диаметром 0.7–1 мкм, имеют систему внутренних компартментов, ограниченных мембранами, в том числе анаммоксосому, занимающую более 70% объема клетки. Отдельные клетки формируют микроколонии, состоящие из 20–30 клеток, погруженных в слой внеклеточного полимерного матрикса. Бактерия осуществляет анаэробное окисление аммония нитритом. Время удвоения новой бактерии составляет 13 сут, максимальная скорость роста – 0.0538 сут⁻¹, оптимальная температура роста 30°C, оптимальное значение pH 7.5. В клеточных мембранах присут-

Таблица 2. Влияние аэрации на потребление субстратов при периодическом культивировании

Концентрация кислорода в газовой фазе, %	Удельная скорость потребления субстратов, ммоль N/ г ОВ ч	Соотношение между потребленным нитритом и аммонием
0	1.64	1.76
1	1.83	2.1
3	1.76	1.16
5	1.94	0.98
10	4.01	0.89
21	2.42	0.06

ствуют ладдерановые липиды – C18-[3]-, C18-[5]-, C20-[3]-, C20-[5]-ладдерановые кислоты.

Работа финансировалась в рамках государственного задания на выполнение фундаментальных исследований № 0104-2014-0110. Исследование липидного состава клеточных мембран анаммокс-бактерий, требующее специального оборудования, финансировалось при поддержке государственного задания № 16.1812.2014/К.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Каллистова А.Ю., Дорофеев А.Г., Николаев Ю.А., Козлов М.Н., Кевбрина М.В., Пименов Н.В.* Роль анаммокс-бактерий в очистке сточных вод от соединений азота // *Микробиология*. 2016. Т. 85. № 2. С. 126–144.
- Kallistova A.Y., Nikolaev Y.A., Pimenov N.V., Dorofeev A.G., Kozlov M.N., Kevbrina M.V.* Role of anammox bacteria in removal of nitrogen compounds from wastewater // *Microbiology (Moscow)*. 2016. V. 85. P. 140–156.
- Козлов М.Н., Кевбрина М.В., Дорофеев А.Г., Казакова Е.А., Грачёв В.А., Поляков Д.Ю., Асеева В.Г., Николаев Ю.А.* Липидный состав активного ила пилотной установки анаэробного окисления аммония // *Прикл. биохимия и микробиология*. 2013. Т. 49. № 5. С. 481–490.
- Kozlov M.N., Kevbrina M.V., Dorofeev A.G., Kazakova E.A., Grachev V.A., Polyakov D.Y., Aseeva V.G., Nikolaev Y.A.* Lipid composition of activated sludge in a pilot plant for anaerobic ammonium oxidation // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2013. V. 49. P. 485–494.
- Николаев Ю.А., Козлов М.Н., Кевбрина М.В., Дорофеев А.Г., Пименов Н.В., Каллистова А.Ю., Грачев В.А., Казакова Е.А., Жарков А.В., Кузнецов Б.Б., Патутина Е.О., Бумажкин Б.К.* *Candidatus 'Jettenia moscovienalis'* sp.nov. – новый вид бактерий, осуществляющих анаэробное окисление аммония // *Микробиология*. 2015. Т. 84. № 2. С. 236–243.
- Nikolaev Y.A., Kozlov M.N., Kevbrina M.V., Dorofeev A.G., Pimenov N.V., Kallistova A.Y., Grachev V.A., Kazakova E.A., Zharkov A.V., Kuznetsov B.B., Patutina E.O., Bumazhkin B.K.* *Candidatus "Jettenia moscovienalis"* sp. nov., a new species of bacteria carrying out anaerobic ammonium oxidation // *Microbiology (Moscow)*. 2015. V. 84. P. 256–262.
- Ножевникова А.Н., Литти Ю.В., Некрасова В.К., Куличеvская И.С., Григорьева Н.В., Куликов Н.И., Зубов М.Г.* Анаэробное окисление аммония (анаммокс) в биопленках иммобилизованного активного ила при очистке сточных вод с низкой концентрацией загрязнений // *Микробиология*. 2012. Т. 81. № 1. С. 28–28.
- Nozhevnikova A.N., Littti Y.V., Nekrasova V.K., Kulichevskaya I.S., Grigoryeva N.V., Kulikov N.I., Zubov M.G.* Anaerobic ammonium oxidation (Anammox) in immobilized activated sludge biofilms during the treatment of weak wastewater // *Microbiology (Moscow)*. 2012. V. 81. P. 25–34.
- Ali M., Oshiki M., Awata T., Isobe K., Kimura Z., Yoshikawa H., Hira D., Kindaichi T., Satoh H., Fujii T., Okabe S.* Physiological characterization of anaerobic ammonium oxidizing bacterium '*Candidatus Jettenia caeni*' // *Environ. Microbiol.* 2015. V. 17. P. 2172–2189.
- Amann R.I., Binder B.J., Olson R.J., Chisholm S.W., Devereux R., Stahl D.A.* Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations // *Appl. Environ. Microbiol.* 1990. V. 56. P. 1919–1925.
- Birnboim H.C., Doly J.* A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA // *Nucleic Acids Res.* 1979. V. 7. P. 1513–1523.
- Botchkova E.A., Littti Y.V., Kuznetsov B.B., Nozhevnikova A.N.* Microbial biofilms formed in a laboratory-scale anammox bioreactor with flexible brush carrier // *J. Biomater. Nanobiotechnol.* 2014. V. 5. P. 76–82.
- Carlson C.A., Ingraham J.L.* Comparison of denitrification by *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Paracoccus denitrificans* // *Appl. Environ. Microbiol.* 1983. V. 45. P. 1247–1253.
- Dapena-Mora A., Fernandez I., Campos J.L., Mosquera-Corral A., Mendez R., Jetten M. S.M.* Evaluation of activity and inhibition effects on Anammox process by batch tests based on the nitrogen gas production // *Enzyme Microb. Tech.* 2007. V. 40. P. 859–865.
- Euzéby J.P.* List of bacterial names with standing in nomenclature: a folder available on the Internet // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 1997. V. 47. P. 590–592.
- Hopmans E.C., Kienhuis M.V.M., Rattray J.E., Jaeschke A., Schouten S., Sinninghe Damste J.S.* Improved analysis of ladderane lipids in biomass and sediments using high-performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2006. V. 20. P. 2099–2103.
- Hu B.L., Rush D., van der Biezen E., Zheng P., van Mullekom M., Schouten S., Damsté, J.S.S., Smolders A.J.P., Jetten M.S.M., Kartal B.* New anaerobic, ammonium-oxidizing community enriched from peat soil // *Appl. Environ. Microbiol.* 2011. V. 77. P. 966–971.
- Ishii S., Ashida N., Otsuka S., Senoo K.* Isolation of oligotrophic denitrifiers carrying previously uncharacterized functional gene sequences // *Appl. Environ. Microbiol.* 2011. V. 77. P. 338–342.
- Jaeschke A., den Camp H.J.O., Harhangi H., Klimiuk A., Hopmans E.C., Jetten M.S., Schouten S., Damsté J.S.S.* 16S rRNA gene and lipid biomarker evidence for anaerobic ammonium-oxidizing bacteria (anammox) in California and Nevada hot springs // *FEMS Microb. Ecol.* 2009. V. 67. P. 343–350.
- Kampschreur M.J., Kleerebezem R., de Vet W.W., van Loosdrecht M.C.* Reduced iron induced nitric oxide and nitrous oxide emission // *Water Res.* 2011. V. 45. P. 5945–5952.
- Kellenberger E., Ryther A., Sechard J.* Electron microscope study of DNA containing plasmids. II. Vegetative and mature phage DNA as compared with normal bacterial nucleoids in different physiological states // *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 1958. V. 4. P. 671–676.
- van Kessel M.A., Sultiens K., Slegers M.F., Cruz S.G., Jetten M.S., Kartal B., den Camp H.J.O.* Current perspectives on the application of N-damo and anammox in wastewater treatment // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2018. V. 50. P. 222–227.
- Krsek M., Wellington E.M.H.* Comparison of different methods for the isolation and purification of total commu-

- nity DNA from soil // *J. Microbiol. Methods*. 1999. V. 39. P. 1–16.
- Li X., Sun S., Badgley B.D., Sung S., Zhang H., He Z. Nitrogen removal by granular nitrification–anammox in an upflow membrane-aerated biofilm reactor // *Water Res.* 2016. V. 94. P. 23–31.
- Long A., Heitman J., Tobias C., Philips R., Song B. Co-occurring anammox, denitrification, and codenitrification in agricultural soils // *Appl. Environ. Microbiol.* 2013. V. 79. P. 168–176.
- Lotti T., van der Star W.R.L., Kleerebezem R., Lubello C., van Loosdrecht M.C.M. The effect of nitrite inhibition on the anammox process // *Water Res.* 2012. V. 46. P. 2559–2569.
- Lotti T., Kleerebezem R., Lubello C., van Loosdrecht M.C.M. Physiological and kinetic characterization of a suspended cell anammox culture // *Water Res.* 2014. V. 60. P. 1–14. doi 10.1016/j.watres.2014.04.017
- Lotti T., Kleerebezem R., Hu Z., Kartal B., De Kreuk M.K., van Erp Taalman Kip C., Van Loosdrecht M.C.M. Pilot-scale evaluation of anammox-based mainstream nitrogen removal from municipal wastewater // *Environ. Tech.* 2015. V. 36. P. 1167–1177.
- Murray R.G.E., Stackebrandt E. Taxonomic note: implementation of the provisional status *Candidatus* for incompletely described procaryotes // *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1995. V. 45. P. 186–187.
- Okabe S., Oshiki M., Takahashi Y., Satoh H. N₂O emission from a partial nitrification–anammox process and identification of a key biological process of N₂O emission from anammox granules // *Water Res.* 2011. V. 45. P. 6461–6470.
- Quan Z.X., Rhee S.K., Zuo J.E., Yang Y., Bae J.W., Park J.R., Lee S.-T., Park Y.H. Diversity of ammonium-oxidizing bacteria in a granular sludge anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) reactor // *Environ. Microbiol.* 2008. V. 10. P. 3130–3139.
- Ren Y., Li D., Li X., Yang L., Ding A., Zhang J. High-rate nitrogen removal and microbial community of an up-flow anammox reactor with ceramics as biomass carrier // *Chemosphere*. 2014. V. 113. P. 125–131.
- Reynolds E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy // *J. Cell. Biol.* 1963. V. 17. P. 208–213.
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1977. V. 74. P. 5463–5467.
- Schmid M., Twachtmann U., Klein M., Strous M., Juretschko S., Jetten M., Metzger J.W., Schleifer K.H., Wagner M. Molecular evidence for genus level diversity of bacteria capable of catalyzing anaerobic ammonium oxidation // *Syst. Appl. Microbiol.* 2000. V. 23. P. 93–106.
- Schmid M., Walsh K., Webb R., Rijpstra W.I., van de Pas-Schoonen K., Verbruggen M.J., Hill T., Moffett B., Fuerst J., Schouten S., Damsté J.S., Harris J., Shaw P., Jetten M., Strous M. *Candidatus* “*Scalindua brodae*”, sp. nov., *Candidatus* “*Scalindua wagneri*”, sp. nov., two new species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria // *Syst. Appl. Microbiol.* 2003. V. 26. P. 529–538.
- Schmidt I., van Spanning R. J., Jetten M. S. Denitrification and ammonia oxidation by *Nitrosomonas europaea* wild-type, and NirK- and NorB-deficient mutants // *Microbiology (SGM)*. 2004. V. 150. P. 4107–4114.
- Sinninghe Damsté J.S., Rijpstra W.I.C., Schouten S., Fuerst J.A., Jetten M.S., Strous M. The occurrence of hopanoids in planctomycetes: implications for the sedimentary biomarker record // *Org. Geochim.* 2004. V. 35. P. 561–566.
- Sinninghe Damsté J.S., Rijpstra W.I.C., Geenevasen J.A., Strous M., Jetten M.S. Structural identification of ladderane and other membrane lipids of planctomycetes capable of anaerobic ammonium oxidation (anammox) // *FEBS J.* 2005. V. 272. P. 4270–4283.
- Sneath P.H.A. International code of nomenclature of bacteria. 1990 Revision. ASM. Washington DC.
- Sonthiphand P., Hall M.W., Neufeld J.D. Biogeography of anaerobic ammonia-oxidizing (anammox) bacteria // *Front. Microbiol.* 2014. V. 5. P. 399.
- Strous M., Heijnen J.J., Kuenen J.G., Jetten M.S.M. The sequencing batch reactor as a powerful tool for the study of slowly growing anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1998. V. 50. P. 589–596.
- 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.

Description of “*Candidatus Jettenia ecosi*” sp. nov., a New Species of Anammox Bacteria

E. A. Botchkova^{1,2,*}, Yu. V. Litt¹, A. A. Novikov², D. S. Grouzdev¹, E. S. Bochkareva³,
A. V. Beskorovayny², B. B. Kuznetsov¹, and A. N. Nozhevnikova¹

¹Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

²Gubkin Russian State University of Oil and Gas (National Research University), Moscow, Russia

³Biological Faculty, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

*e-mail: botchkovaekat@gmail.com

Received March 21, 2018

Abstract—A new species of anammox bacteria, “*Candidatus Jettenia ecosi*,” was identified in the microbial community of a lab-scale vertical anaerobic upflow bioreactor fed with mineral medium and the biomass immobilized on a brush-shaped carrier. The reactor was inoculated with activated sludge from a denitrifying bioreactor of a municipal wastewater treatment station in the valley of the Mzymta river (Krasnodar krai, Rus-

sia). At constant increase of concentrations of the substrates for the anammox process (NH_4^+ and NO_2^-) in the course of five years, a microbial community containing a new species of anammox bacteria “*Candidatus Jettenia ecosi*” developed in the bioreactor. Stable activity in a wide range of substrate concentrations (0.02 to 5.6 g N/L), pH (7.2 to 8.8), and under microaerophilic conditions, (3% oxygen in the gas phase) were the remarkable features of the new species. Optimal growth temperature was 30°C. Doubling time of physiologically active anammox bacteria was 13 days. Cells of the new bacteria (~1 µm in diameter) exhibited the typical anammox morphology and ultrastructure. The cells had a tendency for attached growth and formation of biofilms. Hopanoids and ladderane lipids, which are among the key markers of this microorganisms, were found in the membranes of the new anammox bacteria. According to the results of the 16S rRNA gene sequencing, the new bacteria belong to the candidate genus “*Candidatus Jettenia*”, phylum *Planctomycetes* with the proposed name “*Candidatus Jettenia ecosi*” sp. nov.

Keywords: anammox bacteria, anaerobic ammonium oxidation, new species, description, “*Candidatus Jettenia ecosi*” sp. nov., ladderane lipids, wastewater treatment

СПОСОБ ВЫДЕЛЕНИЯ И УЧЕТА ГРИБОВ, РАЗВИВАЮЩИХСЯ В МОРСКИХ ГРУНТАХ

© 2018 г. Е. Н. Бубнова^{а, *}, М. Л. Георгиева^{а, b}, О. А. Грум-Гржимайло^а

^аМосковский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, 119234, Россия

^бНаучно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе, Москва, 119021, Россия

*e-mail: katya.bubnova@wsbs-msu.ru

Поступила в редакцию 27.03.2018 г.

В статье приводится описание оригинальной конструкции камер зарастания, использованных для исследования микобиоты грунтов литорали и сублиторали Белого моря. Устройство данных камер позволило наблюдать за развитием в них грибного мицелия в условиях природного экотопа (морских грунтов) и выделять развившийся мицелий в чистые культуры. Проведено сравнение состава выделенной из камер микобиоты стандартными методами посевов тех же грунтов. Мицелий развивался в 10% установленных камер. Показано, что в сублиторали интенсивность зарастания камер ниже, чем на литорали. Большинство выделенных из камер грибов не образовывали в культуре спороношений, кроме стерильных, были выделены отдельные колонии морских видов *Paradendryphella salina* и *Acremonium fuci*. При использовании метода стандартных посевов из грунтов наиболее часто выделялись виды из родов *Penicillium* и *Tolypocladium*, доля стерильных мицелиев была существенно ниже, чем при выделении с использованием камер.

Ключевые слова: грибы, морские грибы, выделение грибных культур, разнообразие, Белое море

DOI: 10.1134/S002636561806006X

Для выявления разнообразия грибов в морских грунтах часто используют метод посевов на агаризованные питательные среды (Kohlmeyer, Kohlmeyer, 1979; Пивкин и соавт., 2006; Пивкин, 2010; Bubnova, Nikitin, 2017), аналогичный посевам из наземных почв (Gams, 1992; Carlile et al., 2001; Jeewon, Hyde, 2007). Так же, как и посевы почв, посевы морских грунтов оставляют нерешенным вопрос о происхождении образовавшихся колоний грибов: из активного мицелия или из покоящихся спор? Соответственно, остается непонятным, относятся ли выявленные грибы к функциональной части микобиоты экотопа, участвуют ли они в процессах деструкции или оказались там случайно. Очевидно, что стандартный метод посевов не позволяет в полной мере выявлять разнообразие грибов в субстратах (Gams, 1992; Jeewon, Hyde, 2007). Например, таким методом невозможно выделить облигатных симбиотрофов. Молекулярные исследования разнообразия грибов, как в почвах, так и в морских отложениях, демонстрируют отличия от результатов получаемых методами посевов. В частности, могут различаться преобладающие таксономические группы (Jeewon, Hyde, 2007; Andreakis et al., 2015; Zhang et al., 2015; Rämä et al., 2017). Кроме того, молекулярные исследования обычно сталкиваются с обнаружением филотипов, которые

невозможно отнести к известным видам, и с некультивируемыми формами (Nagahama, Nagano, 2012; Andreakis et al., 2015; Zhang et al., 2015). Таким образом, как у молекулярных, так и у стандартных культуральных методов есть свои трудности и ограничения.

В почвенной микологии для выявления функциональной части микобиты разрабатывались различные модификации культуральных методов. Например, прямые посевы почвенных частиц (Jeewon, Hyde, 2007) и метод отмывки почвенных частиц, предложенный Паркинсоном и Вильямсом в 1960 году (Williams et al., 1965). Метод отмывки почвенных частиц неоднократно применялся в дальнейших исследованиях почвенной микобиоты (Gams, 1992), несмотря на то, что для его реализации необходимо специальное оборудование (Williams et al., 1965). При применении этого метода, по сравнению со стандартным методом серийных разведений, достоверно снижается доля обильно спороносящих видов, например рода *Penicillium*, и повышается доля стерильных изолятов. Кроме перечисленного, в почву могут вноситься специальные субстраты для выделения различных трофических групп грибов, например, волосы для выделения кератинофилов или бумага для выделения целлюлозолитиков

(Gams, 1992; Jeewon, Hyde, 2007). Интересным способом является выделение грибов из мицелия, развивающегося в ловушках или камерах зарастания различной конструкции. В таком методе стерильная камера (например, тонкая стеклянная трубочка с отверстиями в стенках) с агаризованной средой внутри помещалась в почву. Через некоторое время камеру доставали и выделяли их нее культуры грибов. Предполагалось, что таким образом можно выделять те грибы, которые способны развиваться в почвенных условиях. Работы этого направления относятся к 1960-ым годам, и в дальнейшем такие конструкции практически не применялись, возможно, в связи с трудоемкостью процесса (Gams, 1992). Несмотря на неоднократно высказываемое мнение о том, что само внесение дополнительных источников питания в почву может стимулировать рост грибов, для их развития важно не только наличие самого питательного субстрата, но и другие условия, складывающиеся в экотопе. В частности, в морских экотопах это пониженная температура, повышенная соленость, постоянное увлажнение, а на глубине – высокое давление и низкое содержание кислорода. В морской микологии широко распространено применение “приманок”, например, для выделения групп целлюлозолитиков и древесно-разрушающих грибов (Kohlmeyer, Kohlmeyer, 1979; Пивкин и соавт., 2006). Отметим, что модификации стандартных методов посевов для выявления функциональной группы грибов из морских грунтов и почв неизвестны.

Целью настоящей работы стало разработать камеры-ловушки для выделения населяющих морские грунты грибов и исследования их разнообразия. Дизайн камеры должен позволять проводить микроскопирование развития в ней мицелия грибов для их обнаружения и выделения. Кроме того, было необходимо провести сравнение видового разнообразия грибов, получаемого с помощью разработанных камер и стандартным методом посева.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Отбор проб. Работы проводили на Беломорской биостанции имени Н.А. Перцова (ББС; Кандалакшский залив Белого моря), в июле–августе 2016 года. Соленость воды здесь составляет в среднем 26‰; температура воды на глубине 0–10 м в июле достигает 12–14°C. Температура в грунтах сублиторали соответствует температуре воды на данной глубине; температура в грунтах литорали подвержена значительным колебаниям, связанным с приливно-отливными течениями и временем суток. Всего было заложено 4 площадки: 2 в сублиторали (С1 и С2) и 2 на среднем уровне ли-

торали (Л1 и Л2). Площадка С1 располагалась на глубине 4 м около пирса ББС; Л1 – в бухте ББС; С2 – на глубине 8 м примерно в 1 км к западу от поселка ББС; Л2 – напротив нее. На площадке Л2 грунт был представлен слабо заиленным песком, во всех остальных случаях заиление было сильным. Работы в сублиторали проводили с использованием легкой водолазной техники. Все работы проводили параллельно на площадках С1, Л1 и Л2; на площадке С2 работали с отставанием на 1 сут.

Способ выделения грибов. Конструкция камер приводится в разделе “Результаты и обсуждение”. Схема работ на литорали была следующей: установленные камеры снимали каждые сутки до срока 1 нед., и затем – через 2, 3 и 4 нед., в каждый срок по 2 батареи (по 10 камер). Было установлено по 20 батарей на каждой площадке (всего 200 камер на литорали). Схема работ в сублиторали немного отличалась: здесь снимали по 4 батареи, на сроках 1, 2, 3 и 4 нед. Всего было поставлено по 16 батарей на площадку (160 камер в сублиторали). Параллельно со снятием камер в срок 1 нед. отбирали пробы грунта на всех площадках для проведения стандартных посевов, отбор производили в стерильные пластиковые пробирки емкостью 50 мл.

После снятия камер их доставляли в лабораторию, отмывали от налипшего грунта под проточной пресной водой, разрезали хомуты, вытирали камеры насухо снаружи и микроскопировали. Микроскопирование и фотофиксацию проводили на световом микроскопе Leica DM 2500 на базе Центра микроскопии ББС МГУ. Все камеры просматривали тотально, и при наличии роста мицелия в камере, отмечали его особенности (количество точек роста по краям камеры, длину мицелия, его разветвленность), фотографировали, еще раз отмывали сначала проточной, потом стерильной водой и этанолом. После этого стекла камеры разъединяли и помещали внутренней стороной на агаризованную питательную среду в чашки Петри (агаризованное сусло на природной воде Белого моря, с общим содержанием сахаров 0.3% и добавлением антибиотика гентамицина (4% раствор) по 2 мл на 0.5 л среды, т.е. до конечной концентрации 0.16 г/л). Экспонировали при температуре 6°C до 30 сут, отдельные камеры – до 2 мес. Развившиеся около края камеры колонии (в тех местах, где при микроскопировании было отмечено развитие грибов) выделяли в чистую культуру по мере образования. Параллельные стандартные посевы грунтов проводили на ту же среду, экспонировали также в течение 30 сут при 6°C. Для посевов использовали по 1 см³ каждого образца, которые распределяли на 10 чашек со средой. Пониженную температуру культивирова-

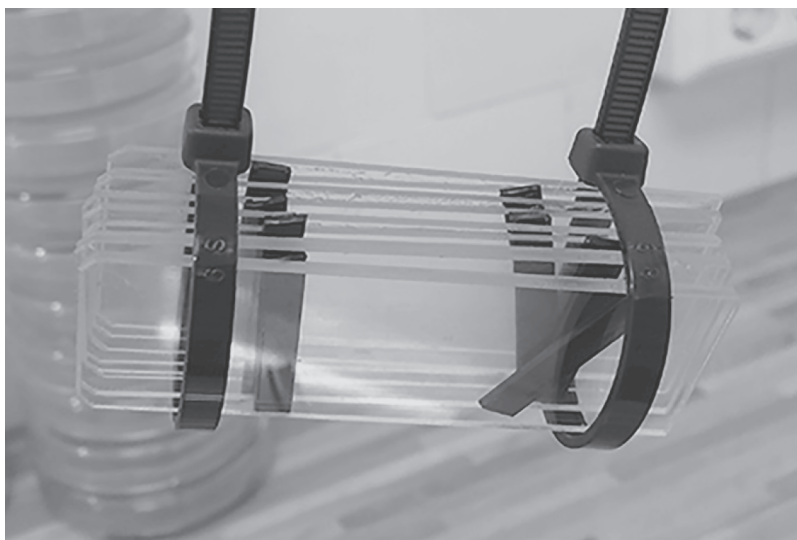


Рис. 1. Внешний вид батареи из пяти камер-ловушек, готовой к установке.

ния применяли для замедления роста обильно спороносящих быстрорастущих видов грибов, чтобы дать возможность развиваться более медленно растущим колониям.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Окончательная конструкция разработанных камер зарастания была следующей: на тонкое стерильное предметное стекло (Минимед СП-2 Люкс, толщина 1 ± 0.1 мм), помещали 0.2 мл стерильной агаризованной среды, приготовленной на основе природной воды Белого моря, с различным содержанием сахарозы (0, 1 и 5 г/л в различных вариантах опыта) и накрывали еще одним предметным стеклом. Среду равномерно распределяли по всей площади между стеклами. В результате получали камеру зарастания, состоящую из двух стекол и среды между ними. За счет использования тонких стекол и тонкого слоя среды, камеры можно было микроскопировать при увеличении до $\times 150$. Это позволяло достоверно судить о присутствии или отсутствии мицелия, а также зафиксировать некоторые его особенности (протяженность, ветвление). Для укрепления конструкции камеры скрепляли в батарее по 5 штук с помощью простерилизованных пластиковых хозяйственных хомутов. Между камерами помещали прокладки из обрезков тех же хомутов для улучшения циркуляции природной среды (рис. 1). Оставленные длинные концы хомутов оказались полезны для последующего обнаружения поставленных камер, особенно в сублиторали. В каждой батарее были камеры с различным содержанием сахарозы в среде (по 2 штуки без и с 1 г/л и по 1 штуке с 5 г/л), что маркировали воско-

вым карандашом по краю стекла. Получившиеся батареи помещали в стерильные пластиковые пакеты для транспортировки к месту установки, где выкапывали небольшие ямки до 10 см глубиной, укладывали в каждую по одной батарее и закапывали. При выемке камер, их помещали в те же пакеты для переноса в лабораторию.

Результаты микроскопирования разработанных камер были следующими. Во-первых, общее число заросших камер оказалось крайне низким. Всего рост мицелия был обнаружен в 36 камерах (табл. 1) что составляет 10% их общего числа. Во всех камерах с сублиторали было обнаружено только по одному центру развития мицелия, длина которого составляла 200–250 микрон, мицелий был слаборазветвленный. В пяти камерах с литорали было обнаружено по 2–4 центра развития мицелия, во всех остальных – по одному. Средняя длина мицелия около 250 микрон, слаборазветвленный, отдельные ответвления – до 500 микрон (рис. 2). Таким образом, мы обнаружили разницу в интенсивности зарастания камер, экспонированных в условиях сублиторали и литорали: на литорали она выше. Кроме мицелия грибов, во многих камерах интенсивно развивались диатомовые водоросли, бактерии, некоторые из них колонизировали беспозвоночных животных.

Во-вторых, при работах на литорали мы не обнаружили принципиального различия в количестве заросших камер в разные сроки экспонирования после 1 нед. В течение всей 1 нед. заросшими оказались только 2 камеры. Остальные зарастания более-менее равномерно распределились по оставшимся срокам (табл. 1). В сублиторали все заросшие камеры были сняты на сроках 2 и 3 нед.

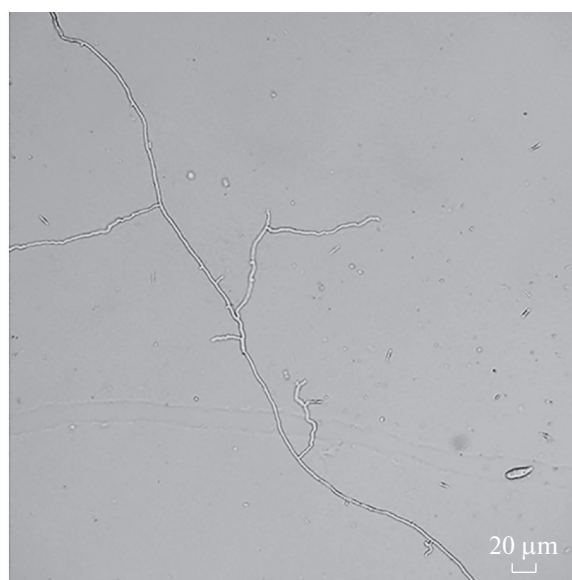
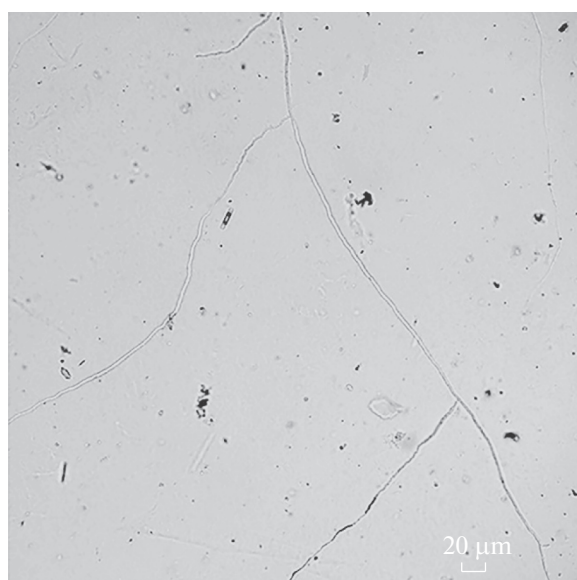
Таблица 1. Число камер, в которых был обнаружен рост мицелия грибов на разных сроках экспозиции

Время, сут	Сублитораль		Литораль	
	площадка С1 (4 м)	площадка С2 (8 м)	площадка Л1	площадка Л2
1	—*	—	0	0
2	—	—	0	0
3	—	—	0	1
4	—	—	1	0
5	—	—	0	0
6	—	—	0	0
7	0	0	2	1
14	2	2	4	3
21	3	1	4	5
28	0	0	3	4
Общее число колонизированных камер	5	3	14	14
	8		28	
	36			
% колонизированных от общего числа камер	1.8	3.1	7	7
	5		14	
	10			

* На каждом сроке просматривали по 10 камер с каждой площадки литорали и по 20 камер с каждой площадки сублиторали. На сроке 1–6 сут камеры в сублиторали не учитывали.

Интересно, что степень развития мицелия (его длина и разветвленность) не была связана со сроком экспонирования. Ожидалось, что с увеличением срока экспонирования количество зарос-

ших камер и интенсивность развития мицелия в них будет больше, однако это оказалось не так. Исходя из полученных результатов, можно предположить, что концентрация грибных пропагул,

**Рис. 2.** Рост мицелия внутри камер-ловушек, установленных в грунте литорали.

способных развиваться в поставленных камерах, крайне низка. Причем и сублиторальные, и литоральные грунты довольно подвижны, они постоянно промываются морской водой, которая может приносить и уносить propagулы. Возможно, в связи с этим не было обнаружено принципиальных различий в степени зарастания камер на различных сроках их экспонирования. Исходя из этого, мы считаем, что для исследования интенсивности развития мицелия рациональным будет установка всех имеющихся камер на срок 2–3 недели и одновременное их изъятие. Отметим что, при увеличении срока экспозиции увеличивалось общее число видов. Но мы предполагаем, что это объясняется, в первую очередь, увеличением числа снятых камер, а не увеличением срока экспозиции как такового.

В-третьих, было выявлено, что среда без добавления сахарозы не заросла ни в одной из камер, в отличие от среды с высоким содержанием сахарозы (5 г/л), очень быстро зараставшей бактериями, которые могли препятствовать развитию грибов. Поэтому наиболее рациональным представляется использование среды с небольшим содержанием сахара (1 г/л). В таких условиях грибы способны развиваться, а бактерии не слишком обильны.

Не из всех камер, в которых при микроскопировании был отмечен мицелий, удалось выделить грибы. Из камер, экспонированных в сублиторали, была выделена одна колония морского несовершенного гриба *Paradendryphiella salina*, одна колония *Penicillium* sp. и 4 колонии неспоронносящих грибов (табл. 2). Последние образовывали слабо растущие колонии и две из них погибли при первом пересеве, так же как и *Penicillium* sp. Слабая выживаемость культур при пересевах, возможно, связана с тем, что условия на поверхности агаризованной среды сильно отличаются от условий в морских грунтах (в частности, аэрацией). Предполагаем, что выращивание грибов в погруженной культуре могло бы помочь сохранить большую их часть, но подобный подход в морской микологии ранее не использовался. Полученные таким образом культуры можно было бы использовать, например, для выделения ДНК и молекулярно-генетических исследований. Из камер, экспонированных в грунте литорали, удалось выделить большее разнообразие грибов. Всего 20 колоний, среди которых также были стерильные мицелии, *P. salina*, *Acremonium fuci*, *Acremonium* sp. и *Cladosporium sphaerospermum* (табл. 2). Таким образом, мы наблюдали, что в камерах-ловушках, помещенных в природный морской экотоп, способны развиваться морские грибы и стерильные морфотипы неизвестной таксономической принадлежности. Если выделенные морские

грибы, в принципе, могут быть обнаружены и стандартными методами посевов, то неспоронносящие культуры составляют, несомненно, самую интересную группу. Для их идентификации необходимо использовать молекулярно-биологические методы, что не входило в задачи данного исследования.

Разнообразии микобиоты, выявленное с помощью камер и стандартным методом посевов грунтов на питательные среды, имело различие. При обычных стандартных посевах грунтов численность грибов составляла 26 и 32 propagулы на 1 см³ в грунтах сублиторали и 30 и 34 propagулы на 1 см³ в грунтах литорали. Разнообразие, полученное стандартным методом, было выше, чем выявленное с помощью камер, а в видовом составе преобладали виды из родов *Penicillium* и *Tolypocladium*. Доля стерильных мицелиев составила менее 10%. Подобные различия в видовом составе, получаемом стандартными методами и с помощью ловушек, ранее были отмечены при исследованиях почвенной микобиоты (Gams, 1992). Наши исследования подтверждают положение о том, что обильное споронношение и высокая представленность в стандартных посевах не обязательно свидетельствует о реальной роли гриба в экотопе.

Таким образом, разработанная конструкция камер зарастания оказалась принципиально пригодной как для микроскопирования, так и для выделения грибов. Большое количество стерильных изолятов, несомненно, требует использования молекулярно-биологических методов для их идентификации, что позволит получить более точную картину разнообразия грибов, которые могут развиваться в условиях морских грунтов. Для Белого моря оптимальным является экспонирование 2–3 недели. Вследствие низкой ростовой активности мицелия, для увеличения вероятности выделения грибов необходимо использовать большое количество камер.

Разработанные камеры могут быть использованы для оценки интенсивности развития грибов в различных условиях, например, в прикорневой зоне литоральной растительности, на участках берега с различной геоморфологией. Интересные и дополняющие друг друга результаты могут быть получены при параллельном использовании данных камер, стандартных посевов на питательные среды и метагеномного анализа. Наиболее рациональным является использование в камерах среды с невысоким содержанием источника углерода.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект № 15-04-02722 – разработка дизайна камер, полевые работы на литорали, частично – выделение культур; проект № 15-29-025330фи_м – частично выделение и идентификация культур) и

Таблица 2. Разнообразие грибов, обнаруженное в грунтах сублиторали и литорали Белого моря при исследовании с помощью камер-ловушек и стандартным методом посева

Грибы	Камеры		Посевы	
	сублитораль	литораль	сублитораль	литораль
<i>Mucor hiemalis</i> Wehmer	0	0	2	0
<i>Acremonium fuci</i> Summerb., Zuccaro & W. Gams	0	2	3	3
<i>Acremonium incoloratum</i> (Sukapure & Thirum.) W. Gams	0	0	1	0
<i>Acremonium</i> sp. 1	1	0	0	0
<i>Acremonium</i> sp. 2	0	1	0	0
<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) G.A. de Vries	0	0	3	2
<i>Cladosporium sphaerospermum</i> Penz.	0	1	0	2
<i>Fusarium oxysporum</i> Schldtl.	0	0	0	2
<i>Paradendryphiella salina</i> (G.K. Sutherland) Woudenberg & Crous	1	4	1	4
<i>Penicillium aurantiogriseum</i> Dierckx	0	0	2	1
<i>Penicillium chrysogenum</i> Thom	0	0	6	8
<i>Penicillium citrinum</i> Thom	0	0	2	0
<i>Penicillium glabrum</i> (Wehmer) Westling	0	0	8	7
<i>Penicillium griseolum</i> G. Sm.	0	0	2	0
<i>Penicillium thomii</i> Maire	0	0	2	2
<i>Penicillium</i> sp. 1	0	0	0	0
<i>Sarocladium strictum</i> (W. Gams) Summerb	0	0	2	4
<i>Tolypocladium cylindrosporum</i> W. Gams	0	0	11	10
<i>Tolypocladium inflatum</i> W. Gams	0	0	6	12
<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai	0	0	1	2
<i>Trichoderma polysporum</i> (Link) Rifai	0	0	3	0
Стерильные	4	12	3	5
Всего колоний	6	20	58	64

РНФ (проект № 14-50-00029 – полевые работы в сублиторали, обработка результатов). Микроскопические исследования были осуществлены на базе Центра микроскопии ББС МГУ. Работы в сублиторали проводились при поддержке водолазной службы ББС.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Пивкин М.В. Вторичные морские грибы Японского и Охотского морей. Автореферат дисс. ... докт. биол. наук. Москва, 2010. 40 с.
- Пивкин М.В., Кузнецова Т.А., Сова В.В. Морские грибы и их метаболиты. Владивосток: Дальнаука, 2006. 248 с.
- Andreakis N., Høj L., Kearns P., Hall M.R., Ericson G., Cobb R.E., Gordon B.R., Evans-Illidge E. Diversity of marine-derived fungal cultures exposed by DNA barcodes: the algorithm matters // PLoS One. 2015. V. 10 (8). e0136130.
- Bubnova E.N., Nikitin D.A. Fungi in bottom sediments of the Barents and Kara seas // Rus. J. Mar. Biol. 2017. V. 43. P. 400–406.
- Carlile M.J., Watkinson S.C., Gooday G.W. The Fungi. 2nd edn. Academic press, 2001. 603 p.
- Jeewon R., Hyde K.D. Detection and diversity of fungi from environmental samples: traditional versus molecular approaches // Advanced techniques in soil microbiology / Eds.: A. Varuma, R. Oelmüller. Springer, 2007. Ch. 1. P. 1–15.
- Gams W. The analysis of communities of saprophytic microfungi with special reference to soil fungi // Fungi in vegetation science / Ed. W. Winterhoff. Springer, 1992. Ch. 6. P. 183–223.
- Kohlmeyer J., Kohlmeyer E. Marine mycology – the higher fungi. N.Y.: Academic press, 1979. 460 p.
- Nagahama T., Nagano Y. Cultured and uncultured fungal diversity in deep sea environments // Biology of marine fungi / Ed. Ch. Raghukumar. Springer, 2012. Ch. 9. P. 174–190.
- Rämä T., Hassett B.T., Bubnova E. Arctic marine fungi: from filaments and flagella to operation taxonomic units and beyond // Bot. Mar. 2017. V. 60. P. 433–452.
- Williams S.T., Parkinson D., Burges N.A. An examination of the soil washing technique by its application to several soils // Plant Soil. 1965. V. 22. P. 167–186.
- Zhang T., Wang N.F., Zhang Y.Q., Liu H.Y., Yu L.Y. Diversity and distribution of fungal communities in the marine sediments of Kongsfjorden, Svalbard (High Arctic) // Sci. Rep. 2015. V. 5. № 14524. P. 1–11.

Method for Isolation and Enumeration of Fungi Developing in Marine Sediments

E. N. Bubnova^{1, *}, M. L. Georgieva^{1, 2}, and O. A. Grum-Grzhimailo¹

¹*Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia*

²*Gause Institute of New Antibiotics, Moscow, Russia*

**e-mail: katya.bubnova@wsbs-msu.ru*

Received March 27, 2018

Abstract—A new design for a small growth container which was used for investigation of the microbiota of the White Sea littoral and sublittoral sediments is presented. These container made it possible to observe development of fungal mycelium under conditions of a natural ecotope (marine sediments) and to isolate this mycelium as pure cultures. The microbiota isolated from the containers was compared to that obtained by standard plating method of the same sediments. The mycelium developed in 10% of the containers installed. Intensity of growth was found to be lower in the sublittoral than in the littoral. Most fungi isolated from the containers did not produce spores in pure cultures. Apart from non-sporulating cultures, colonies of marine species *Paradendryphiella salina* and *Acremonium fuci* were obtained. Standard plating of the sediments often resulted in isolation of *Penicillium* and *Tolypocladium* species, while the share of sterile isolates was considerably lower than in the case of isolation using growth containers.

Keywords: fungi, marine fungi, isolation of fungal cultures, diversity, White Sea

ПРЕДСТАВИТЕЛИ НЕКУЛЬТИВИРУЕМОГО ТАКСОНА OP1 (“*ACETOTHERMIA*”) ДОМИНИРУЮТ В МИКРОБНОМ СООБЩЕСТВЕ ЩЕЛОЧНОГО ГОРЯЧЕГО ИСТОЧНИКА ВОСТОЧНО-ТУВИНСКОГО НАГОРЬЯ

© 2018 г. А. А. Корженков^a, А. В. Теплюк^a, А. В. Лебединский^b, А. А. Хвашевская^c,
Ю. Г. Копылова^c, К. Д. Аракчаа^d, П. Н. Гольшин^e, Е. А. Лунёв^a, О. В. Гольшина^e,
И. В. Кубланов^b, С. В. Тошаков^b, С. Н. Гаврилов^b, *

^aБалтийский Федеральный Университет им. Иммануила Канта, Калининград, 236041, Россия

^bИнститут Микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ
“Фундаментальные основы биотехнологии” РАН, Москва, 117312, Россия

^cНациональный исследовательский Томский Политехнический Университет, Томск, 634050, Россия

^dГБУ “НИИ Медико-социальных проблем и управления Республики Тыва”, Кызыл, 667003, Россия

^eУниверситет г. Бангор, Гуинет, Великобритания

*e-mail: sngavrilov@gmail.com

Поступила в редакцию 30.11.2017 г.

В работе приводится описание термофильного микробного сообщества одной из гидротерм Восточно-Тувинского нагорья. С помощью высокопроизводительного профилирования по гену 16S рРНК и секвенирования полного метагенома охарактеризовано филогенетическое и метаболическое разнообразие микробного сообщества щелочного термального источника “Дикий аржаан” Уш-Бельдирского месторождения термальных минеральных вод в Туве. В микробном сообществе данного источника доминируют представители некультивируемого филума “*Acetothermia*” (candidate division OP1), детектированного ранее во многих термальных экосистемах, однако не представлявшего основную компоненту их микробных сообществ. Помимо “*Acetothermia*”, существенную часть сообщества составляют представители *Nitrospirae* и *Chloroflexi*. Сравнительный анализ измененных нами геохимических параметров источника и опубликованных ранее данных по *in silico* реконструкции метаболизма “*Acetothermia*” позволили сделать предположение, что основными источниками углерода для доминирующей группы бактерий могут служить карбонаты и бикарбонаты, а сами представители “*Acetothermia*” играют роль первичных продуцентов в экосистеме. Согласно анализу функциональных генов, в микробном сообществе также представлены физиологические группы денитрификаторов, железоредукторов, карбоксидотрофов и diaзотрофов. Описание термофильного микробного сообщества гидротермы, относящейся к юго-западной оконечности Байкальской рифтовой зоны, приводится впервые. Также, для наземных гидротерм впервые показано микробное сообщество с доминированием некультивируемых “*Acetothermia*”.

Ключевые слова: некультивируемые бактерии, OP1, *Acetothermia*, новые ацетил Ко-А синтазы, наземные гидротермы, Восточно-Тувинское нагорье

DOI: 10.1134/S0026365618060125

Гидротермальные проявления Байкальской рифтовой зоны представляют собой растянувшийся с северо-востока на юго-запад более чем на 1500 километров комплекс биотопов, для которых характерно сочетание нескольких экстремальных для жизни физико-химических условий — как правило, повышенных температур и высоких значений рН водной среды. Крайняя юго-западная часть Байкальского рифта проходит по Восточно-Тувинскому нагорью, геологическая структура которого представляется в виде глыбовых блоков,

разбитых системой региональных разломов. К главному глубинному разлому этой системы, Бусино-Белинскому, относится Уш-Бельдирское месторождение минеральных термальных азотных кремнистых вод (Пиннекер, 1968). Сложное геологическое строение в районе месторождения, разнообразие литологического состава пород, различная степень их метаморфизма, уплотненности и трещиноватости обуславливает разнообразие гидрогеологических условий в его пределах. В этом геологическом районе трещинные, тре-

щинно-пластовые, трещинно-жильные воды и водоносные горизонты четвертичных отложений тесно связаны между собой и образуют единую водонапорную систему (Логачёв, 2003). Существенное влияние на температуру и химический состав этих гидротерм оказывает также глубокая инфильтрация метеорных вод после периодов весеннего снеготаяния и летних дождей. Для химического состава термальных вод Уш-Бельдира характерны низкая минерализация (от 0.4 до 0.85 г/л), преобладание в катионном составе ионов Na^+ , высокое содержание метакремниевой кислоты (до 0.2 г/л) и высокая щёлочность (рН ~ 9.8). Естественные выходы термальных вод и скважины Уш-Бельдирского месторождения более 50 лет используются для бальнеолечения, однако фундаментальных исследований их микробного разнообразия ранее не проводилось. Кроме того, данная группа гидротерм географически удалена от источников Баргузинской долины – наиболее изученных в микробиологическом отношении термальных экосистем в Байкальской рифтовой зоне. Таким образом, результаты многочисленных исследований термофильных микробных сообществ Баргузинской долины и прилегающих территорий (например, Компанцева и Горленко 1988; Намсараев и соавт., 2003; Зеленкина и соавт., 2009; Калашников и соавт., 2014; Раднагуруева и соавт., 2016) не могут дать полного представления о микробном разнообразии гидротерм юго-западной окраины Байкальского рифта ввиду их географической изолированности и гидрогеологических особенностей.

В нашей работе впервые приводится характеристика филогенетического и метаболического разнообразия микробного сообщества гидротермы Восточно-Тувинского нагорья на основе анализа метагенома источника “Дикий аржаан”, представляющего собой самый крупный естественный выход щелочных слабоминерализованных умеренно термальных (ок. 55°C) вод Уш-Бельдирского месторождения. Особое внимание при метагеномном анализе этого биотопа было уделено представителям некультивируемых таксонов.

Реконструкция метаболизма некультивируемых организмов на основе метагеномных данных позволяет, в том числе, наметить пути их выделения в чистую культуру, так как до сих пор это является важным этапом для полноценного описания микроорганизма. Особенно актуальным представляется изучение глубоких филогенетических ветвей некультивируемых организмов, отделившихся на ранних этапах эволюции и сильно отличающихся от всех известных, например, та-

ких как candidate divisions OP1-OP12, TG1-3 (Hugenholtz et al., 1998), ZB1 (Elshahed et al., 2003) и другие. У некоторых из них впоследствии были выделены и охарактеризованы первые культивируемые представители, что дало много новой информации о физиологии микроорганизмов данных таксонов (Mori et al. 2009; Geissinger et al. 2009; Tamaki et al. 2011; Podosokorskaya et al., 2013b).

В ходе нашего анализа метагенома микробного сообщества источника “Дикий аржаан” было обнаружено доминирование некультивируемых бактерий, относящихся к candidate division OP1. Учитывая эти данные, геохимические параметры источников, а также опубликованные ранее результаты *in silico* реконструкции метаболизма “*Acetothermia*” (Takami et al., 2012), мы предполагаем, что наиболее вероятной функцией этих организмов в исследованной нами экосистеме является первичная продукция органического вещества из карбонатов и бикарбонатов, составляющих существенную часть минеральной компоненты экосистемы.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Отбор проб. Нами был выбран крупный самоизливающийся щелочной умеренно термальный (рН 9.2, 56°C по данным местного санитарного контроля) источник “Дикий аржаан”, расположенный на острове реки Шишхид-гол и имеющий наибольший дебит из всех естественных источников Уш-Бельдирского месторождения. В первом гидрогеологическом исследовании района источник также обозначался как “Источник №2” или “Радоновый” (Пиннекер, 1968). На момент наших исследований источник был каптирован в деревянный колодец, дно которого было выстлано серым песчаником и толстыми (2–3 см) розоватыми матами с большим количеством органических остатков (разлагающихся мелких веток, листьев, насекомых), на дне источника имелись активные газовые выходы, стенки деревянного колодца были покрыты плотными серо-розоватыми матами. Пробы отбирали дважды, в летние сезоны 2015 и 2016 гг., которые существенно различались по гидрологическим условиям: в 2015-м г. пробы отбирали в конце экстремально засушливого периода, в 2016-м – сразу по окончании т.н. “сезона дождей”. Для молекулярно-биологических исследований в 2015-м году отбирали две разных пробы – смесь донных отложений, придонных микробных матов и придонной воды, а также микробные обрастания с деревянных стенок колодца вместе с поверхностной водой источника. В 2016-м г.

для молекулярно-биологических исследований отбирали только пробы донных отложений. Каждую пробу для дальнейшего выделения ДНК (см. ниже) отбирали в стерильную пластиковую пробирку Falcon объемом 15 мл и фиксировали на месте этанолом до его конечной концентрации 50 об. %. При транспортировке в лабораторию до выделения ДНК фиксированные пробы хранили в течение 10 дней при +4°C. Помимо этого, брали пробы для определения состава газов, выделяющихся со дна источника, по методике, описанной ранее (Frank et al. 2016). Пробы для геохимического анализа отбирали из середины водной толщи источника. Температуру, pH и ОВ-потенциал определяли непосредственно при отборе проб pH-метром HI 9025 (Hanna Instruments) с соответствующими электродами и термодатчиком.

Выделение ДНК. ДНК выделяли при помощи набора FastDNA® SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals, США) согласно инструкции производителя.

Секвенирование

Профилирование сообщества по гену 16S рРНК.

Подготовку библиотек V4 варибельного участка гена 16S рРНК проводили при помощи системы праймеров с двойным индексированием, описанной Фадрошем с соавт. (Fadrosh et al., 2014). Смысловые участки праймеров соответствовали стандартным праймерам F515-R806 с небольшими модификациями, опубликованными ранее и предназначенными для широкого охвата природных свободноживущих прокариотических таксонов: 515F 5'-GTGBCAGCMGCCGCGGTAA-3'; R806 5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3' (Меркель и соавторы, 2015). Амплификация каждого образца проводилась с использованием готовой ПЦР-смеси qPCRMix-HS™ SYBR mastermix (Евроген, Россия). Контроль амплификации проводили на системе ПЦР в реальном времени CFX96 (BioRad, США). Использовали следующие параметры циклирования: денатурация – 98°C, 15 с; отжиг праймеров – 58°C, 15 с; элонгация – 72°C, 25 с. Очистку продуктов ПЦР производили при помощи набора Cleanup Mini kit (Евроген, Россия). Концентрацию полученных библиотек измеряли при помощи флуориметра Qubit® (Thermo Fisher Scientific, США). Качество полученных библиотек дополнительно проверяли при помощи горизонтального электрофореза в агарозном геле. Секвенирование библиотек проводили на системе MiSeq™ Personal Sequencing System (Illumina Inc, США) с использованием картриджа для получения парно-концевых прочтений длиной 250 нуклеотидов. Демультимплексирование полу-

ченных прочтений проводили согласно описанному ранее протоколу (Fadrosh et al., 2014). После этого производили фильтрацию и обрезку прочтений с целью удаления недостоверных участков. Последовательности прочтений, соответствующие праймерам, удаляли с применением программного пакета CLC Genomics Workbench 10.0 (Qiagen, Германия). После обрезки несмысловых участков парно-концевые прочтения выравнивали и объединяли при помощи ПО SeqPrep (<https://github.com/jstjohn/SeqPrep>).

Биоинформатический анализ 16S профиля проводили при помощи пакета Deblur (Amir et al., 2016). Выбор данного пакета был обусловлен тем, что подготовка библиотек и секвенирование проводилось с годовым интервалом. В качестве референтной базы последовательностей гена 16S рРНК использовали SILVA132 (Quast et al., 2013). Визуализацию данных и расчет индекса Шеннона проводили с использованием пакета R phyloseq (McMurdie и Holmes, 2013).

Секвенирование и сборка метагенома микробного сообщества.

Метагеномные библиотеки были подготовлены при помощи набора для фрагментных библиотек ДНК NEBNext™ (New England Biolabs, США) согласно рекомендациям производителя. Средний размер библиотеки составлял 500 пн. Секвенирование было проведено на системе MiSeq™ Personal Sequencing System (Illumina Inc, США) с использованием картриджа для получения парно-концевых прочтений длиной 251 нуклеотид. Полученные прочтения обрабатывали при помощи ПО ea-utils (<https://expressionanalysis.github.io/ea-utils/>) и SeqPrep (<https://github.com/jstjohn/SeqPrep>). Сборку производили при помощи пакета SPAdes 3.10 в режиме метагеномной сборки (Nurk et al., 2017).

Биоинформатический анализ метагенома. Открытые рамки считывания предсказывали при помощи MetaProdigal (Hyatt et al., 2012). Картирование прочтений на сборку с целью расчета среднего покрытия контигов проводили с использованием bowtie2 (Langmead and Salzberg, 2012). Распределение метагеномных контигов по “корзинам” (binning) было проведено при помощи ПО CONCOCT (Alneberg J. et al., 2014) с использованием настроек по умолчанию. Оценку полноты “метагеномных корзин” проводили при помощи ПО CheckM (Parks D.H. et al., 2015) с использованием настроек по умолчанию. Оценку представленности таксонов в полном метагеноме проводили при помощи пакета GraftM (<https://github.com/geronimp/graftM/>) с использованием референтного пакета данных по гену *rpsB*, моди-

фицированного добавлением последовательностей данного гена из геномов candidate division OP1 “*Acetothermia*”. Использование данного гена позволило решить проблему периодически встречаемой мультикопийности гена 16S рРНК, которая могла бы исказить результаты оценки представленности таксонов. Определение таксономии контигов в полученных “корзинах” проводили с использованием алгоритмов локального выравнивания blastn (против базы данных SILVA123) и diamond в режиме blastx против белковой базы NCBI nr (Altschul et al., 1990; Buchfink et al., 2015). Для поиска функциональных генов использовали ПО Geneious (8.1.9), в качестве запроса (query) были использованы соответствующие белковые последовательности (отобранные из базы данных UniProt/Swissprot вручную на основе анализа актуальных литературных данных), которые с помощью алгоритма blastp выравнивали против *in silico* транслированного метапротеома. Были отобраны только достоверные хиты, а именно, аминокислотные последовательности с уровнем сходства $\geq 20\%$ и покрытием референтной последовательности $\geq 50\%$ при E-value < 0.01 . Поиск генов, кодирующих системы внерибосомального синтеза различных вторичных метаболитов и, в частности, антибиотиков проводили с помощью сервиса AntiSMASH (<https://antismash.secondarymetabolites.org/#!/start>) со стандартными параметрами.

Аналитические методы. Анализ газов и геохимический анализ проводили методами газовой хроматографии (ГХ), ионной хроматографии (ИХ), титриметрии (Т), турбидиметрии (Тб), потенциометрии (П), высокотемпературного каталитического окисления (ВТКО), фотометрии (Фм), а элементный анализ – методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (ICP-MS), согласно протоколам, описанным ранее (Frank et al. 2016).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Физико-химическая характеристика источника. Пробы для геохимического анализа и выделения тотальной ДНК были отобраны нами дважды – в июле 2015 г., в конце аномально сухого сезона, когда влияние атмосферных осадков на режим и характеристики горячего источника было минимальным, а также в июле 2016 г., сразу по окончании дождливого периода, когда уровень поверхностных и грунтовых вод был высоким. В 2015-м году отмечался градиент температуры по глубине источника, который составлял 4°C – от 55°C у поверхности воды, в микробных обрастаниях стенок, до 58°C в придонных матах и 59°C в местах

газовых выходов, рН и ОВ-потенциал источника не изменялись с глубиной и составляли 9.8 ± 0.2 единиц и -400 ± 10 мВ, соответственно. Удельная электрическая проводимость воды источника при 59°C составляла 46 мСм/м, химический состав воды и смеси газов, разгружающихся в источнике, приведены в таблице 1. Химическая формула Курлова основного ионно-солевого состава на июль 2015 г. имеет следующий вид: H_2SiO_3 0.144 М 0.4 $\frac{\text{HCO}_3 37 \text{CO}_3 25 \text{SO}_4 15 \text{F12 Cl 1}}{\text{Na 95 K 2 Ca 2 Mg l}}$ рН 9.82

$T 59^\circ$. По результатам химического анализа вода “Дикого аржаана” является азотной щелочной низкоминерализованной кремнистой фтористой. По основному ионному составу вода карбонатно-гидрокарбонатная натриевая с восстановительными условиями среды, обеднена кальцием и магнием. Среди азотистых соединений в воде преобладает аммоний, а нитраты и нитриты обнаружены в следовых количествах, что сочетается с низким ОВ-потенциалом среды и высоким содержанием азота (свыше 90%) в газах источника. В пробах газа был также обнаружен кислород в достаточно высокой концентрации (табл. 1). Он может появляться в системе, питающей источник, за счет неравновесной дегазации метеорных вод при контакте с глубинными термальными водами (Frank et al. 2016). При этом, определенное нами содержание метакремниевой кислоты в пробах 2015 г. практически совпадает со значением 140 мг/л, зафиксированным ранее на Уш-Бельдирском месторождении в период минимальных примесей метеорных вод (Пиннекер, 1968). Вода, отобранная в дождливый период 2016 г., существенно не отличалась от предыдущей пробы по основным физико-химическим параметрам и макрокомпонентному составу. Температура воды в пробе 2016 г. составила $57-59^\circ\text{C}$, рН 9.75 ± 0.05 , ОВ-потенциал -400 ± 10 мВ, по сравнению с 2015-м годом стабильным оставалось содержание растворённых карбонатов, гидрокарбонатов, сульфатов, хлора, фтора, натрия (табл. 1). Однако в микроэлементном составе воды в пробах 2016 и 2015 годов наблюдались заметные различия. Вода в пробах 2016 г. содержала меньше редкоземельных элементов Sc, Nb, Ce, Pr, Nd, Ho, Tm, Pt, Tl, Pb, Bi и особенно Th, для растворения которого благоприятна восстановительная обстановка (табл. 2). Соотношение концентрации тория к урану в 2016-м году составило 0.6, тогда как в пробах 2015 г. оно доходило до 4.8, а фоновое значение этого показателя в поверхностных водах района Уш-Бельдира в период наших наблюдений составляло всего 1.93×10^{-4} . Микроэлементный

Таблица 1. Химический состав воды и разгружающихся газов источника Дикий аржаан на момент отбора проб микробных обрастаний

Компонент	Концентрация, мг/л		±δ, %	Метод анализа ¹
	2015 г.	2016 г.		
Растворенный CO ₂	Н.о.	Н.о.		Г
CO ₃ ²⁻	75	74	25	Г
HCO ₃ ⁻	113	104	25	Г
SO ₄ ²⁻	36	44	33	Гб
Cl ⁻	19	24	16	Г
Ca ²⁺	2.3	3.4	25	Г
Mg ²⁺	0.49	0.10	31	ИХ
Na ⁺	108	120	17	ИХ
K ⁺	2.9	3.1	12	ИХ
NH ₄ ⁺	1.64	0.56	39	Фм
NO ₃ ⁻	0.03	<0.01	17	ИХ
NO ₂ ⁻	0.02	Н.о.	30	Фм
PO ₄ ³⁻	<0.05	Н.о.		ИХ
Br ⁻	0.02	0.05	26	ИХ
F ⁻	12	8.1	15	П
Li ⁺	0.05	0.05	23	ИХ
H ₂ SiO ₃	145	107	10	Г
Органический углерод	1.6	<1.0	10	ВТКО
Минерализация по сумме солей	368	331	10	Расчет
Общая минерализация (TDS) по электрической проводимости при 58°C	360	373	10	Расчет
	Состав смеси газов ² , об. %			
H ₂	0.14		14	ГХ
O ₂	4.34		2	ГХ
N ₂	91.88		1	ГХ
N ₂ O	Н.о.			ГХ
CO	2.96		2	ГХ
CO ₂	Н.о.			ГХ
CH ₄	0.82		1	ГХ

Н.о. – компонент не обнаружен, значение <X указывает на данные, находящиеся ниже предела достоверной детекции данным методом.

¹ Сокращения методов анализа расшифрованы в разделе “Объекты и методы исследования. Аналитические методы”.

² Состав газовой смеси определяли только в пробах 2015 г.

Таблица 2. Микроэлементный состав воды источника “Дикий аржаан” по данным масс-спектрометрического анализа (ICP-MS)

Элементы	Содержание, нг/л	
	2015 г.	2016 г.
Be	0.0	10.6
B	76000.2	96844.0
Al	42437.3	23701.0
Sc	891.8	0.0
Ti	851.6	966.7
V	3.7	34.0
Cr	125.7	208.3
Mn	382.2	332.4
Fe	7806.1	5282.4
Co	1.9	2.0
Ni	739.0	739.3
Cu	175.1	53.3
Zn	4386.9	1524.0
Ga	3286.6	3023.8
Ge	4958.6	4761.1
As	79.9	42.0
Se	739.3	739.3
Rb	22320.5	19643.6
Sr	90550.0	87715.5
Y	1.1	2.6
Zr	43.2	4.6
Nb	25.1	5.1
Mo	5803.9	5623.3
Ru	1.5	0.0
Pd	8.4	0.0
Cd	0.0	561.7
In	3.4	0.0
Sn	39.8	6.7
Sb	365.2	426.7
Te	82.1	0.0
Cs	7923.2	7337.6
Ba	16069.4	6063.5
La	4.3	4.8
Ce	10.5	5.7
Pr	1.1	0.2
Nd	4.3	0.9
Eu	0.6	0.5
Ho	0.5	0.0
Tm	0.6	0.0
Hf	5.2	0.0
Ta	36.4	17.0
W	17139.8	18227.0
Ir	3.7	0.0
Pt	1.9	0.0
Au	30.7	0.0
Tl	27.0	0.0
Pb	75.1	27.1
Bi	4.6	0.0
Th	15.5	1.5
U	3.2	2.6

Примечание. Данные по элементам, ионы которых указаны в табл. 1, здесь не представлены. Также, не представлены данные по элементам, концентрации которых в обеих пробах находятся ниже предела детекции метода. Жирным шрифтом выделены элементы, содержание которых служит индикатором глубинных вод (см. разъяснения в тексте). Относительная погрешность измерений составляет 5%.

состав воды в сочетании с высокой концентрацией кремния указывает на близость физико-химических условий источника в 2015-м году к условиям подземной геотермальной водонапорной системы месторождения. Это значит, что исследуемое сообщество термофильных микроорганизмов, сформировавшееся на изливе источника “Дикий аржаан” в 2015-м году, испытывало существенное влияние подземной гидротермальной системы, питающей источник.

Филогенетическое разнообразие микробного сообщества источника «Дикий аржаан». После фильтрации некачественных и химерных прочтений, а также последовательностей, относящихся к неинтересующим нас группам (митохондрии, хлоропласты, эукариоты), для образцов придонных (U151) и поверхностных (U152) микробных матов 2015 г. было получено 180797 и 215885 прочтений, соответственно. По образцам придонных матов 2016 г. было получено 52360 прочтений. Для анализа бралось 50000 случайно отобранных прочтений каждого образца. Средняя длина прочтений составляла 253 нуклеотида, что соответствует длине варибельного участка V4 гена 16S рРНК подавляющего большинства известных бактерий и архей. По результатам анализа выявления индивидуальных филотипов (Amplified Sequence Variants, ASV) методом Deblur (Amir et al., 2016) при уровне сходства 95% была получена 201 индивидуальная последовательность, встречающаяся 10 или более раз суммарно во всех образцах.

Расчет индекса Шеннона показал, что в целом разнообразие микробных сообществ источника “Дикий аржаан” нельзя назвать высоким: при отборе 2015 г. для придонного образца значение индекса составило 2.31; для поверхностных матов U152 – 1.96; однако при отборе проб в 2016 году наблюдаемое микробное сообщество было более разнообразным, и индекс Шеннона составил 3.81, что может говорить о смешении подземного и поверхностного микробных сообществ.

Согласно нашим данным в источнике в 2015-м году доминировали представители филума некультивируемых бактерий candidate division OP1 “*Acetothermia*”, а также филумов *Chloroflexi* и *Nitrospirae*, причём в донных отложениях наибольшую долю сообщества составляли “*Acetothermia*” и *Chloroflexi*, тогда как в матах, развивающихся на деревянных поверхностях, последняя группа доминирует, численность “*Acetothermia*” значительно уменьшается, а доля *Nitrospirae* удваивается за счет уменьшения общей доли минорных компонентов сообщества. В пробах придонных матов 2016 г. при общем увеличении биоразнооб-

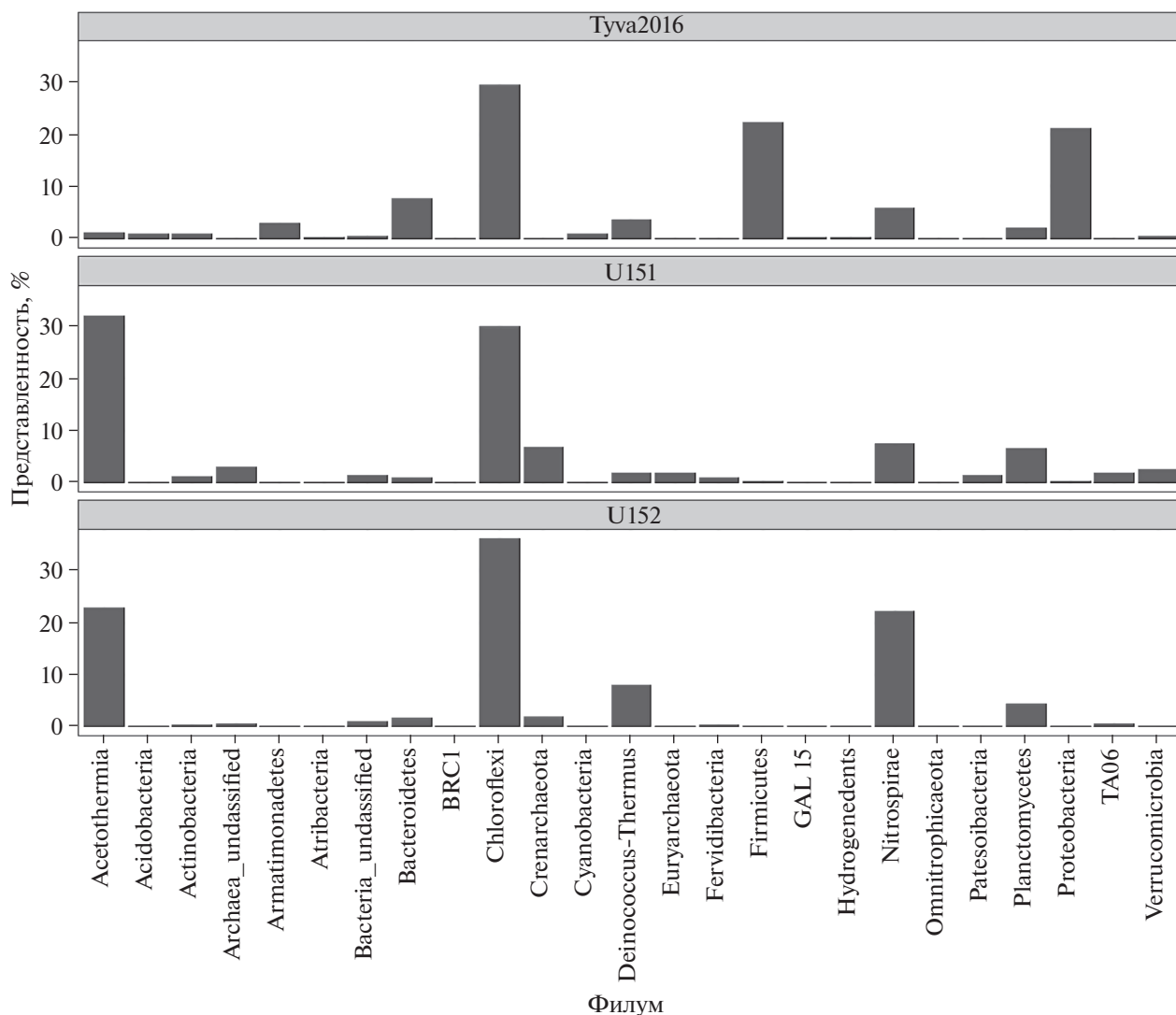


Рис. 1. Состав филумов микробного сообщества источника “Дикий аржаан” по результатам профилирования по гену 16S рРНК. U151 – образец придонного мата 2015 г., U152 – образец поверхностного мата 2015 г., Tyva2016 – образец придонного мата 2016 г.

разия существенно изменился состав доминирующих групп. Более четверти сообщества в 2016-м году составили представители *Chloroflexi*. Второй наиболее представленной группой были *Firmicutes*, количество *Nitrospirae* существенно уменьшилось, а представители “*Acetothermia*” составили лишь минорную часть сообщества придонных матов (рис. 1).

Филум “*Acetothermia*” в пробах 2015 г. представлен одним доминирующим (32.1 и 22.8% сообщества в придонном и поверхностном образцах, соответственно), и одним минорным филотипом (0.1% в придонных образцах). Различия между этими филотипами соответствуют уровню разных родов внутри группы ОРВ14, имеющей уровень класса. В пробах 2016 г. “*Acetothermia*” представле-

ны теми же двумя филотипами группы ОРВ14 и суммарно составляют только 1.12% сообщества, причем филотип, доминировавший в 2015-м г., наименее представлен в 2016-м (0.29% сообщества). Сходные последовательности клонов “*Acetothermia*” были детектированы в образцах почвы гидротермального поля Тэнчун (Tengchong, южный Китай), а также образцах, полученных из подземных нефтяных месторождений Китая и Аляски (табл. 3). Представители “*Acetothermia*” встречаются в подземных нефтяных месторождениях (Hu et al., 2016), температуры которых сходны с температурой источника “Дикий аржаан”. Филум *Chloroflexi* в источнике в образцах придонных и поверхностных матов 2015 г. представлен в основном некультивируемым порядком SBR1031,

Таблица 3. Представленность основных (более 1%) таксонов в образцах по результатам профилирования по гену 16S рРНК

№	Филум	Семейство	Придонный мат U151, %	Поверхностный мат U152, %	Придонный мат, отбор 2016	Номер репрезентативной последовательности в базе NCBI	Ближайший валидный вид ¹	Ближайшие клоны
БАКТЕРИИ								
1.	"Acetothermia"	"Acetothermia"	32.1	22.8	1.2	MG950093 MG950129	–	KM585443, гидротермальное поле Tengchong, Китай (96%) KU087312, нефтяное месторождение, Китай (96%)
2.	Chloroflexi	Не определено (некультивируемый порядок SBR1031, класс <i>Anaerolineae</i>)	26.1	33.8	1.22	MG950094 MG950114	–	KX213925, источник Mushroom, Йеллоустонский национальный парк, США (99%)
		<i>Roseiflexaceae</i>	2.8	1.8	25.1	MG950100	<i>Roseiflexus castenholzii</i> (100%)	
3.	Nitrospirae	<i>Thermodesulfo-vibrionaceae</i>	4.7	18.4	1.1	MG950095 MG950116	<i>Thermodesulfovibrio hydrophilus</i> (92%)	KC831426, горячий источник Betong, Таиланд (96%)
		Некультивируемое семейство (класс <i>Thermodesulfovibrionia</i>)	2.8	3.8	4.4	MG950096	–	KX163921, подземная базальтовая экосистема, глубина 500 метров (96%)
4.	Planctomycetes	<i>Pirellulaceae</i>	6.6	4.4	1.3	MG950097 MG950113	<i>Thermostilla marina</i> (94%)	KU860154, источник Mushroom, Йеллоустонский национальный парк, США (99%)
5.	Deinococcus-Thermus	<i>Thermaceae</i>	1.8	7.9	3.6	MG950098 MG950105	<i>Meiothermus cateniformans</i> (98%)	KP204494, источник геотермального поля Sorahu, Аргентина (100%)
7.	Verrucomicrobia	<i>Pedospiraetaceae</i>	2.5	0.01	0.47	MG950102	<i>Limisphaera ngatamariensis</i> (91%)	NM991574, источник национального парка Хот-Спрингс, США
8.	Candidata division TA06	Не определено	1.22	0.46	0.01	MG950104 MG950117	–	MF454701, эвтрофное озеро, Китай
9.	Armatimonadetes	Не определено	0.06	0.13	2.78	MG950123	–	KT258804, горячий источник Tsenher, Монголия (100%)
10.	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Flavobacteriaceae</i> <i>Ignavibacteriaceae</i> <i>Sphingobacteriaceae</i> <i>Weeksellaceae</i>	0 0.29 0 0	0 0.71 0 0	2.6 1.36 1.15 1.37	MH569674 MG950110 MH569675 MH569676	<i>Flavobacterium frigidimaris</i> (100%) <i>Ignavibacterium album</i> (99%) <i>Pedobacter humicola</i> (100%) <i>Chryseobacterium balustinum</i> (100%)	KJ529065, полярное растение субарктических песчаных дюн (100%) KY077445, геотермальная система Bad Blumau, Австрия (99%) NR_132685, лесная почва горы Bukhan, Южная Корея (100%)

Таблица 3. Окончание

№	Филум	Семейство	Придонный мат U151, %	Поверхностный мат U152, %	Придонный мат, отбор 2016	Номер репрезентативной последовательности в базе NCBI	Ближайший валидный вид ¹	Ближайшие клоны
11.	Firmicutes	<i>Clostridiaceae</i> <i>Lachnospiraceae</i> <i>Perfossaceae</i> <i>Ruminococcaceae</i>	0 0 0.03 0	0 0 0.04 0	5.56 9.33 1.54 2.18	MH569677 MH569678 MH569679 MH569680 MH569681 MH569682 MH569683 MH569684 MH569685	<i>Clostridium estertheticum</i> (100%) <i>Mobilitatea sibirica</i> (98%) <i>Desulfosporosinus acididurans</i> (97%) <i>Clostridium cellobioparum</i> (99%)	KM656262, горный перевал Se La pass, Индия (99%) Образцы воды озер, Северная Америка (99%) KY942712, кислые воды шахт Igon Springs, США (100%) FJ802375, донные отложения Эбро, Эльбы и Дуная (100%)
12.	Proteobacteria	<i>Burkholderiaceae</i> <i>Saulobacteraceae</i> <i>Pseudomonadaceae</i>	0.02 0 0	0 0 0	12.67 1.59 4.76	MH569686 MH569687 MH569688 MH569689	<i>Acidovorax anthurii</i> (99%) <i>Phenylobacterium fallsum</i> (100%) <i>Pseudomonas siliuensis</i> (100%)	KU475670, горячие источники Qizhuomu, Тибет (100%) LN533709, фильтры водопроводных линий Колпатаена, Дания (100%) MG746623, отложения Каспийского моря (100%)
	АРХЕИ							
13.	Stenarchaeota	“ <i>Caldiarchoaeaceae</i> ”	6.3	1.9	0.01	MG950099 MG950126 MG950128	–	KX213943, источник Mushroom, Йеллоустоунский национальный парк (100%)
	РЕДКИЕ	ТАКСОНЫ						
14.	Euryarchaeota, Ignavibacteriae, Hydrogenobacteriales и Acidobacteria		1.95	0.16	1.3			

Состав филумов микробного сообщества источника “Дикий аржаан” по результатам профилирования по гену 16S рРНК. U151 – образец придонного мата 2015 г., U152 – образец поверхностного мата 2015 г., Тува2016 – образец придонного мата 2016 г.

относящимся к классу *Anaerolineae*, представители которого обладают броидильным типом метаболизма (Podosokorskaya et al., 2013a). Тогда как в образцах 2016 г. доминирующие филоциты *Chloroflexi* относятся к роду термофильных нитчатых аноксигенных фотогетеротрофов *Roseiflexus* (25.1% сообщества в целом), а представители *Anaerolineae* составляют лишь 1.22% сообщества. *Nitrospirae* во всех пробах представлены семейством *Thermodesulfobionaceae* и некультивируемыми группами порядка *Thermodesulfobionales*. Клоны, близкие последнему таксону, были обнаружены в пробах подземной биосферы ранее (табл. 3). Также, в значительном количестве в придонных матах 2015 г. обнаруживаются представители филума *Planctomycetes*, наиболее близким для них культивируемым организмом является *Thermostilla marina*, выделенная из прибрежных морских гидротерм Курильских островов (Slobodkina et al., 2016). В 2016-м году доля *Planctomycetes* в сообществе снижается до 2%. Однако в этих же пробах наблюдается широкое разнообразие фирмикут, среди которых выделяются представители семейств анаэробных органотрофов *Lachnospiraceae* и *Clostridiaceae*, доля которых в сообществе составляет 9.3 и 5.5%, соответственно. Большинство известных представителей *Lachnospiraceae* являются мезофильными микроорганизмами, выделенными из различных наземных местообитаний однако среди них есть и представители подземной биосферы (Podosokorskaya et al., 2014). Также, в придонных матах 2016 г. было зафиксировано широкое разнообразие протеобактерий с доминированием представителей семейства *Burkholderiaceae*, большинство которых также обладает броидильным типом метаболизма (Rosenberg et al., 2014a).

В обрастаниях деревянных стенок источника (образец U152), которые были наиболее плотными в 2015-м году, детектировано значительное количество представителей филума *Deinococci-Thermi* (рисунок). Из минорных компонентов сообщества источника “Дикий аржаан” (как придонной, так и поверхностной его части) стоит отметить некультивируемые формы недавно предложенных филумов *Armatimonadetes* и *Ignavibacteriae*, максимальная доля которых наблюдалась в придонных матах 2016 г. и составляла 1.6 и 3.0% соответственно; представителей *Verrucomicrobiae* (2.5% в придонных матах 2015 г.) и некультивируемых бактерий таксона candidate division TA06 (1.9% в придонных матах 2015 г.), клоны которого часто обнаруживаются в богатых органикой эвтрофных водоемах. Среди архей доминировали некультивируемые представители семейства “*Caldiararchaeaceae*” (6.32% в придонных матах 2015 г.), ко-

торые согласно реконструкциям геномов могут быть способны как к автотрофии, так и гетеротрофному росту на пептидах (Nunoura et al., 2011). Наконец, как в поверхностных, так и в придонных микробных матах источника встречаются представители *Euryarchaeota* (в образцах 2015 г.), *Hydrogenedentes* и *Acidobacteria* (в основном, в образцах 2016 г.), однако относительная представленность каждого из этих филумов не превышает 1.5%.

Из ДНК образцов поверхностных (U152) матов были получены две метагеномные библиотеки. По результатам секвенирования метагеномных библиотек для них было получено суммарно 2679988 прочтений общей длиной 672676988 нуклеотидов. *De novo* сборка метагенома имела длину 31020002 п.н. состояла из 24758 контигов. Максимальная длина контига составила 214423 п.н., N50 – 2132 п.н. Кластеризация контигов при помощи инструмента CONCOCT показала, что они формируют пять наиболее полных кластеров, соответствующих трем наиболее представленным филумам: *Nitrospirae*, “*Acetothermia*” и *Chloroflexi*. Оценка полноты и контаминации полученных 5 кластеров контигов при помощи ПО CheckM дала следующие результаты: полнота от 77.21% до 98.78% (среднее значение 90.79%), контаминация кластеров от 0.92 до 3.39% (среднее значение 2.20%). При этом филум *Chloroflexi* представлен тремя выраженными кластерами контигов, один из которых наиболее близок к роду *Roseiflexus*, а два других – к классу *Anaerolineae*. Сопоставление одной из групп контигов, близких к классу *Anaerolineae*, с результатами профилирования сообщества по гену 16S рПНК дает основания предположить, что эти контиги относятся к некультивируемой группе *Anaerolineae* SBR1031, обнаруженной ранее в анаэробных целлюлолитических консорциумах сточных вод (Xia et al., 2011), а также в зонах абиогенных газовых высачиваний (Neubeck et al., 2017).

При выравнивании прочтений на метагеном было успешно картировано 1797597 из 2679988 прочтений (67.07% от общего числа) общей длиной 390945567 нуклеотидов, среднее покрытие метагенома составило 12.60. На кластер контигов, определенных как “*Acetothermia*”, пришлось 196338 прочтений, что составило 10.92% от числа картированных прочтений. Стоит, однако, отметить, что это число не может напрямую отражать долю микроорганизмов данного таксона в сообществе, и скорее всего, его доля будет выше, т.к. размеры опубликованных геномов “*Acetothermia*” не превышают 2 млн п.н., что значительно меньше, чем

средний размер геномов представителей *Chloroflexi*, составляющих значительную часть микробного сообщества “Дикого аржаана”. При этом среднее покрытие контигов “*Acetothermia*” и контигов, отнесенных к семейству *Roseiflexaceae* филума *Chloroflexi*, получилось сходным — 36.78 и 36.81, соответственно.

Для достоверной оценки количественной представленности двух доминирующих таксонов было проведено картирование прочтений на базу последовательностей однокопийного гена *rpsB* при помощи ПО GraftM. В результате было получено следующее таксономическое распределение микроорганизмов “Дикого аржаана”: 43.57% — *Chloroflexi*, среди которых 15.75% составляет *Roseiflexus*, 22.57% — candidate division OP1 “*Acetothermia*”, 11.02% — *Nitrospirae*. Эти данные, в целом, подтверждают результаты профилирования сообщества по гену 16S рРНК, хотя и обладают меньшей разрешающей способностью.

Метаболическое разнообразие источника “Дикий аржаан”. В метагеноме источника “Дикий аржаан” был осуществлен поиск генов ключевых ферментов некоторых катаболических процессов, характерных для анаэробных прокариот, а именно: генов ферментов катаболизма соединений азота, диссимиляционных сульфатредуктаз и железоредуктаз, гидрогеназ, СО-дегидрогеназ, алкогольдегидрогеназ, альдегидредуктаз, а также ключевых генов всех известных на сегодняшний день путей фиксации неорганического углерода и генов эстераз. Поиск эстераз был осуществлен с учетом недавнего описания их нового семейства из представителя филума “*Acetothermia*” (Zarafeta et al., 2016). Для получения данных о представленности вышеперечисленных генов в метагеноме было оценено количество геномов, которые могут быть представлены в сообществе (такая оценка необходима, т. к. кластеризация контигов может не давать полной картины). Суммарная длина метагенома в 31020002 пары нуклеотидов была поделена на средний размер генома по данным JGI IMG — 3782728 пар нуклеотидов. Это позволяет предположить, что в метагеноме представлено, как минимум, 8 микроорганизмов. Учитывая то, что из-за недостаточного покрытия последовательности геномных контигов минорных представителей сообщества представлены не полностью, можно говорить о 10–12 микроорганизмах, представляющих основную часть микробного сообщества источника “Дикий аржаан”. Общее число белок-кодирующих генов, предсказанных в метагеноме, составило 43521, из них 16672 име-

ли предсказанные старт- и стоп-кодоны, т.е. представляли полные последовательности генов.

Установлено присутствие в метагеноме гомологов ключевых генов денитрификации — молибдоптеринового нитратредуктаза NapA и NapG, нитритредуктаза NirK и NirS, NO-редуктазы NorB, аммонифицирующей восьмимеговой нитритредуктазы Onr (Simon and Klotz, 2013). Всего в метагеноме было обнаружено 13 генов, детерминирующих все стадии денитрификации, кроме образования газообразного азота, что составило 0.078% от общего количества полных генов в метагеноме (далее доля от общего количества полных генов представлена в скобках). Гомологов азотобразующих NO- и N₂O-редуктаз семейств Nod и Nos, а также диссимиляционных сульфатредуктаз DsrAB в метагеноме обнаружено не было. Поиск детерминант других процессов анаэробного дыхания выявил 3 гена (0.018%) терминальных мультигеновых железоредуктаз, описанных у модельных металл-восстанавливающих микроорганизмов *Shewanella oneidensis* и *Geobacter sulfurreducens* и обеспечивающих перенос электронов на минеральный акцептор (Shi et al. 2016). Также, было обнаружено 38 генов (0.228%), кодирующих белки, которые могут участвовать в процессе биосинтеза этанола и бутанола: ферменты класса EC 1.1.1, включая НАДН- и НАДФН-зависимые алкоголь- и бутанолдегидрогеназы. Таксономическое распределение лучших BLAST-хитов 38-ми *in silico*-транслированных аминокислотных последовательностей показало, что большинство из них принадлежат бактериям филумов *Chloroflexi* и *Deinococci/Thermi*, а также к новым глубоким филогенетическим ветвям. В среднем геном представителя данного сообщества кодирует 3–4 фермента данной группы. В метагеноме было обнаружено 4 гена (0.024%), кодирующих СО-дегидрогеназы. Из них 3 находились в составе генных кластеров, включающих гены ацетил-КоА синтазы. Также было обнаружено 3 гена (0.018%) каталитических субъединиц Fe,Fe-гидрогеназ и 15 генов (0.090%) каталитических субъединиц Ni,Fe-гидрогеназ (из которых 3 — конвертирующие энергию, Vignais and Billoud, 2007). Таким образом в среднем, геном представителя данного сообщества кодирует две гидрогеназы.

Поиск генов фиксации азота и углерода в метагеноме источника “Дикий аржаан” выявил 5 генов (0.030%) ключевых субъединиц NifD и NifH нитрогеназного комплекса, характерного для диазотрофов, а также гены ключевых ферментов нескольких путей фиксации CO₂: 14 генов (0.084%) 3-гидроксипропионатного/4-гидроксипропионатного

цикла (из них 11 – характерных только для представителей *Chloroflexi*), 5 генов (0.030%) АТФ-цитратлиазы восстановительного цикла трикарбоновых кислот, 3 гена (0.018%) ацетил-КоА синтаза пути Вуда-Льюнгаля (один из этих генов идентифицирован как принадлежащий представителю “*Acetothermia*”). Помимо генов путей автотрофной фиксации углерода, в метагеноме источника “Дикий аржаан” было выявлено 33 гена (0.198%) эстераз семейств IV, V, VI, VIII, XIII, а также нового семейства XV, одним из первых охарактеризованных представителей которого была эстераза из “*Acetothermia*”, обнаруженная при нашем анализе метагенома горячего источника Солнечный (кальдера Узон, Камчатка, Zarafeta et al. 2016). В среднем, геном представителя микробного сообщества кодирует 3 гена эстераз.

Поиск генов вторичных метаболитов выявил в метагеноме “Дикого аржаана” три кластера биосинтеза бактериоцинов (два из них содержат гомологов нескольких генов биосинтеза линоцина M18), а также кластер синтеза N-ациламинокислот. Все найденные генные кластеры, предположительно, принадлежат представителям филума *Chloroflexi*, которые, по-видимому, являются активными антагонистами в сообществе.

ОБСУЖДЕНИЕ

Гидротермы Восточно-Тувинского нагорья остаются практически неизученными с микробиологической точки зрения. Вместе с тем, неоднородная геологическая обстановка в местах их формирования и широкий диапазон их физико-химических характеристик создают условия для развития разнообразных термофильных микробных сообществ, которые с высокой вероятностью могут содержать новые таксономические и физиологические группы микроорганизмов. Нами впервые было исследовано термофильное микробное сообщество крупной щелочной гидротермы “Дикий аржаан” Уш-Бельдирского месторождения термальных вод. В источнике сформированы две различные, но взаимосвязанные экологические ниши – богатые органическими остатками и минеральными отложениями донные осадки, через которые разгружается анаэробная газовая смесь, и деревянные стенки колодца, в который каптирован источник. Содержание растворенного органического углерода в источнике оказалось низким, что означает незначительный приток растворимой органики и/или эффективность ее деструкции микроорганизмами сообщества.

Высокая температура водоносных горизонтов является определяющим фактором геохимиче-

ских характеристик источников Уш-Бельдирского месторождения. Формирование этих термальных вод, предположительно, глубинное, т.к. в их составе отмечается более 3% мантийного гелия, а в газовом составе присутствуют гелий и углеводороды, высвобождающиеся за счет минерализации органических веществ в породах (Дучков и соавторы, 2010). Наш анализ, проведенный в различных гидрологических условиях 2015 и 2016 гг., выявил также влияние метеорных и/или приповерхностных грунтовых вод на геохимические характеристики источника “Дикий аржаан”.

В результате профилирования проб микробных матов источника “Дикий аржаан” по гену 16S рРНК было выявлено доминирование представителей филума некультивируемых бактерий candidate division OP1 “*Acetothermia*”, а также филума *Chloroflexi*. Причем, некультивируемая группа OP1 составляет значительную часть сообщества как в придонных (32%), так и в поверхностных (23%) матах, что может быть связано с предполагаемой автотрофией представителей OP1 (Takami et al. 2012). Согласно имеющейся реконструкции генома OP1 эта группа обладает древней формой ацетил-КоА пути фиксации углерода из CO₂ (карбоната), который является основной формой неорганического углерода, доступной в источнике “Дикий аржаан”, согласно нашему геохимическому анализу. Принадлежащий представителю “*Acetothermia*” ключевой фермент этого пути, ацетил-КоА синтаза, идентифицирован нами в метагеноме источника “Дикий аржаан” в 2015 г., в засушливый период. Интересно, что доминирование представителей “*Acetothermia*” наблюдалось именно в этот период, когда гидрогеохимические характеристики источника были наиболее близки к условиям глубинных геотермальных горизонтов, его формирующих. Тогда как в дождливый период 2016 г., связанный с увеличением влияния грунтовых вод на характеристики источника и отразившийся в снижении концентрации ряда редкоземельных элементов (табл. 2), доля “*Acetothermia*” падала до 1% сообщества (рисунок). Значительная и довольно стабильная доля представителей *Chloroflexi* в сообществе (25.1–33.8%, табл. 3), вероятно связана со способностью организмов этой группы к синтрофии и гетеротрофному росту на широком спектре углеродных субстратов (Rosenberg et al., 2014b).

Микробное разнообразие источника “Дикий аржаан” в гидрологических условиях, наиболее близких к подземным водоносным горизонтам (пробы 2015 г.), оказалось достаточно узким (средний индекс Шеннона 2.20), что также гово-

рит в пользу достаточно большой степени замкнутости данной системы. Немного большее разнообразие придонных матов соотносится с большим количеством различных углеродных субстратов и неорганических акцепторов электронов, доступных в донной части источника. В дождливый сезон (пробы 2016 г.) разнообразие сообщества источника “Дикий аржаан” значительно возрастает (индекс Шеннона 3.81). При этом изменяется состав доминирующих групп в пользу фирмикут и протеобактерий, тогда как значительно снижается доля новых некультивируемых форм (рисунок). Это явление вполне ожидаемо, учитывая возможное привнесение значительного количества органического вещества и микрофлоры извне, с метеорными, а затем и грунтовыми водами. О возможном привнесении в источник аллохтонной микрофлоры свидетельствует, в частности, обнаружение представителей семейства *Burkholderiaceae* (Rosenberg et al., 2014a). Существенное падение численности представителей группы ОР1 при разбавлении термальной воды грунтовыми водами свидетельствует также о возможном происхождении популяции “*Acetothermia*” в источнике “Дикий аржаан” из глубинных геотермально нагреваемых водоносных горизонтов. Похожая ситуация наблюдается и с семейством *Anaerolineae* филума *Chloroflexi*, некоторые представители которых были выделены из термальной воды глубоководной нефтескважины (Podosokorskaia et al., 2013a). Как и в случае с “*Acetothermia*”, численность *Anaerolineae* в сообществе “Дикого аржаана” при разведении источника грунтовыми водами существенно падает одновременно с ростом доли бактерий рода *Roseiflexus*.

Анализ функциональных генов, детерминирующих различные пути энергетического метаболизма, выявил потенциальные ферменты денитрификации (нитрат-, нитрит- и NO-редуктазы), однако ключевых ферментов стадии образования газообразного азота обнаружено не было. С другой стороны, были обнаружены гены нитрогеназ, что свидетельствует о возможности биологической фиксации азота, составляющего 92% газовой фазы источника. Помимо ферментов, детерминирующих катаболизм соединений азота, в метагеноме “Дикого аржаана” были обнаружены диссимиляционные железоредуктазы, СО-дегидрогеназы и гидрогеназы. Учитывая небольшое количество обнаруженных генов мультигеновых цитохромов, силикатные минералы железа(III), доступные для железовосстанавливающих организмов, вряд ли являются ключевыми акцепторами электронов для исследуемого микробного со-

общества. Более вероятными акцепторами электронов для процессов анаэробного дыхания в источнике “Дикий аржаан” могут быть окисленные соединения азота. Возможными энергетическими субстратами могут быть СО в составе газовой смеси, высвобождающейся со дна источника, аммоний, детектированный в воде источника, а также органическое вещество, в частности, липиды. Об использовании последних в качестве энергетических и углеродных субстратов говорит широкое разнообразие эстераз в метагеноме источника. Следует отметить, что несмотря на значительное количество аллохтонного органического вещества в источнике, существенную роль в функционировании его микробного сообщества, по-видимому, играют автотрофные прокариоты. Это соотносится с достаточно высоким и стабильным содержанием карбонатов и бикарбонатов в источнике (табл. 1), с доминированием представителей ‘*Acetothermia*’, которые могут быть способны к автотрофной фиксации СО₂ согласно имеющейся геномной реконструкции (Takami et al. 2012), а также с относительно высокой представленностью генов нескольких различных путей фиксации СО₂ в метагеноме “Дикого аржаана”. Помимо “*Acetothermia*”, существенную часть сообщества составляют представители филума аноксигенных фототрофов *Chloroflexi*. При этом, многие представители *Chloroflexi*, в частности, класса *Anaerolineae*, способны и к гетеротрофному росту, а для “*Acetothermia*” такая возможность предсказана на геномном уровне (Takami et al. 2012).

Таким образом, экологическую роль представителей нового филума некультивируемых бактерий “*Acetothermia*” еще предстоит оценить, однако доминирование этой группы микроорганизмов показано для наземного горячего источника впервые. Анализ изменений состава сообщества в зависимости от гидрогеохимических характеристик источника позволяет предположить происхождение доминирующей группы “*Acetothermia*” из глубинных геотермальных водоносных горизонтов.

Работа выполнена при поддержке проектов РФФИ № 16-54-76022, № 16-54-10072 и “зеркального” британского проекта Royal Society UK-funded joint UK -Russia Project “Novel microorganisms and new enzymes from the Baikal Rift Zone” (Grant Nr IE160224). Работы по поиску генов железоредуктаз, ацетил-КоА синтаз, СО-дегидрогеназ и гидрогеназ в метагеноме источника “Дикий аржаан” проводились в рамках проекта РФФИ № 17-74-30025.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Дучков А.Д., Рычкова К.М., Лебедев В.И., Каменский И.Л., Соколова Л.С. Оценки теплового потока Тувы по данным об изотопах гелия в термоминеральных источниках // Геология и геофизика. 2010. Т. 51. № 2. С. 264–276.
- Duchkov A.D., Rychkova K.M., Lebedev V.I., Kamenskii I.L., Sokolova L.S. Estimation of heat flow in Tuva from data on helium isotopes in thermal mineral springs // Russian Geology and Geophysics. V. 51. № 2. P. 209–219.
- Зеленкина Т.С., Ешинимаяев Б.Ц., Дагурова О.П., Сузина Н.Е., Намсараев Б.Б., Троценко Ю.А. Аэробные метанотрофы прибрежных гидротерм озера Байкал // Микробиология. 2009. Т. 78. № 4. С. 545–551.
- Zelenkina T.S., Eshinimayev B.Ts., Dagurova O.P., Suzina N.E., Namsarayev B.B., Trotsenko Yu.A. Aerobic Methanotrophs from the Coastal Thermal Springs of Lake Baikal // Microbiology. V. 78. № 4. P. 483–492.
- Калашников А.М., Гайсин В.А., Сухачева М.В., Намсараев Б.Б., Пантелеева А.Н., Нуанзина-Болдарева Е.Н., Кузнецов Б.Б., Горленко В.М. Аноксигенные фототрофные бактерии микробных сообществ термального источника Горячинск (Прибайкалье) // Микробиология. 2014. Т. 83. № 4. С. 484–484.
- Kalashnikov A.M., Gaisin V.A., Sukhacheva M.V., Namsarayev B.B., Panteleeva A.N., Nuyanzina-Boldareva E.N., Kuznetsov B.B., Gorlenko V.M. Anoxygenic Phototrophic Bacteria from Microbial Communities of Goryachinsk Thermal Spring (Baikal Area, Russia) // Microbiology. V. 83. № 4. P. 398–407.
- Компанцева Е.И., Горленко В.М. Фототрофные сообщества в некоторых термальных источниках озера Байкал // Микробиология. 1988. Т. 57. № 5. С. 841.
- Логачев Н.А. История и геодинамика Байкальского рифта // Геология и геофизика. 2003. Т. 44. № 5. С. 391–406.
- Меркель А.Ю., Корнеева В.А., Тарновецкий И.Ю., Брюханов А.Л., Часовников В.К., Таранов Е.А., Тошаков С.В., Пименов Н.В. Структура сообщества архей в фотической зоне водной толщи Черного моря // Микробиология. 2015. Т. 84. № 4. С. 476–476.
- Merkel A.Y., Korneeva V.A., Tarnovetskii I.Yu., Bryukhanov A.L., Chasovnikov V.K., Taranov E.A., Toshchakov S.V., Pimenov N.V. Structure of the Archaeal Community in the Black Sea Photic Zone // Microbiology. V. 84. № 4. P. 561–570.
- Намсараев З.Б., Горленко В.М., Намсараев Б.Б., Бурюхаев С.П., Юрков В.В. Структура и биогеохимическая активность фототрофных сообществ щелочного термального Больнереченского источника // Микробиология. 2003. Т. 72. № 2. С. 228–238.
- Namsarayev Z.B., Gorlenko V.M., Namsarayev B.B., Buryukhaev S.P., Yurkov S.P. The Structure and Biogeochemical Activity of the Phototrophic Communities from the Bol'sherechenskii Alkaline Hot Spring // Microbiology. V. 72. № 2. P. 187–193.
- Пиннекер Е.В. Минеральные воды Тувы. Кызыл, Тув. кн. изд. 1968. С. 106.
- Раднагуруева А.А., Лаврентьева Е.В., Будагаева В.Г., Бархутова Д.Д., Дунаевский Я.Е. Намсараев Б.Б. Органотрофные бактерии горячих источников байкальской рифтовой зоны // Микробиология. 2016. Т. 85. № 3. С. 347–360.
- Radnagurueva A.A., Lavrentieva E.V., Budagaeva V.G., Barkhutova D.D., Dunaevsky Y.E., Namsaraev B.B. Organotrophic Bacteria of the Baikal Rift Zone Hot Springs // Microbiology. V. 85. № 3. P. 367–379.
- Albertsen M., Hugenholtz P., Skarshewski A., Nielsen K.L., Tyson G.W., Nielsen P.H. Genome sequences of rare, uncultured bacteria obtained by differential coverage binning of multiple metagenomes // Nature biotechnology. 2013. V. 31. № 6. P. 533.
- Amir A., McDonald D., Navas-Molina J.A., Kopylova E., Morton J., Zech X., Kightley E., Thompson L., Hyde E., Gonzalez A., Knight R. Deblur Rapidly Resolves Single-Nucleotide Community Sequence Patterns // mSystems. 2017. V. 7. № 2. P. e00191–16.
- Elshahed M.S., Senko J.M., Najar F.Z., Kenton S.M., Roe B.A., Dewers T.A., Spear J.R., Krumholz L.R. Bacterial diversity and sulfur cycling in a mesophilic sulfide-rich spring // Applied and Environmental Microbiology. 2003. V. 69. № 9. P. 5609–5621.
- Fadrosh D.W., Ma B., Gajer P., Sengamalay N., Ott S., Brotman R.M., Ravel J. An improved dual-indexing approach for multiplexed 16S rRNA gene sequencing on the Illumina MiSeq platform // Microbiome. 2014. V. 2. № 1. P. 6.
- Frank Y.A., Kadnikov V.V., Gavrillov S.N., Banks D., Gerasimchuk A.L., Podosokorskaya O.A., Merkel A.Y., Chernyh N.A., Mardanov A.V., Ravin N.V., Karnachuk O.V., Bonch-Osmolovskaya E.A. Stable and variable parts of microbial community in siberian deep subsurface thermal aquifer system revealed in a long-term monitoring study // Frontiers in microbiology. 2016. V. 7. P. 2101.
- Geissinger O., Herlemann D.P., Mörschel E., Maier U.G., Brune A. The ultramicrobacterium “*Elusimicrobium minutum*” gen. nov., sp. nov., the first cultivated representative of the termite group 1 phylum // Applied and environmental microbiology. 2009. V. 75. № 9. P. 2831–2840.
- Hu P., Tom L., Singh A., Thomas B.C., Baker B.J., Piceno Y.M., Andersen G.L., Banfield J.F. Genome-resolved metagenomic analysis reveals roles for candidate phyla and other microbial community members in biogeochemical transformations in oil reservoirs // MBio. 2016. V. 7. № 1. P. e01669–15.
- Hugenholtz P., Goebel B.M., Pace N.R. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity // Journal of bacteriology. 1998. V. 180. № 18. P. 4765–4774.
- Hyatt D., LoCascio P.F., Hauser L.J., Uberbacher E.C. Gene and translation initiation site prediction in metagenomic sequences // Bioinformatics. 2012. V. 28. № 17. P. 2223–2230.
- Langmead B., Salzberg S.L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2 // Nature methods. 2012. V. 9. № 4. P. 357.
- McMurdie P.J., Holmes S. Phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data // PloS one. 2013. V. 8. № 4. P. e61217.
- Mori K., Yamaguchi K., Sakiyama Y., Urabe T., Suzuki K.I. *Caldisericum exile* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, thermophilic, filamentous bacterium of a novel bacterial phylum, *Caldiserica* phyl. nov., originally called the candidate phylum OP5, and description of *Caldiseriaceae* fam. nov., *Caldisericales* ord. nov. and *Caldisericia* classis nov // International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2009. V. 59. № 11. P. 2894–2898.
- Neubeck A., Sun L., Müller B., Ivarsson M., Hosgörmez H., Özcan D., Broman C., Schnürer A. Microbial community

- structure in a serpentine-hosted abiotic gas seepage at the Chimaera ophiolite, Turkey // *Applied and environmental microbiology*. 2017. V. 83. № 12. P. e03430–16.
- Nunoura T., Takaki Y., Kakuta J., Nishi S., Sugahara J., Kazama H., Chee G.J., Hattori M., Kanai A., Atomi H., Takai K., Takami H. Insights into the evolution of Archaea and eukaryotic protein modifier systems revealed by the genome of a novel archaeal group // *Nucleic acids research*. 2010. V. 39. № 8. P. 3204–3223.
- Nurk S., Meleshko D., Korobeynikov A., Pevzner P.A. MetaSPAdes: a new versatile metagenomic assembler // *Genome research*. 2017. V. 27. № 5. P. 824–834.
- Parks D.H., Imelfort M., Skennerton C.T., Hugenholtz P., Tyson G.W. CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes // *Genome research*. 2015. P. gr. 186072.114.
- Podosokorskaya O.A., Bonch-Osmolovskaya E.A., Novikov A.A., Kolganova T.V., Kublanov I.V. *Ornatilinea apprima* gen. nov., sp. nov., a cellulolytic representative of the class *Anaerolineae* // *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 2013a. V. 63. № 1. P. 86–92.
- Podosokorskaya O.A., Kadnikov V.V., Gavrilov S.N., Mardanov A.V., Merkel A.Y., Karnachuk O.V., Ravin N.V., Bonch-Osmolovskaya E.A., Kublanov I.V. Characterization of *Melioribacter roseus* gen. nov., sp. nov., a novel facultatively anaerobic thermophilic cellulolytic bacterium from the class *Ignavibacteria*, and a proposal of a novel bacterial phylum *Ignavibacteriae* // *Environmental microbiology*. 2013b. V. 15. № 6. P. 1759–1771.
- Posokorskaya O.A., Bonch-Osmolovskaya E.A., Beskorovaynyy A.V., Toshchakov S.V., Kolganova T.V., Kublanov I.V. *Mobilitalea sibirica* gen. nov., sp. nov., a halotolerant polysaccharide-degrading bacterium // *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 2014. V. 64. № 8. P. 2657–2661.
- Quast C., Pruesse E., Yilmaz P., Gerken J., Schweer T., Yarza P., Peplies J., Glöckner F.O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools // *Nucleic acids research*. 2012. V. 41. №. D1. P. D590–D596.
- Rosenberg E., DeLong E.F., Lory S., Stackebrandt E., Thompson F. (Eds.) *The Prokaryotes Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria* // Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag. 2014a. P. 759.
- Rosenberg E., DeLong E.F., Lory S., Stackebrandt E., Thompson F. (Eds.) *The Prokaryotes. Other major lineages of Bacteria and the Archaea. The Phylum Chloroflexi, the Family Chloroflexaceae, and the Related Phototrophic Families Oscillochloridaceae and Roseiflexaceae* // Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag. 2014b. P. 515–532.
- Simon J., Klotz M.G. Diversity and evolution of bioenergetic systems involved in microbial nitrogen compound transformations // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. 2013. V. 1827. № 2. P. 114–135.
- Slobodkina G.B., Panteleeva A.N., Beskorovaynaya D.A., Bonch-Osmolovskaya E.A., Slobodkin A.I. *Thermostilla marina* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, facultatively anaerobic planctomycete isolated from a shallow submarine hydrothermal vent // *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 2016. V. 66. №. 2. P. 633–638
- Takami H., Noguchi H., Takaki Y., Uchiyama I., Toyoda A., Nishi S., Chee G. J., Arai W., Nunoura T., Itoh T., Hattori M., Takai K. A deeply branching thermophilic bacterium with an ancient acetyl-CoA pathway dominates a subsurface ecosystem // *PloS one*. 2012. V. 7. № 1. P. e30559.
- Tamaki H., Tanaka Y., Matsuzawa H., Muramatsu M., Meng X.Y., Hanada S., Mori K., Kamagata Y. *Armatimonas rosea* gen. nov., sp. nov., of a novel bacterial phylum, *Armatimonadetes* phyl. nov., formally called the candidate phylum OP10 // *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 2011. V. 61. № 6. P. 1442–1447.
- Van Der Maaten L., Hinton G. Visualizing high-dimensional data using t-sne // *J Mach Learn Res*. 2008. V. 9. P. 26.
- Vignais P.M., Billoud B. Occurrence, classification, and biological function of hydrogenases: an overview // *Chemical reviews*. 2007. V. 107. № 10. P. 4206–4272.
- Zarafeta D., Moschidi D., Ladoukakis E., Gavrilov S.N., Chrysina E.D., Chatziioannou A., Kublanov I.V., Skretas G., Kolisis F.N. Metagenomic mining for thermostable estero-lytic enzymes uncovers a new family of bacterial esterases // *Scientific reports*. 2016. V. 6. P. 38886.

Members of the Uncultured Taxon OP1 (“*Acetothermia*”) Predominate in the Microbial Community of an Alkaline Hot Spring at East-Tuvian Upland

A. A. Korzhenkov¹, A. V. Teplyuk¹, A. V. Lebedinsky², A. A. Khvashchevskaya³, Yu. G. Kopylova³, K. D. Arakchaa⁴, P. N. Gloyshin⁵, E. A. Lunyov¹, O. V. Golyshina⁵, I. V. Kublanov², S. V. Toshchakov², and S. N. Gavrilov^{2,*}

¹Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia

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

³Tomsk Polytechnic University, Tomsk, Russia

⁴Research Institute of Medico-Social Problems of Tyva Republic, Kyzyl, Russia

⁵Bangor University, Gwynedd, United Kingdom

*e-mail: sngavrilov@gmail.com

Received November 30, 2017

Abstract—The thermophilic microbial community of a hydrotherm at East-Tuvian upland is described. High-throughput profiling of the 16S rRNA gene and sequencing of the complete metagenome were used to characterize the phylogenetic and metabolic diversity of the microbial community of the Dikij Arzjaan alkaline thermal spring of Ush-Bel'dir mineral water deposit in Tyva, Russia. Members of uncultured phylum

'*Acetothermia*' (candidate division OP1) predominated in the microbial community of the spring. While this phylum has already been detected in many thermal ecosystems, it never formed the main component of their microbial communities. Apart from '*Acetothermia*', members of *Nitrospirae* and *Chloroflexi* comprised a significant part of the microbial community. Comparative analysis of our geochemical data on the spring and the previously published data on *in silico* reconstruction of '*Acetothermia*' metabolism led us to the suggestion that carbonate and bicarbonate can serve as the major carbon sources for the dominant bacterial group and that '*Acetothermia*' themselves act as the primary producers in this ecosystem. Analysis of the functional genes revealed also the presence of physiological groups of denitrifiers, iron reducers, carboxydrotrophs and diazotrophs. This is the first report on a thermophilic microbial community of a hydrotherm from the southwestern extremity of the Baikal rift zone. Moreover, microbial communities with predominance of uncultured '*Acetothermia*' have not been reported previously in terrestrial hydrotherms.

Keywords: uncultured bacteria, OP1, *Acetothermia*, new acetyl-CoA synthases, terrestrial hydrotherms, East-Tuvianian Upland

МАЛОИЗУЧЕННЫЕ ГРУППЫ БАКТЕРИЙ – ИСТОЧНИК НОВЫХ
ФЕРМЕНТОВ: β -ГАЛАКТОЗИДАЗЫ ИЗ ПЛАНКТОМИЦЕТОВ
И ВЕРРУКОМИКРОБИЙ© 2018 г. Д. Г. Наумов^а, *, С. Н. Дедьш^а^аИнститут микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, 117312, Россия

*e-mail: daniil_naumoff@yahoo.com

Поступила в редакцию 27.04.2018 г.

В настоящей работе проведен филогенетический анализ обширной группы ближайших гомологов β -галактозидазы, недавно клонированной из почвенного метагенома и представляющей новое семейство гликозил-гидролаз. Эти белки, формирующие самостоятельное подсемейство гипотетических β -галактозидаз, почти исключительно представлены в бактериях малоизученных фил *Planctomycetes* и *Verrucomicrobia*, а также *Bacteroidetes*. Филогенетическое древо подсемейства состоит из 11 высокостабильных кластеров ветвей, вероятно возникших в результате серии генных дупликаций. Анализ топологии древа позволил предположить, что эти гены впервые появились у планктомицетов, и большинство соответствующих дупликаций произошло именно в пределах этой группы. Позже, посредством горизонтальных переносов эти гены распространились в несколько других фил бактерий, причем наиболее многочисленными были переносы в *Verrucomicrobia*. В геномах большинства планктомицетов имеются множественные паралоги, однако их происхождение оказалось неодинаковым: в некоторых случаях ключевую роль играли горизонтальные переносы, а в других – дупликации генов. Обсуждается роль малоизученных групп прокариот как обладателей пула новых гликозил-гидролаз.

Ключевые слова: гликозил-гидролаза, β -галактозидаза, семейство TIGR02604, *Planctomycetes*, *Verrucomicrobia*, филогенетическое древо белков, эволюция белков, горизонтальный перенос, поиск гомологов, аннотация генов, ошибки аннотации метагеномов

DOI: 10.1134/S0026365618060137

Гликозил-гидролазы или гликозидазы (КФ 3.2.1) – обширная группа ферментов, отвечающих за расщепление *O*-гликозидных связей в различных субстратах, включая гетерополисахариды, гликолипиды и гликопротеины. Гены гликозидаз обнаружены в подавляющем большинстве живых организмов, однако их набор в конкретных геномах существенно варьирует: они часто подвержены дупликациям, элиминации и горизонтальному переносу (Наумов, 2011). Основываясь на гомологии каталитических доменов, большинство известных гликозил-гидролаз объединены в базе данных CAZy (Lombard et al., 2014; Terrapon et al., 2017) в 147 семейств: GH1–GH153 (кроме GH21, GH40, GH41, GH60, GH61 и GH69). При этом 60 семейств на основе отдаленных эволюционных связей сгруппированы там в 17 кладов: GH-A–GH-Q.

Более детальный анализ первичных и третичных структур белков позволил предложить иерархическую классификацию гликозил-гидролаз (Naumoff, 2001, 2006, 2014; Наумов, 2011). Она распространяется не только на семейства белков с эн-

зиматически охарактеризованными представителями, но так же и на семейства, которые содержат исключительно гипотетические белки, кодируемые открытыми рамками считывания из геномных проектов. К настоящему времени уже известно около сотни таких семейств предполагаемых гликозил-гидролаз. Среди них 37 семейств (FURAN1–FURAN39, кроме FURAN8 и FURAN36), образованных белками, чьи предполагаемые каталитические домены имеют структуру β -пропеллера (Наумов, 2012).

β -Галактозидазы или β -D-галактозид-галактогидролазы (КФ 3.2.1.23) – гликозил-гидролазы, катализирующие отщепление концевых, нередуцирующих остатков β -D-галактозы от различных β -D-галактозидов, включая пектиновые галактаны (Husain, 2010; Chandrasekar et al., 2016; Saqib et al., 2017; Luis et al., 2018). Ферменты с этой активностью широко распространены в природе и отнесены в базе данных CAZy к нескольким семействам: GH1, GH2, GH3, GH35, GH39, GH42, GH50, GH59 и GH147 (Lombard et al., 2014). Однако каждое из этих семейств (кроме недавно откры-

того GH147) в дополнение к белкам с β -галактозидазной активностью содержит также ферменты с иной субстратной специфичностью. Поэтому трудно предсказать конкретную энзиматическую активность для экспериментально неохарактеризованных представителей этих семейств. Обычно такие предсказания бывают обоснованными только в пределах моноспецифических подсемейств.

Одним из востребованных подходов в современной биотехнологии является поиск новых ферментов в микроорганизмах, которые пока не удается культивировать в условиях лаборатории. В рамках одного из таких метагеномных проектов недавно были обнаружены три новых β -галактозидазы (Cheng et al., 2017), которые в настоящее время отсутствуют в базе данных CAZy. Две из них закодированы одним и тем же фрагментом ДНК длиной 35.9 т.п.о. (GenBank, KF255994.1). Один из этих двух белков – Lac161_10 (GenPept, AGW45555.1) – относится к семейству FURAN22 (неопубликованные данные) и, согласно предсказанию, имеет 3D структуру пятилопастного β -пропеллера (Cheng et al., 2017). Второй белок – Lac161_07 (AGW45552.1) – содержит домен TIGR02604 (Cheng et al., 2017). Применение программы PSI-BLAST выявило его отдаленное родство с доменами семейства FURAN31, что позволило рассматривать TIGR02604 как предполагаемый каталитический домен этой гликозил-гидролазы (Ivanova et al., 2017). Белок Lac161_07 оказался в фокусе нашего внимания, так как недавно проведенный нами анализ генома планктомицета *Paludisphaera borealis* PX4 (GenBank, CP019082.1) выявил у этой бактерии 18 белков, содержащих домены семейства TIGR02604. При этом два ближайших гомолога для каждого из них, согласно попарному сравнению последовательностей, тоже принадлежат планктомицетам (см. таблицу S4 в работе Ivanova et al., 2017).

Планктомицеты (*Planctomycetes*) – это малоизученная филогенетическая ветвь (фила) домена *Bacteria*, представители которой сложны в культивировании. Как показал анализ геномов *P. borealis* PX4 и филогенетически близкородственных планктомицетов, эти бактерии обладают высоким, но пока малоизученным гликолитическим потенциалом (Ivanova et al., 2017). Цель работы – исследовать феномен явной сверх-представленности белков семейства TIGR02604 у планктомицетов как указание на необычную эволюционную историю данной группы белков.

АНАЛИЗ ДАННЫХ

Для определения эволюционной близости гомологов β -галактозидазы Lac161_07 (AGW45552.1) из организмов разных филогенетических групп, 20 марта 2018 г. проводили скрининг в базе данных аминокислотных последовательностей GenPept на

сайте NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), при этом в качестве запроса использовали фрагмент этого белка (с 1 по 450 аминокислотный остаток), соответствующий домену TIGR02604. При запуске программы blastp порогом для включения было значение *E*-value равное 10, рекомендуемое разработчиками программы. Поиск проводили независимо по каждой филе бактерий, а также среди архей и эукариот. Каждый раз выбирался белок с наибольшим значением Score, и статистика по нему заносилась в табл. 1.

Полноразмерная аминокислотная последовательность β -галактозидазы Lac161_07 использовалась для поиска близких гомологов в базе данных GenPept (раздел “non-redundant protein sequences”) с помощью программы blastp. Для построения множественного выравнивания и дальнейшего филогенетического анализа были отобраны 217 ближайших гомологов. При этом близкородственные белки из штаммов одного вида и видов одного рода, как правило, не использовались. В качестве аутгруппы были выбраны 50 белков, представляющих другое подсемейство (см. раздел “Результаты”).

Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей проводили вручную в программе-редакторе BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>), при этом учитывали результаты попарных выравниваний с помощью программы blastp. При обнаружении белковых фрагментов, не содержащих обоих полноразмерных доменов (TIGR02603 и TIGR02604, см. раздел “Результаты”), предпринимали попытки продлить соответствующие аминокислотные последовательности. В пяти случаях (GenPept: EEF62808.1/EEF62809.1, OUW77017.1/OUW79755.1, OYV93026.1/OYV93027.1, PCJ52993.1/PCJ60478.1 и SIN73771.1/SIN73785.1) пары кодируемых одним геномом фрагментов белков были объединены вместе для получения полноразмерного белка. Для четырех других белков (APW59276.1, EPR71461.1, OHB85895.1 и PCH53653.1) был использован альтернативный старт-кодон.

Результаты множественного выравнивания (после удаления наиболее варибельных участков последовательностей) использовали для построения филогенетических деревьев с помощью программ PROTPARS (метод максимальной экономии, Protein Sequence Parsimony method, MP) и NEIGHBOR (метод ближайших соседей, Neighbor-Joining method, NJ) из пакета PHYLIP (<http://evolution.gs.washington.edu/phylip.html>). Статистическую надежность узлов оценивали с использованием бутстреп-анализа (по 100 сводореплик для каждого дерева). Программу TreeView Win32 (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>) применяли для получения графических изображений деревьев.

Таблица 1. Таксономическая принадлежность гомологов β -галактозидазы Lac161_07

Таксон	Число геномов	Номер белка	Организм	Идентичность, %	Вероятность	Счет
<i>Verrucomicrobia</i> (taxid: 74201)	143	PHX95203.1	<i>Pedosphaera</i> sp.	51	2e-157	474
<i>Planctomycetes</i> (taxid: 203682)	125	PQO28573.1	<i>Blastopirellula marina</i>	47	3e-125	390
<i>Ca. Hydrogenedentes</i> (taxid: 142187)	4	PCJ52957.1	<i>Ca. Hydrogenedentes</i> bacterium	46	8e-118	365
<i>Acidobacteria</i> (taxid: 57723)	78	WP_020718766.1	<i>Acidobacteriaceae</i> bacterium KBS 96	39	3e-83	278
<i>Bacteroidetes</i> (taxid: 976)	2749	ACU02556.1	<i>Pedobacter heparinus</i> DSM 2366	37	9e-81	269
<i>Balneolaeota</i> (taxid: 1936987)	12	SHG50797.1	<i>Aliifodinibius roseus</i>	35	2e-68	234
<i>Gemmatimonadetes</i> (taxid: 142182)	19	AHG93160.1	<i>Gemmatirosa kalamazoonesis</i>	34	1e-48	179
<i>Proteobacteria</i> (taxid: 1224)	47422	WP_019027975.1	<i>Colwellia piezophila</i>	30	5e-42	168
<i>Lentisphaerae</i> (taxid: 256845)	7	EDM28524.1	<i>Lentisphaera araneosa</i> HTCC2155	29	7e-39	150
<i>Actinobacteria</i> (taxid: 201174)	13972	OYV65024.1	<i>Actinobacteria</i> bacterium 21-64-8	29	1e-30	132
<i>Cyanobacteria</i> (taxid: 1117)	1199	KIF34122.1	<i>Hassallia byssoidea</i> VB512170	36	4e-23	107
<i>Archaea</i> (taxid: 2157)	—	ELZ85352.1	<i>Haloferax gibbonsii</i> ATCC 33959	26	1e-15	84.7
<i>Chloroflexi</i> (taxid: 200795)	225	OQY83979.1	<i>Chloroflexi</i> bacterium UTCFX4	24	7e-11	67.4
<i>Ca. Glassbacteria</i> (taxid: 1817805)	0	OGG05144.1	<i>Ca. Glassbacteria</i> bacterium RIFCSPLOWO2_12_FULL_58_11	23	1e-08	53.9
<i>Nitrospirae</i> (taxid: 40117)	46	WP_090902174.1	<i>Ca. Nitrospira nitrificans</i>	24	3e-06	51.2
<i>Armatimonadetes</i> (taxid: 67819)	16	ARU43084.1	<i>Armatimonadetes</i> bacterium Uphvl-Ar2	38	2e-06	51.2
<i>Spirochaetes</i> (taxid: 203691)	824	OHD73066.1	<i>Spirochaetes</i> bacterium RBG_13_68_11	24	3e-05	50.1
<i>Ca. Omnitrphica</i> (taxid: 67812)	52	OGX07038.1	<i>Omnitrphica</i> WOR_2 bacterium GWA2_47_8	23	6e-06	49.3
<i>Ca. Rokubacteria</i> (taxid: 1752708)	1	OLD30714.1	<i>Ca. Rokubacteria</i> bacterium 13_1_40CM_2_68_13	23	7e-06	48.9
<i>Deinococcus-Thermus</i> (taxid: 1297)	130	GAO75477.1	<i>Meiothermus ruber</i>	24	5e-05	47.8
<i>Ignavibacteriae</i> (taxid: 1134404)	18	OGU48385.1	<i>Ignavibacteria</i> bacterium GWC2_36_12	28	4e-05	47.4

Таблица 1. Окончание

Таксон	Число геномов	Номер белка	Организм	Идентичность, %	Вероятность	Счет
<i>Rhodothermaeota</i> (taxid: 1853220)	0	PDH50321.1	<i>Rhodothermaeota</i> bacterium MED-G16	21	2e-05	45.8
<i>Elusimicrobia</i> (taxid: 74152)	15	OIO10380.1	<i>Elusimicrobia</i> bacterium CG1_02_63_36	23	2e-04	44.7
candidate division NC10 (taxid: 640293)	2	OGB92801.1	candidate division NC10 bacterium RIFCSPLOWO2_02_FULL_66_22	24	3e-05	44.3
<i>Ca. Peregrinibacteria</i> (taxid: 1619053)	1	OGJ56732.1	<i>Ca. Peribacteria</i> bacterium RIFCSPHIGHO2_01_FULL_51_35	30	3e-04	43.1
<i>Eukaryota</i> (taxid: 2759)	—	EIE19358.1	<i>Coccomyxa subellipsoidea</i> C-169	21	0.64	42.0
<i>Ca. Melainabacteria</i> (taxid: 1798710)	2	OGI01544.1	<i>Ca. Melainabacteria</i> bacterium GWF2_32_7	39	7e-04	42.0
<i>Ca. Wolfbacteria</i> (taxid: 1752735)	0	KKR12918.1	<i>Ca. Wolfbacteria</i> bacterium GW2011_GWC2_39_22	35	7e-04	40.4
<i>Firmicutes</i> (taxid: 1239)	31072	CJL68983.1	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	26	1.7	39.7

Примечание. Каталитический домен TIGR02604 из β -галактозидазы Lac161_07 (GenPept, AGW45552.1) использовался в качестве запроса при поиске в базе данных NCBI по каждой филе бактерий, а также среди архей и эукариот. Приведена статистика по одному ближайшему гомологу из каждой таксономической группы: процент идентичности (Identities), вероятность обнаружения (*E*-value) и счет (Score). Жирной горизонтальной линией в таблице отделены представители изучаемого подсемейства белков. Для каждой филы бактерий указано число секвенированных геномов согласно базе данных GOLD (<https://gold.jgi.doe.gov/distribution>) по состоянию на 25 апреля 2018 г.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Выбор белков для дальнейшего анализа и их множественное выравнивание. Ген β -галактозидазы Lac161_07 расположен на фрагменте метагенома, который охарактеризован (Cheng et al., 2017) как принадлежащий геному бактерии рода *Chthoniobacter* (из филы *Verrucomicrobia*). Поиск по базе данных NCBI показывает, что шесть из семи ближайших гомологов этого белка — тоже из веррукомикробий (39–47% идентичности аминокислотных последовательностей), что подтверждает верность такого отнесения. Все эти восемь белков (относятся к кластеру I, см. ниже) имеют близкий размер (993–1059 а.о.) и однотипную доменную структуру: два домена из семейств TIGR02604 и TIGR02603/PF00034, разделенные спейсером PF13646. Согласно базе данных TIGRFAMs (Naft et al., 2013), такая доменная структура характерна для ряда белков из бактерий фил *Planctomycetes* и *Verrucomicrobia*. Проведенный нами скрининг с помощью предполагаемого (Ivanova et al., 2017) каталитического домена TIGR02604 β -галактозидазы Lac161_07 подтвердил необычную филогенетиче-

скую распространенность ее близких гомологов. В своем большинстве они оказались принадлежащими бактериям именно этих двух фил, а также филы *Bacteroidetes*; в меньшей степени были представлены *Acidobacteria*, *Balneolaeta* и *Candidatus Hydrogenedentes* (табл. 1). Обращает на себя внимание отсутствие среди близких гомологов ($\geq 35\%$ идентичности) трех наиболее многочисленных по числу секвенированных геномов таксономических групп бактерий — *Actinobacteria*, *Firmicutes* и *Proteobacteria*. Следует отметить, что у эукариот и фирмикут вообще отсутствуют белки, содержащие домены семейства TIGR02604.

Учитывая тот факт, что подавляющее большинство хорошо изученных семейств гликозил-гидролаза одновременно содержат ферменты с различающимися энзиматическими активностями (Наумов, 2011; Lombard et al., 2014), мы сфокусировали свое исследование на анализе наиболее близких гомологов белка Lac161_07, предполагая, что они будут принадлежать одному подсемейству и обладать общей субстратной специфичностью, являясь β -галактозидазами. Нами было

проанализировано более двух сотен ближайших гомологов белка Lac161_07; они, как правило, обладали такой же доменной структурой. Оба домена у всех них были высококонсервативными, что позволило построить множественные выравнивания. Междоменные спейсеры существенно отличались как по длине, так и по структуре, поэтому их аминокислотные последовательности были исключены из дальнейшего филогенетического анализа. В случае нескольких близкородственных белков (кластер IV, см. ниже) отсутствовал домен TIGR02603. Некоторые белки обладали дополнительными доменами на N- или C-конце. В качестве аутгруппы мы стремились выбрать представителей другого, но максимально близкого подсемейства. Многочисленность гомологов из *Bacteroidetes*, *Planctomycetes* и *Verrucomicrobia* не позволяла легко отличить белки исследуемого подсемейства. В случае с *Acidobacteria* и *Balneolaeota* это оказалось существенно проще. Мы взяли по одному наиболее близкому гомологу (GenPept: OLD14425.1 и SHE45691.1 соответственно) из этих двух фил бактерий из числа тех белков, которые, предположительно, не относились к нашему подсемейству. Эти два белка (44% идентичности) оказались принадлежащими одному и тому же подсемейству, 50 представителей которого были использованы нами в качестве аутгруппы (кластер XII, см. ниже). Все эти 50 белков тоже содержали домены семейств TIGR02604 и TIGR02603, однако уровень сходства TIGR02603-доменов у белков двух подсемейств оказался недостаточным для построения корректного множественного выравнивания (консервативным сохранялся лишь короткий мотив), что позволило использовать аутгруппу только при филогенетическом анализе последовательностей каталитического домена TIGR02604.

Проведенный анализ показал, что из 18 белков планктомицета *P. borealis* PX4, содержащих домен TIGR02604, лишь четыре относятся к тому же подсемейству, что и β -галактозидаза Lac161_07, а остальные 14 оказались принадлежащими девяти другим подсемействам (данные не приводятся).

Гликозил-гидролазы из подавляющего большинства экспериментально охарактеризованных семейств содержат в своем активном центре по два кислых аминокислотных остатка (Asp и/или Glu), которые обычно бывают чрезвычайно высококонсервативными (Наумов, 2011; Lombard et al., 2014). Анализ построенного нами множественного выравнивания аминокислотных последовательностей 268 исследуемых белков семейства TIGR02604 (данные не приводятся) позволил выявить два почти инвариантных остатка аспарагиновой кислоты (Asp-193 и Asp-412 в случае β -галактозидазы Lac161_07), которые могут рассматриваться как кандидаты на роль ключевых компонентов активного центра фермента. Это указывает на то, что весь массив ис-

следованных нами белков, вероятно, являются энзиматически активными ферментами. Обнаружено лишь три исключения. В случае белка из *Zavarzinella formosa* (WP_084759686.1; кластер I, см. ниже) первый остаток Asp заменен на Glu (в положении 197), но такая замена, возможно, не оказывает влияния на его энзиматическую активность. Два других случая — это замена в белках *Gemmata* sp. SH-PL17 (AMV26971.1) и *Fimbrioglobus ruber* (OWK36302.1) первого (на Gly) и второго (на Ala) аспартата, соответственно. Эти два белка, очевидно, утратили активность. Примечательно, что они образуют общий субкластер (в составе кластера IX) с бутстреп-поддержкой 100% на всех полученных нами деревьях (см. ниже). Наблюдаемая колокализация, возможно, не является случайной, а обусловлена появлением у белков в этой филогенетической линии альтернативной функции, не связанной с гидролизом субстратов. Такие случаи ранее отмечены в целом ряде семейств гликозил-гидролаз (Наумов, 2011; Lombard et al., 2014).

Филогенетический анализ подсемейства белков. Построение двумя разными алгоритмами (ближайших соседей и максимальной экономии) филогенетического древа изучаемого пула белков показало, что он распадается на 12 стабильных филогенетических кластеров (I–XII; больше 70% бутстреп-поддержки), один из которых (кластер XII) соответствует аутгруппе (рис. 1а и 1б). Между собой эти кластеры не образуют устойчивых групп за исключением пар VII/VIII и IX/X, которые при использовании обоих алгоритмов проявляют некоторую склонность к совместной кластеризации (больше 55% поддержки). Положение выбранной нами аутгруппы не является стабильным, что не позволяет укоренить древо исследуемого подсемейства белков. Удаление из филогенетического анализа аутгруппы и 10 из 11 белков кластера IV позволило использовать при анализе аминокислотные последовательности сразу двух доменов — TIGR02603 и TIGR02604. Полученные обоими методами филогенетические деревья (рис. 1в и 1г) содержали те же кластеры, а их стабильность существенно выросла (больше 85% бутстреп-поддержки). Однако совместных устойчивых групп они по-прежнему не формировали за исключением пар V/VI и IX/X при использовании метода ближайших соседей (рис. 1г).

Только три кластера (IV–VI) не содержали белков из планктомицетов, а среди остальных кластеров три (II, X и XI) состояли исключительно из белков бактерий этой таксономической группы (рис. 1а). Белки из бактерий фил *Bacteroidetes* и *Verrucomicrobia* оказались в шести и пяти кластерах соответственно. Однако помимо аутгруппы они были совместно представлены лишь в кластере VII, который, несмотря на свою малочисленность (15 белков), является таксономиче-

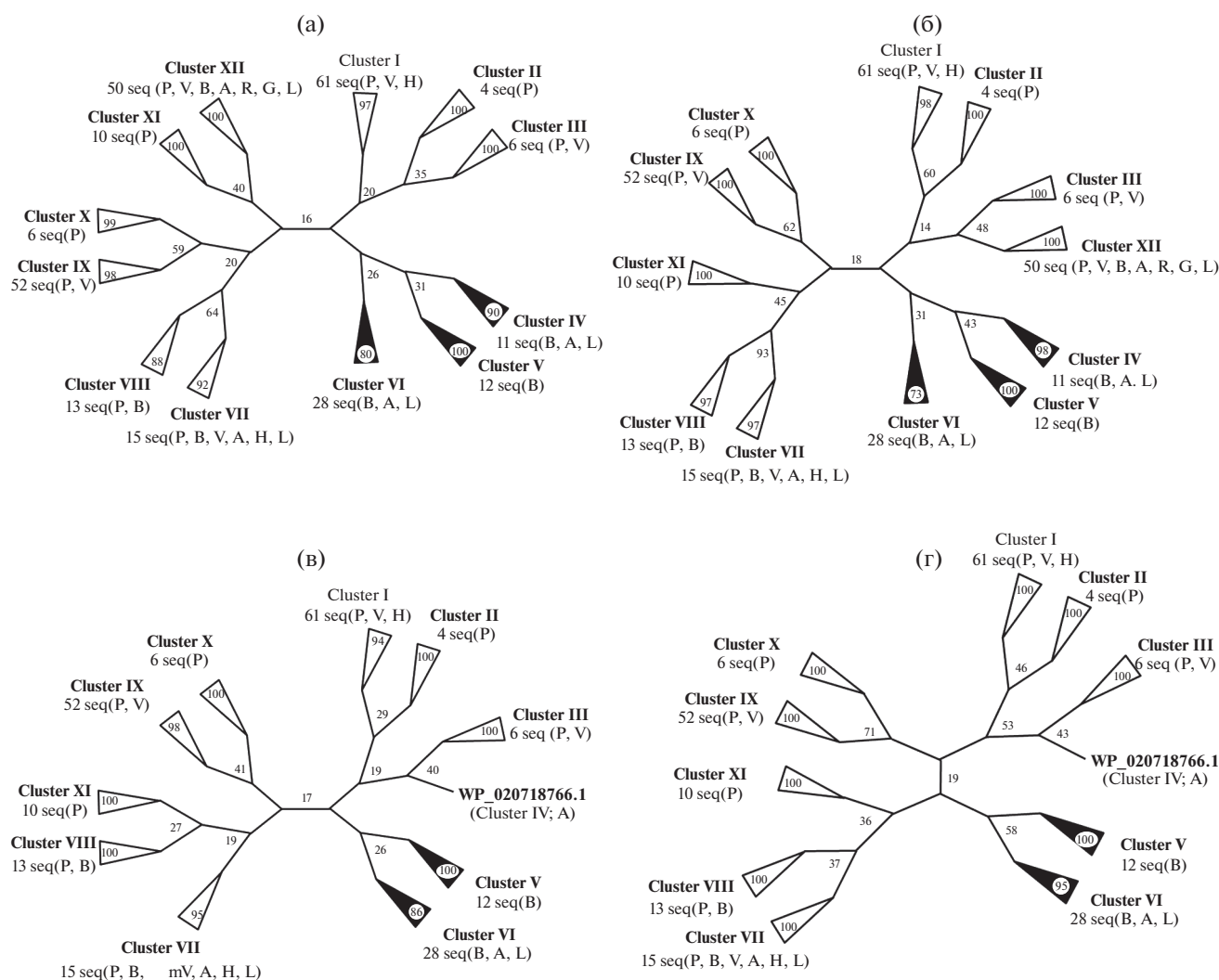


Рис. 1. Схемы филогенетических деревьев изучаемого подсемейства белков, построенных на основании домена TIGR02604 методами максимальной экономии (а) и ближайших соседей (б) и одновременно пары доменов TIGR02603 и TIGR02604 методами максимальной экономии (в) и ближайших соседей (г). Для каждого кластера (I–XII) указаны бутстреп-поддержка (%), число образующих его белков и таксономическая принадлежность соответствующих организмов: *Acidobacteria* (A), *Bacteroidetes* (B), *Balneolaeota* (L), *Candidatus Hydrogenedentes* (H), *Gemmatimonadetes* (G), *Planctomycetes* (P), *Proteobacteria* (R) и *Verrucomicrobia* (V). Черным цветом закрашены кластеры, не содержащие белков из планктомицетов. Кластер XII соответствует аутогруппе (см. текст).

ски наиболее гетерогенным среди кластеров исследуемого подсемейства белков. Белки из бактерий фил *Acidobacteria* и *Balneolaeota* попали в одни и те же четыре кластера (IV, VI, VII и XII).

Возможные ошибки аннотации белков из метагеномов. Анализ филогенетических деревьев (рис. 1) выявил несколько случаев, выглядящих как эволюционно очень недавние горизонтальные переносы между бактериями из разных фил. В кластере IX имеется пара белков из *Planctomycetes* (GenPept, OYW24622.1) и *Verrucomicrobia* (OYW73679.1) с 85% идентичности аминокислотных последовательностей. Они группируются вместе на всех четырех деревьях с бутстреп-поддержкой 100% (рис. 1 и 2б). Кодированные эти белки фрагменты ДНК

принадлежат метагеномам, выделенным из дренажа шахт в рамках одного проекта (BioProject, PRJNA379596), и обладают гомологией на всем протяжении меньшего из них. Остаются неясными причины, почему эти столь сходные геномные фрагменты аннотированы как принадлежащие бактериям двух разных фил. Использование планктомицетного белка (OYW24622.1) в качестве запроса при поиске по базе данных NCBI показывает, что пятью его ближайшими гомологами являются белки из веррукомикробий. Совокупность этих данных позволяет предположить, что при аннотировании метагенома имела место ошибка и белок OYW24622.1 на самом деле принадлежит бактерии из филы *Verrucomicrobia*.

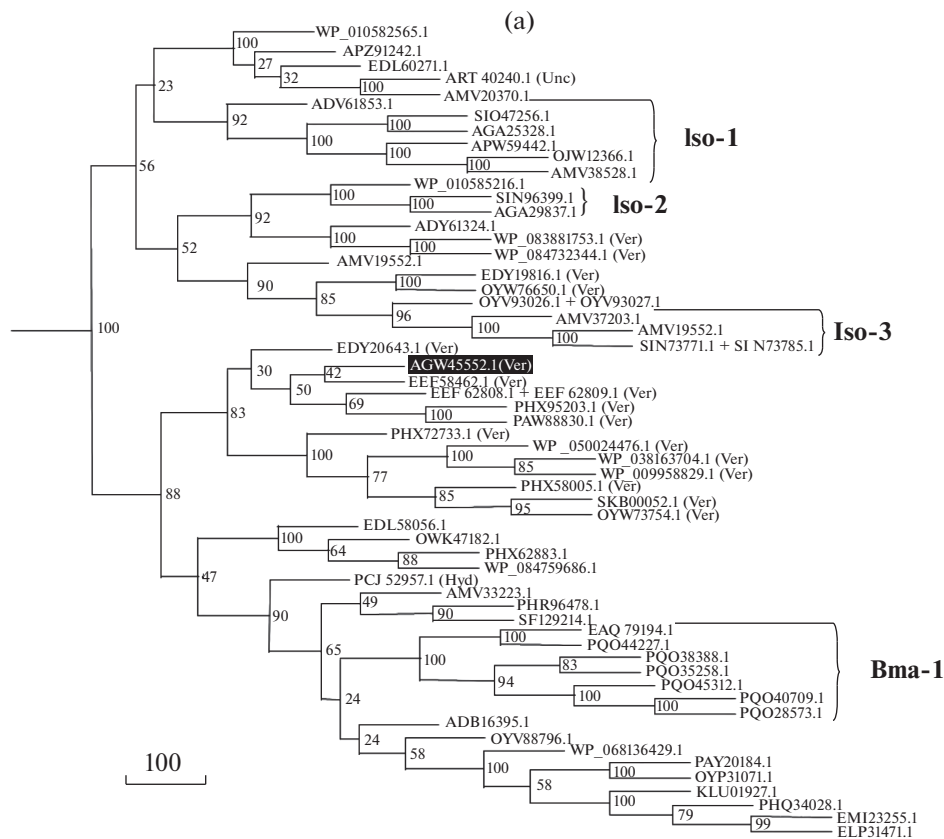


Рис. 2. Фрагменты филогенетического древа, схема которого представлена на рис. 1г. Фрагменты соответствуют филогенетическим кластерам I (а) и IX (б). На черном фоне указано название энзиматически охарактеризованного белка – β-галактозидазы Lac161_07 (GenPept, AGW45552.1). Звездочками отмечены белки, чьи аминокислотные последовательности были отредактированы путем выбора альтернативного старт-кодона (см. текст). Фигурными скобками отмечены субкластеры, обсуждаемые в тексте. Два белка, вероятно необладающие энзиматической активностью, обозначены словом “inactive” (см. текст). Трехбуквенными сокращениями указана таксономическая принадлежность бактерий: Hvd – *Candidatus Hydrogenedentes*, Unc – неклассифицированный метагеном и Ver – *Verrucomicrobia*. Остальные белки принадлежат планктомицетам.

Два фрагмента белка (GenPept, OUX79755.1 и OUX77017.1), проаннотированные как принадлежащие *Saprospirales bacterium* TMED214 из филы *Bacteroidetes*, вместе образуют полноразмерный гомолог планктомицетных белков OUX05741.1 и OUX52091.1, имея с ними 84 и 79% идентичности аминокислотных последовательностей соответственно. Четыре фрагмента ДНК, кодирующие эти белки, принадлежат морским метагеномам, выделенным в рамках одного проекта (BioProject, PRJNA385857); при этом три меньших фрагмента на всем своем протяжении обладают гомологией с самым протяженным из них. Три соответствующих полноразмерных белка образуют общий субкластер (в составе кластера VIII) с бутстреп-поддержкой 100% на всех четырех деревьях (рис. 1). Использование комбинированного белка из *Saprospirales* в качестве запроса приводит к обнаружению в качестве его 20 ближайших гомологов исключительно белков из планктомицетов. Эти данные позволяют рассматривать два упомяну-

тых фрагмента генома TMED214 как принадлежащие планктомицету, а кластер VIII, таким образом, содержит белки из бактерий только этой филы.

В рамках того же метагеномного проекта (PRJNA385857) секвенировано три фрагмента ДНК, имеющих протяженные (десятки т.п.о.) области гомологии. Два из этих фрагментов аннотированы в базе данных как принадлежащие планктомицетам, а третий – протеобактериям. Три белка (OUT43623.1, OOU91140.1 и OUX92915.1), кодируемые этими фрагментами, формируют общий субкластер (в составе кластера XII) с бутстреп-поддержкой 92 и 99% на NJ- и MP-деревьях соответственно (рис. 1б и 1а), а пара белков OUT43623.1/OUX92915.1 кластеризуются совместно с поддержкой 100% на обоих деревьях. Использование протеобактериального белка (OUX92915.1) в качестве запроса при поиске в базе данных NCBI позволяет обнаружить следующий белок из *Proteobacteria* (EGG30979.1) только

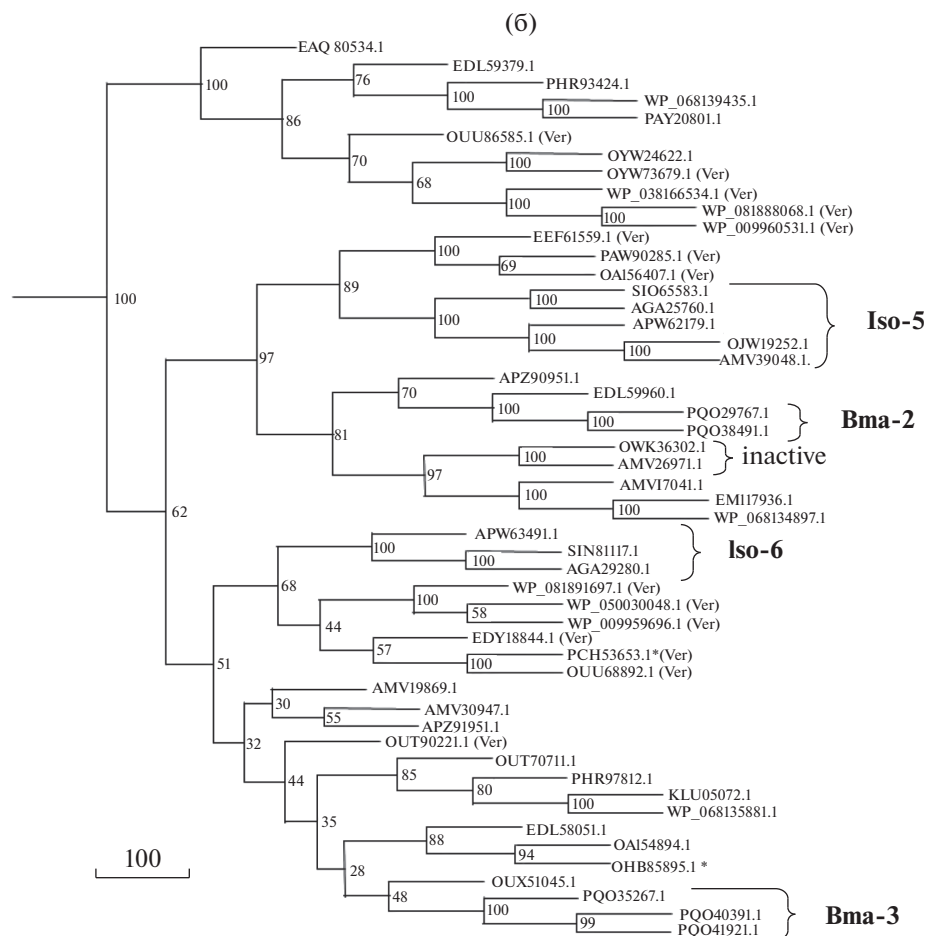


Рис. 2. Окончание.

74-ым в общем списке гомологов (с 35% идентичности аминокислотных последовательностей). В то время как с белками OUT43623.1 и OOU91140.1 белок OUX92915.1 имеет 71 и 45% идентичности соответственно. Возможно, что и в этом случае имела место ошибка при аннотировании, а все три белка на самом деле принадлежат планктомицетам.

ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ топологии построенных филогенетических деревьев (рис. 1) позволяет предполагать, что II кластеры белков исследуемого подсемейства возникли в результате серии генных дупликаций. Отсутствие значимой кокластеризации между кластерами указывает на то, что эти эволюционные события не были существенно разнесены во времени. Наличие белков планктомицетов почти во всех этих кластерах свидетельствует в пользу того, что соответствующие гены впервые появились в бактериях этой группы, и большинство соответствующих дупликаций произошло именно там. Позже, посредством целой серии не-

зависимых горизонтальных переносов эти гены распространились в несколько других фил бактерий, но не в наиболее хорошо изученные из них — *Actinobacteria*, *Firmicutes* и *Proteobacteria*.

Интересно проследить особенности эволюционирования этих генов в пределах планктомицетов. Многие из них обладают группами паралога, а анализ филогенетических деревьев легко выявляет множественные факты горизонтальных переносов, дупликаций и элиминаций генов. Однако не во всех линиях планктомицетов вклад этих процессов одинаков. Белки из бактерий семейства *Isosphaeraceae* образуют на филогенетическом древе (рис. 2) семь хорошо обособленных субкластеров в составе кластеров I (субкластеры Iso-1—Iso-3), VII (Iso-4), IX (Iso-5 и Iso-6) и X (Iso-7), а еще один белок (GenPept, AMV40138.1) располагается в кластере VIII. Ни один из семи субкластеров не содержит каких-либо паралогов, но в каждом из них имеется по одному белку из *Singulisphaera acidiphila* DSM18658 и *Singulisphaera* sp. GP187. Размер субкластеров варьирует от двух (Iso-4) до шести (Iso-1) белков, что указывает на

ведущую роль линииспецифической элиминации генов в пределах субкластеров и на отсутствие дубликаций. Совсем другой случай представляет *Blastopirellula marina*. На филогенетическом древе 16 паралогов из штамма *B. marina* Nap-Phe MGv образуют 4 субкластера в составе кластера I (субкластер Bma-1), IX (Bma-2 и Bma-3) и XI (Bma-4). Субкластеры Bma-1 и Bma-4 также содержат по одному белку из штамма *B. marina* DSM3645 (GenPept: EAQ79194.1 и EAQ79154.1 соответственно), а третий белок из этого штамма (EAQ80534.1) находится вне указанных субкластеров в составе кластера IX. Таким образом, можно утверждать, что в случае *B. marina* ключевую роль в эволюции играли множественные дубликации генов.

Белки бактерий филы *Verrucomicrobia* довольно равномерно разбросаны по филогенетическому древу (рис. 1 и 2), находясь в пяти филогенетических кластерах (I, III, VII, IX и XII). Во всех случаях (кроме кластера XII) их происхождение на основании топологии деревьев может быть объяснено горизонтальными переносами генов непосредственно из планктомицетов, а число таких переносов в этом случае было не менее десяти. Самый крупный субкластер белков веррукомикробий включает экспериментально охарактеризованную β -галактозидазу Lac161_07 и, вероятно, соответствует эволюционно наиболее раннему переносу.

Иной случай представляют белки бактерий из филы *Bacteroidetes*. Они формируют довольно крупные субкластеры в составе кластеров IV–VII и XII. При этом белки планктомицетов отсутствуют в кластерах IV–VI и малочислены в кластерах VII и XII, что исключает вероятность существенной роли эволюционно недавних горизонтальных переносов от планктомицетов к *Bacteroidetes*. Примечательно нахождение всех белков бактерий из фил *Acidobacteria* и *Balneolaeota* в тех же кластерах (IV, VI, VII и XII). Вероятно, существует интенсивный обмен генами между *Bacteroidetes*, *Acidobacteria* и *Balneolaeota*, однако о его направленности пока судить сложно, поскольку последние две филы представлены на древе малым числом белков (это отражает статистику геномных проектов, см. табл. 1). Обращает на себя внимание тенденция к колокализации кластеров IV–VI на деревьях (рис. 1а и 1б), хотя она и не имеет существенной статистической поддержки. Возможно, что все они соответствуют одной филогенетической линии белков, которая никогда не была представлена у планктомицетов.

Проведенный нами анализ топологии филогенетических деревьев выявил неожиданную связь между таксонами бактерий высокого уровня относительно их предрасположенности к горизонтальным переносам между собой. Одну группу образуют филы *Planctomycetes* и *Verrucomicrobia*, а

другую – *Acidobacteria*, *Bacteroidetes* и *Balneolaeota*. Остается непонятным, обусловлено ли это вероятностью и успешностью событий горизонтального переноса или селективными факторами, связанными с потребностями в ферментах одного типа. Примечательно, что *Planctomycetes* и *Verrucomicrobia* относятся к одной супер-филе, известной как PVC, и обнаруживают ряд сходных особенностей биологии (Wagner, Horn, 2006; Fuerst, 2013; Rivas-Marin, Devos, 2018). Аналогичная ситуация имеет место в отношении *Bacteroidetes* и *Balneolaeota*. Последняя группа лишь недавно была выделена из *Bacteroidetes* в самостоятельную филу (Hahnke et al., 2016). Наличие интенсивного горизонтального переноса генов гликозил-гидролаз между бактериями фил *Acidobacteria* и *Bacteroidetes* показано нами ранее (Naumoff, Dedysh, 2012) на примере α -L-рамнозидаз (семейства GH78 и GH106). Вместе с тем, представленность в исследуемом подсемействе белков всех пяти упомянутых фил бактерий, а также *Candidatus Hydrogenedentes* указывает на хотя и менее интенсивный, но все же существенный обмен генами между их представителями. Факты относительно частых горизонтальных переносов между бактериями этих таксонов обнаруживались нами и ранее в случае ряда семейств гликозил-гидролаз (Naumoff, Dedysh, 2012; Наумов и соавт., 2014). Другой такой группой фил бактерий с предрасположенностью к обмену между собой генами гликозил-гидролаз являются *Actinobacteria* и *Firmicutes* (Naumoff, 2010; Naumoff, Dedysh, 2012; Наумов, 2013).

Примечательно, что представители всех вышеперечисленных фил известны в качестве гидролитиков, выполняющих роль деструкторов органического вещества в различных экосистемах. Высокий гидролитический потенциал *Actinobacteria*, *Firmicutes* и *Bacteroidetes* признан давно и детально изучен. Экспериментальных доказательств аналогичных способностей у организмов фил *Acidobacteria*, *Planctomycetes* и *Verrucomicrobia* пока немного в силу ограниченного числа охарактеризованных представителей и сложности их культивирования, однако анализ геномов этих бактерий свидетельствует о наличии значительного гликолитического потенциала (Glöckner et al., 2003; Ward et al., 2009; Cabello-Yeves et al., 2017; Ivanova et al., 2017). Группы бактерий с предрасположенностью к обмену генами гликозил-гидролаз обнаруживают сходство в организации клеток. Так, *Actinobacteria* и *Firmicutes* – это бактерии с грамположительным типом клеточной стенки. *Acidobacteria*, *Bacteroidetes* и *Balneolaeota* – типичные представители граммотрицательных бактерий. Организация клеток у организмов суперфилы PVC имеет ряд уникальных особенностей, однако, согласно последним данным, у них имеет место один из вариантов граммотрицательного ти-

па клеточной стенки с очень тонким слоем пептидогликана (Devos, 2014; Voedeker et al., 2017). Таким образом, можно предположить, что особенности организации клеточных покровов являются одним из селективных факторов, определяющих успешность событий горизонтального переноса генетической информации. Проверка правомерности этой гипотезы остается прерогативой будущих исследований.

Работа проведена в рамках выполнения бюджетной темы № 0104-2018-0034.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Наумов Д.Г. Иерархическая классификация гликозил-гидролаз // Биохимия. 2011. Т. 76. № 6. С. 764–780.
- Naumoff D.G. Hierarchical classification of glycoside hydrolases // Biochemistry (Moscow). 2011. V. 76. P. 622–635.
- Наумов Д.Г. Множественные горизонтальные переносы и дубликации генов – источник разнообразия α -L-рамнозидаз у *Clostridium methylpentosum* DSM5476 // Микробиология. 2013. Т. 82. № 4. С. 408–416.
- Naumoff D.G. Multiple lateral transfers and duplications of genes as sources of diversity of α -L-rhamnosidases in *Clostridium methylpentosum* DSM5476 // Microbiology (Moscow). 2013. V. 82. P. 415–422.
- Наумов Д.Г. Фуранозидазное суперсемейство: поиск гомологов // Мол. биология. 2012. Т. 46. № 2. С. 354–360.
- Naumoff D.G. Furanosidase superfamily: search of homologues // Mol. Biol. (Moscow). 2012. V. 46. P. 322–327.
- Наумов Д.Г., Иванова А.А., Дедыш С.Н. Филогения β -ксилазаз планктомицетов // Мол. биология. 2014. Т. 48. № 3. С. 508–517.
- Naumoff D.G., Ivanova A.A., Dedysh S.N. Phylogeny of β -xylanases from Planctomycetes // Mol. Biol. (Moscow). 2014. V. 48. P. 439–447.
- Boedeker C., Schüler M., Reintjes G., Jeske O., van Teeseling M.C.F., Jogler M., Rast P., Borchert D., Devos D.P., Kucklick M., Schaffer M., Kolter R., van Niftrik L., Engelmann S., Amann R., Rohde M., Engelhardt H., Jogler C. Determining the bacterial cell biology of *Planctomycetes* // Nat. Commun. 2017. V. 8. Art. 14853.
- Cabello-Yeves P.J., Ghai R., Mehshad M., Picazo A., Camacho A., Rodriguez-Valera F. Reconstruction of diverse verrucomicrobial genomes from metagenome datasets of freshwater reservoirs // Front. Microbiol. 2017. V. 8. Art. 2131.
- Chandrasekar B., van der Hoorn R.A. Beta-galactosidases in *Arabidopsis* and tomato – a mini review // Biochem. Soc. Trans. 2016. V. 44. P. 150–158.
- Cheng J., Romantsov T., Engel K., Doxey A.C., Rose D.R., Neufeld J.D., Charles T.C. Functional metagenomics reveals novel β -galactosidases not predictable from gene sequences // PLoS One. 2017. V. 12. Art. e0172545.
- Devos D.P. PVC bacteria: variation of, but not exception to, the Gram-negative cell plan // Trends Microbiol. 2014. V. 22. P. 14–20.
- Fuerst J.A. The PVC superphylum: exceptions to the bacterial definition? // Antonie van Leeuwenhoek. 2013. V. 104. P. 451–466.
- Glöckner F.O., Kube M., Bauer M., Teeling H., Lombardot T., Ludwig W., Gade D., Beck A., Borzym K., Rabus R., Schleisner H., Amann R., Reinhardt R. Complete genome sequence of the marine planctomycete *Pirellula* sp. strain 1 // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2003. V. 100. P. 8298–8303.
- Haft D.H., Selengut J.D., Richter R.A., Harkins D., Basu M.K., Beck E. TIGRFAMs and genome properties in 2013 // Nucleic Acids Res. 2013. V. 41 (Database issue). P. D387–D395.
- Hahnke R.L., Meier-Kolthoff J.P., García-López M., Mukherjee S., Huntemann M., Ivanova N.N., Woyke T., Kyrpides N.C., Klenk HP, Göker M. Genome-based taxonomic classification of *Bacteroidetes* // Front. Microbiol. 2016. V. 7. Art. 2003.
- Husain Q. Beta-galactosidases and their potential applications: a review // Crit. Rev. Biotechnol. 2010. P. 30. P. 41–62.
- Ivanova A.A., Naumoff D.G., Miroshnikov K.K., Liesack W., Dedysh S.N. Comparative genomics of four Isosphaeraceae Planctomycetes: a common pool of plasmids and glycoside hydrolase genes shared by *Paludisphaera borealis* PX4^T, *Isosphaera pallida* IS1B^T, *Singulisphaera acidiphila* DSM 18658^T, and strain SH-PL62 // Front. Microbiol. 2017. V. 8. Art. 412.
- Lombard V., Golaconda Ramulu H., Drula E., Coutinho P.M., Henrissat B. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013 // Nucleic Acids Res. 2014. V. 42 (Database issue). P. D490–D495.
- Luis A.S., Briggs J., Zhang X., Farnell B., Ndeh D., Labourel A., Baslé A., Cartmell A., Terrapon N., Stott K., Lowe E.C., McLean R., Shearer K., Schückel J., Venditto I., Ralet M.C., Henrissat B., Martens E.C., Mosimann S.C., Abbott D.W., Gilbert H.J. Dietary pectic glycans are degraded by coordinated enzyme pathways in human colonic *Bacteroides* // Nat. Microbiol. 2018. V. 3. P. 210–219.
- Naumoff D.G. Development of a hierarchical classification of the TIM-barrel type glycoside hydrolases // Proc. Fifth Int. Conf. Bioinform. Genome Regul. Structure. July 16–22, 2006. Novosibirsk, Russia. V. 1. P. 294–298. (http://www.bionet.nsc.ru/meeting/bgrs_proceedings/papers/2006/BGRS_2006_V1_067.pdf).
- Naumoff D.G. GH101 family of glycoside hydrolases: subfamily structure and evolutionary connections with other families // J. Bioinform. Comput. Biol. 2010. V. 8. P. 437–451.
- Naumoff D.G. Hierarchical classification of glycoside hydrolases // FEBS J. 2014. V. 281. N. S1. P. 569.
- Naumoff D.G. β -Fructosidase superfamily: homology with some α -L-arabinases and β -D-xylosidases // Prot. Struct. Funct. Genet. 2001. V. 42. P. 66–76.
- Naumoff D.G., Dedysh S.N. Lateral gene transfer between the *Bacteroidetes* and *Acidobacteria*: the case of α -L-rhamnosidases // FEBS Lett. 2012. V. 586. P. 3843–3851.
- Rivas-Marin E., Devos D.P. The paradigms they are a-Changin': past, present and future of PVC bacteria research // Antonie van Leeuwenhoek. 2018. V. 111. P. 785–799.
- Saqib S., Akram A., Halim S.A., Tassaduq R. Sources of β -galactosidase and its applications in food industry // 3 Biotech. 2017. V. 7. N. 1. Art. 79.
- Terrapon N., Lombard V., Drula E., Coutinho P.M., Henrissat B. Chapter 6. The CAZy database/the Carbohydrate-Active Enzyme (CAZy) database: principles and usage guidelines // A practical guide to using glycomics databases / Ed. Aoki-Kinoshita K.F. Tokyo: Springer, 2017. P. 117–131.

Wagner M., Horn M. The *Planctomycetes*, *Verrucomicrobia*, *Chlamydia* and sister phyla comprise a superphylum with biotechnological and medical relevance // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2006. V. 17. P.241–249.

Ward N. L., Challacombe J.F., Janssen P.H., Henrissat B., Coutinho P.M., Wu M., Xie G., Haft D. H., Sait M., Badger J., Barabote R.D., Bradley B., Brettin T.S., Brinkac L.M., Bruce D., Creasy T., Daugherty S.C., Davidsen T.M., Deboy R.T., Detter J.C., Dodson R.J., Durkin A.S., Ganapathy A., Gwinn-Gi-

glio M., Han C.S., Khouri H., Kiss H., Kothari S.P., Madupu R., Nelson K.E., Nelson W.C., Paulsen I., Penn K., Ren Q.H., Rosovitz M.J., Selengut J.D., Shrivastava S., Sullivan S.A., Tapia R., Thompson L.S., Watkins K.L., Yang Q., Yu C.H., Zafar N., Zhou L.W., Kuske C.R. Three genomes from the phylum *Acidobacteria* provide insight into the lifestyles of these microorganisms in soils // *Appl. Environ. Microbiol.* 2009. V. 75. P. 2046–2056.

Bacteria from Poorly Studied Phyla as a Potential Source of New Enzymes: β -Galactosidases from *Planctomycetes* and *Verrucomicrobia*

D. G. Naumoff¹,* and S. N. Dedysh¹

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

*e-mail: daniil_naumoff@yahoo.com

Received April 27, 2018

Abstract—Here, we present a phylogenetic analysis of a large group of the nearest homologues of a β -galactosidase, recently cloned from a soil metagenome and representing a new family of glycoside hydrolases. These proteins form an independent subfamily of hypothetical β -galactosidases and are almost exclusively represented in bacteria of the poorly studied phyla *Planctomycetes* and *Verrucomicrobia*, as well as *Bacteroidetes*. The phylogenetic tree of this subfamily consists of eleven highly stable clusters of branches, probably resulting from a series of gene duplications. An analysis of the tree topology suggested that the corresponding genes first evolved in *Planctomycetes* and most gene duplications occurred within this phylum. Later, these genes spread to several other bacterial phyla through horizontal transfers, the most numerous being transfers to *Verrucomicrobia*. The genomes of most *Planctomycetes* contain multiple paralogues of these genes of a different origin: in some cases, the horizontal transfers played a key role, while in other cases gene duplications played a key role. The importance of poorly studied groups of prokaryotes as a source of novel glycoside hydrolases is discussed.

Keywords: glycoside hydrolase, β -galactosidase, TIGR02604 family, *Planctomycetes*, *Verrucomicrobia*, protein phylogenetic tree, protein evolution, lateral gene transfer, search of homologues, gene annotation, metagenome misannotation

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИ

СПЕКТР БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ГРИБОВ РОДА *ALTERNARIA*,
ВЫЯВЛЕННЫХ В ФИЛЛОСФЕРЕ ТРАВЯНИСТЫХ РАСТЕНИЙ

© 2018 г. А. О. Берестецкий^{а, *}, Ф. Б. Ганнибал^а, Е. В. Минкович^а, И. А. Остерман^б,
Д. Р. Салимова^а, П. В. Сергиев^б, С. В. Сокошникова^а

^аВНИИ защиты растений, Санкт-Петербург, 196608, Россия

^бХимический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, 119991, Россия

*e-mail: aberestetskiy@vizr.spb.ru

Поступила в редакцию 17.04.2018 г.

Оценена антимикробная, фитотоксическая и инсектицидная активность 20 изолятов 16 видов микромрицетов альтернариоидных грибов, выделенных из надземных органов сорных и дикорастущих травянистых растений. Результаты оценки их антимикробной активности методами агаровых блоков и бумажных дисков показали, что более 70% изученных грибов проявило антибактериальную активность в отношении *Bacillus subtilis* и/или *Pseudomonas syringae*, 30% – антифунгальную против *Candida tropicalis*. Используемая в работе репортерная система показала, что изученные экстракты не действовали на рибосомы, однако некоторые из них ингибировали топоизомеразу. Экстракты из культуральной жидкости всех изолятов микромрицетов были фитотоксичны в отношении изолированных листьев *Arabidopsis thaliana* и *Elytrigia repens*. У 40% изолятов выявили инсектицидную активность против личинок виковой тли. Таким образом, грибы филлосферы сорных и дикорастущих травянистых растений могут обладать широким спектром биологической активности. Предполагается, что это их свойство может иметь практическое значение для токсикологической оценки патогенов сорных растений, являющимися потенциальными микогербицидами. Полученные результаты говорят о том, что грибы рода *Alternaria* могут играть важную регулирующую роль в формировании биоценозов филлосферы, а также являются перспективными продуцентами антимикробных соединений с потенциально новыми механизмами действия.

Ключевые слова: микромрицеты, *Alternaria*, спектр биологической активности, экстракты, метаболиты, антибиотики.

DOI: 10.1134/S0026365618060034

Природные соединения являются прототипами многих лекарственных препаратов и пестицидов. Микромрицеты являются одним из богатейших ресурсов биологически активных соединений, а грибы рода *Alternaria* привлекают внимание исследователей не только как продуценты микотоксинов (Ostry, 2008; Lee et al., 2015), но и веществ с потенциально полезными свойствами: гербицидными (Lax et al., 1988; Qiang et al., 2010), инсектицидными (Singh et al., 2012), антимикробными (Okamura et al., 1993), противовирусными (Bashyal et al., 2014), противоопухолевыми (Aly et al., 2008; Phuwapraisirisan et al., 2009; Teiten et al., 2013). В настоящее время известны около 300 метаболитов, выделенных из грибов этого рода (Lou et al., 2013), и их активный поиск продолжается, особенно среди эндофитных грибов (Cai et al., 2014; Wang et al., 2014a, 2014b).

В ходе изучения видового разнообразия и таксономической ревизии альтернариоидных грибов на территории Российской Федерации в лабора-

тории микологии и фитопатологии Всероссийского научно-исследовательского института защиты растений (ВИЗР) была создана коллекция чистых культур, состоящая из более чем 850 изолятов 67 видов *Alternaria*. Проанализировав доступную литературу, мы выявили виды, многие из которых еще не изучены на предмет их биологической активности, например, *A. avenicola*, *A. eryngii*, *A. nobilis*, *A. papavericola*. У ряда видов изучение образования биологически активных веществ (БАВ) находится на начальном этапе, как у *A. japonica* (Siciliano et al., 2015) и *A. penicillata* (Титова и соавт., 2013), *A. oregonensis*, *A. metachromatica*, *A. photistica* (Andersen et al., 2009), *A. saponariae* (Cimmino et al., 2016b).

В задачи представленной работы входило исследование спектра биологической активности (антимикробной, фитотоксической и инсектицидной) неизученных и малоизученных грибов рода *Alternaria*, а также анализ их роста и продуктивности, что важно для определения биотехно-

Таблица 1. Список изолятов родов *Alternaria*

Коллекционный номер	Видовое название	Происхождение
307-011 (CBS 163.63)	<i>A. nobilis</i> (Vize) E.G. Simmons	Не известно
294-011	<i>A. saponariae</i> (Peck) Neerg.	Россия, Пермский край
201-011	<i>A. saponariae</i> (Peck) Neerg.	Россия, Иркутская область
144-011	<i>A. cf. saponariae</i> (Peck) Neerg.	Россия, Приморский край
122-011	<i>A. kamtschatica</i> Gannibal	Россия, Камчатский край
181-011	<i>A. japonica</i> Yoshii	Россия, Московская область
551-011 (IMI 387429)	<i>A. avenicola</i> E.G. Simmons, Kosiak & Kwasna	Норвегия
550-011 (CBS 121459)	<i>A. photistica</i> E.G. Simmons	Великобритания
499-011 (CBS 121339)	<i>A. eryngii</i> (Pers.) S. Hughes & E.G. Simmons	Новая Зеландия
497-011 (CBS 553.94)	<i>A. metachromatica</i> E.G. Simmons	Австралия
495-011 (CBS 916.96)	<i>A. alternata</i> (Fr.) Keissl.	Индия
494-011 (IMI 255532)	<i>A. tenuissima</i> (Nees) Wiltshire	Великобритания
493-011 (CBS 542.94)	<i>A. oregonensis</i> E.G. Simmons	США, штат Орегон
492-011 (CBS 210.86)	<i>A. infectoria</i> E.G. Simmons	Великобритания
295-011 (CBS 109157)	<i>A. solani</i> Sorauer	США, Вашингтон
119-011	<i>A. saponariae</i> (Peck) Neerg.	Россия, Приморский край
107-011	<i>A. saponariae</i> (Peck) Neerg.	Россия, Липецкая область
103-010 (VKM F-3042)	<i>A. macrospora</i> (Sacc.) Sawada	Таджикистан
463-011	<i>A. penicillata</i> (Corda) Woudenberg & Crous	Россия, Краснодарский край
463-021	<i>A. papavericola</i> Woudenberg & Crous	Россия, респ. Дагестан

логического потенциала перспективных изолятов грибов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Микроорганизмы. В работе использовали 20 изолятов различных видов грибов рода *Alternaria*, происхождение которых приведено в таблице 1. Одиннадцать штаммов было получено из трех ведущих коллекций микроорганизмов: CBS (Westerdijk Fungal Biodiversity Institute), IMI (The Centre for Agriculture and Bioscience International) и VKM РАН (Всероссийская коллекция микроорганизмов, VKM). Девять изолятов были выделены сотрудниками ВИЗР. Видовая принадлежность этих грибов была установлена Ф.Б. Ганнибалом на основе изучения морфологических и молекулярно-генетических признаков (Ганнибал, 2018). С экологической точки зрения их можно охарактеризовать как космополитные, сапрофитные и фитопатогенные обитатели филлосферы сорных и дикорастущих травянистых растений.

Культивирование. Грибы культивировали на агаризованной (1.5% агар-агара) и жидкой (100 мл среды в 500-мл конических колбах) питательной среде YES, содержащей глюкозу (120 г/л) и дрожжевой экстракт (20 г/л) (Samson et al., 2000), которая является одной из стандартных для изучения

культурально-морфологических признаков альтернариоидных грибов (Ганнибал, 2011) Среды инокулировали агаровым блоком с мицелием диаметром 5 мм, инкубирование грибов проводили в темноте при температуре 24°C. Учет диаметра колоний производили на 7-е сут после посева. Экстракцию метаболитов из жидкой культуры грибов проводили через 14 сут инкубации.

Экстракция метаболитов. Перед проведением экстракции мицелий отделяли от культуральной жидкости с помощью фильтрации. Экстракцию грибных метаболитов из культуральной жидкости (КЖ) проводили двумя порциями этилацетата по 50 мл в делительных воронках. Высушенный мицелий обрабатывали двумя порциями этилового спирта объемом 50 мл в ультразвуковой ванне в течение 5 мин. Полученные экстракты объединяли, отфильтровывали от мицелия через фильтр в испарительную колбу. Растворители отгоняли на ротонном испарителе при температуре 40°C.

Определение биологической активности экстрактов. Методики определения антимикробной (Егоров, 2004), фитотоксической (Берестецкий и соавт., 2010) и инсектицидной активности (Митина и соавт., 2012) экстрактов описаны ранее. Существенность различий между средними значениями определяли при помощи показателя наименьшей существенной разницы (НСР) на

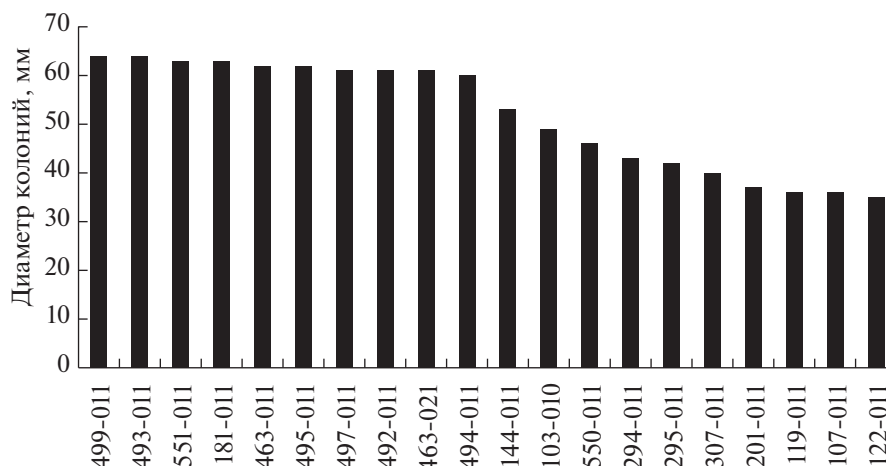


Рис. 1. Диаметр 7-сут колоний 20 различных изолятов *Alternaria* spp. на агаризованной среде YES при 24°C. НСР_{0,05} = 7.4.

уровне значимости 0.05 при помощи программы Statistica 6.0.

Дополнительно было изучено действие некоторых экстрактов на трансляцию и репликацию, как достаточно известные механизмы действия некоторых антибиотиков. Гиперчувствительный штамм *Escherichia coli* ΔtolC (удален белок TolC — основной участник эффлюкс-системы, отвечающей за экспорт антибиотиков из клетки), трансформированный плазмидой pDualrep2, использовали в качестве репортерного штамма для определения механизма действия изучаемых образцов. В качестве контрольных антибиотиков наносили левофлоксацин (ингибитор гиразы и топоизомеразы IV) и эритромицин (ингибитор работы рибосомы) (Osterman et al., 2016).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Рост и продуктивность. Диаметр 7-суточных колоний изучаемых альтернариоидных грибов на агаризованной среде YES составлял в среднем 48 мм. Быстрым ростом (более 60 мм) характеризовались *A. avenicola* 551-011, *A. eryngii* 499-011, *A. metachromatica* 497-011, *A. alternata* 495-011, *A. oregonensis* 493-011, *A. infectoria* 492-011, *A. papavericola* 463-021, *A. japonica* 181-011, *A. tenuissima* 494-011 и *A. penicillata* 463-011. К медленно растущим изолятам можно было отнести *A. kamschatica* 122-011, *A. saponariae* (119-011, 201-011 и 107-011), у которых диаметр недельных колоний не превышал 35 мм (рис. 1).

При культивировании на жидкой питательной среде YES выход сухой биомассы 14-сут культур грибов в среднем достигал 30–40 г/л (рис. 3). Наиболее интенсивно накапливали биомассу изоляты мелкоспоровых видов — *A. photistica* 550-011, *A. avenicola* 551-011 и *A. tenuissima* 494-011 (на уров-

не 55–75 г/л). Накопление биомассы представителями вида *A. saponariae* (изоляты 201-011 и 294-011 и 119-011) на жидкой среде YES было относительно медленным — на уровне 10–20 мг/л (рис. 2).

У большинства изученных изолятов альтернариоидных грибов выход экстрактивных веществ (ВЭВ) из мицелия был на уровне 15–30 мг/г сухой биомассы. Высокий ВЭВ (более 35 мг/г) получен из мицелия *A. saponariae* 119-011 и *A. nobilis* 307-011. Низкий уровень ВЭВ (менее 10 мг/г сухого мицелия) был характерен для *A. eryngii* 499-011 и *A. infectoria* 492-011 (рис. 3).

ВЭВ из КЖ изученных грибов варьировал от 75 до 375 мг/л. Высокопродуктивными (ВЭВ более 200 мг/л) были 6 изолятов изученных грибов. Наиболее высокий уровень ВЭВ (более 300 мг/л) отметили у *A. nobilis* 307 и *A. saponariae* 201. Низкой продуктивностью (ВЭВ из КЖ менее 100 мг/л) характеризовались 3 изолята: *A. saponariae* 107, *A. oregonensis* 493-011 и *A. solani* 295-011 (рис. 4).

Антимикробная активность. Тестирование антимикробных свойств альтернариоидных микроорганизмов методом агаровых блоков показало, что рост обоих использованных в работе видов бактерий подавляли экзометаболиты около 70% изолятов изученных грибов. Однако их чувствительность к антибиотикам, продуцируемым различными грибами, не была одинаковой. Рост дрожжевого гриба *Candida tropicalis* ингибировали метаболиты лишь 30% изолятов (рис. 5).

Относительно высокой активностью (зона лизиса более 4 мм) в отношении *Bacillus subtilis* обладали экзометаболиты *Alternaria* cf. *saponariae* 144-011 и трех изолятов *A. saponariae* (119-011, 201-011 и 294-011). *Pseudomonas syringae* была высокочувствительна к экзометаболитам *A. eryngii* 499-011, *A. cf. saponariae* 144-011, *A. saponariae* 119-011 и 201-011. По отношению к *C. tropicalis* максимальную анти-

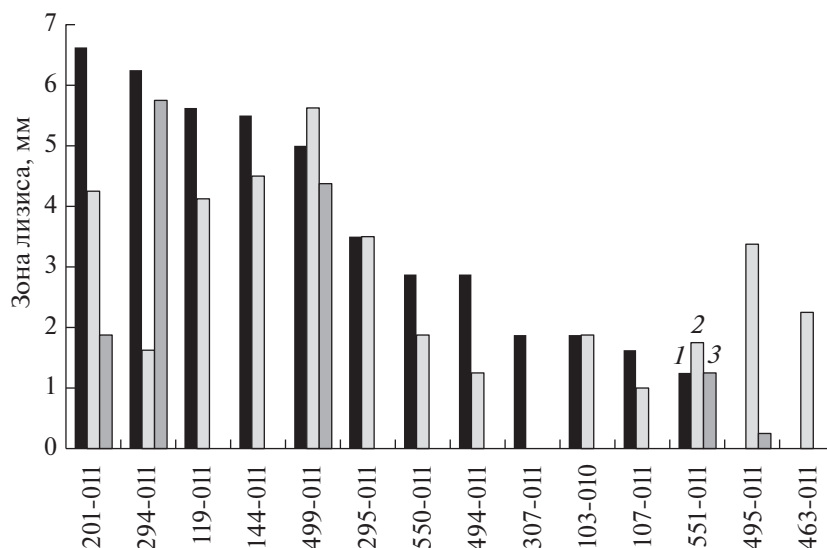


Рис. 2. Антибиотическая активность (зона лизиса, мм) 14-сут культур различных изолятов *Alternaria* spp., полученных на агаризованной среде YES, в отношении *Bacillus subtilis* (1), *Pseudomonas syringae* (2), *Candida tropicalis* (3). Оценка методом агаровых блоков. $НСП_{0,05} = 1.9$.

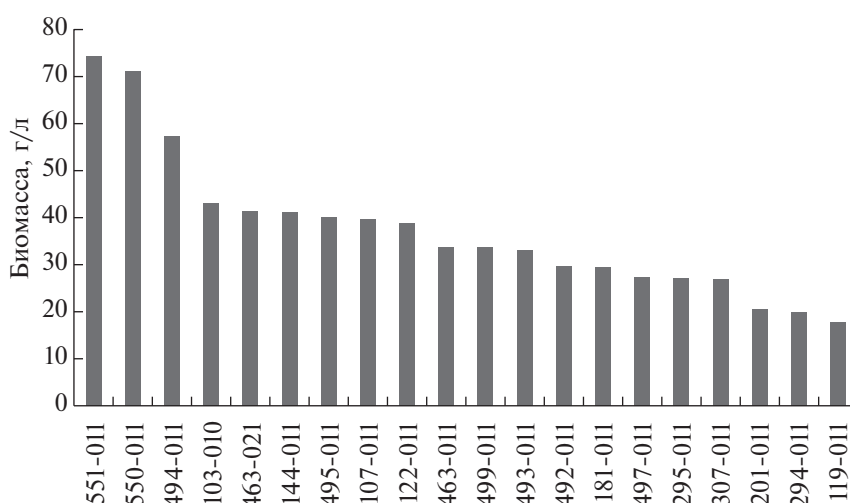


Рис. 3. Выход сухой биомассы на 14-е сут культивирования различных изолятов *Alternaria* spp. на жидкой среде YES. $НСП_{0,05} = 0.6$.

фунгальную активность проявил изолят 294-011 *A. saponariae*. Неселективной антимикробной активностью, которая была выявлена методом агаровых блоков, обладал изолят 499-011 *A. eryngii* (рис. 5).

В результате оценки антимикробной активности экстрактов из культур грибов методом бумажных дисков выявлено, что относительно высокую неселективную антибиотическую активность (зона лизиса 6–10 мм) проявили экстракты из КЖ трех изолятов *A. saponariae* (119-011, 201-011, 294-011). Существенно более низкую, но заметную (зона лизиса 3–5 мм) неселективную антимикробную ак-

тивность продемонстрировали экстракты из КЖ *A. kamtschatica* и *A. nobilis* (122-011 и 307-011) и *A. macrospora* 103-011. Экстракты из мицелия лишь *A. kamtschatica* и *A. nobilis* (122-011 и 307-011) достоверно ингибировали рост тест-микроорганизмов. В целом, экстракты из КЖ проявили значительно более высокую антимикробную активность, чем экстракты из мицелия (рис. 6).

Среди протестированных микроорганизмов бактерия *B. subtilis* была наиболее чувствительной к экстрактам из культур альтернариоидных микромицетов. Рост ее колоний подавляли экстракты из культурального фильтрата 15 изолятов грибов

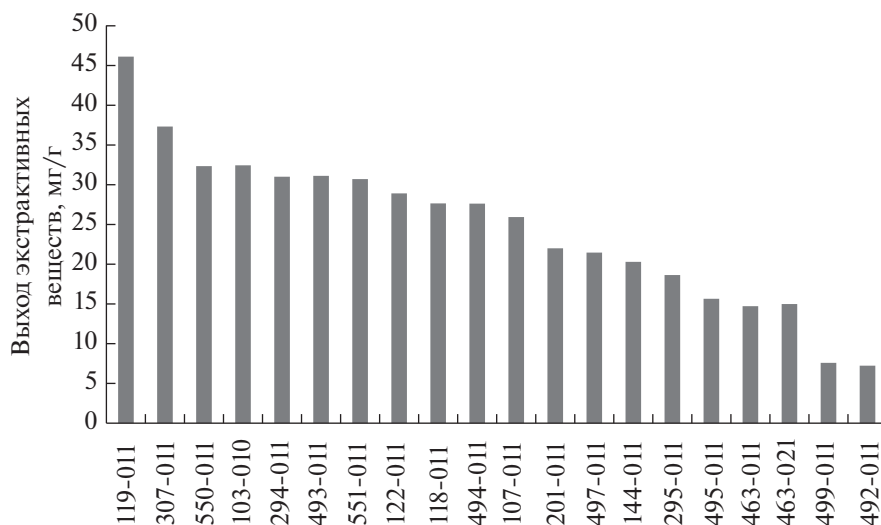


Рис. 4. Выход экстрактивных веществ из мицелия различных изолятов *Alternaria* spp., полученного на жидкой среде YES. НСР_{0,05} = 0.05.

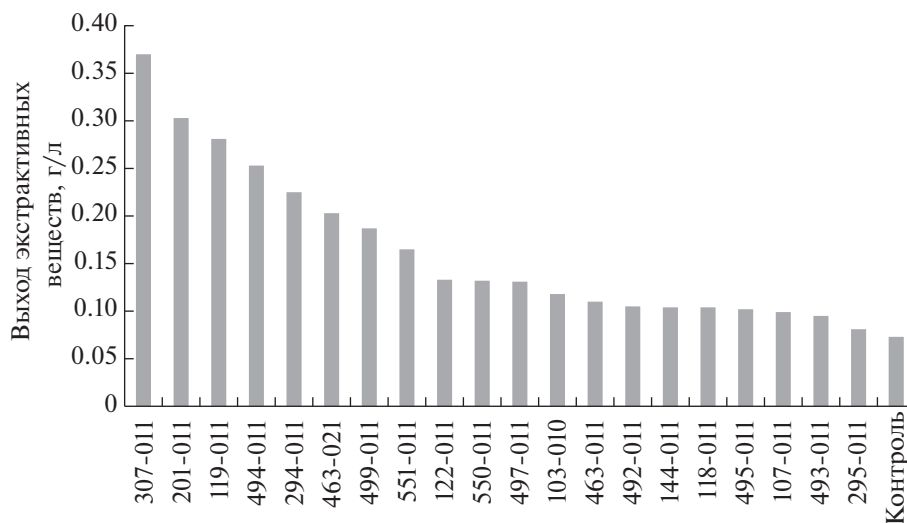


Рис. 5. Выход экстрактивных веществ из культуральной жидкости различных изолятов *Alternaria* spp. НСР_{0,05} = 0.005.

(75% от общего количества) (рис. 6а). Бактерия *P. fluorescens* была чувствительна к экстрактам из КЖ 7 изолятов альтернариоидных микромицетов (35% от общего количества изученных грибов) и экстракту из мицелия *A. kamtschatica* 122-011. Так же, как и в отношении *B. subtilis*, высокую антибиотическую активность против *P. fluorescens* проявили экстракты из КЖ трех изолятов *A. saponariae* (119-011, 201-011 и 294-011) (рис. 6б).

Антифунгальной активностью в отношении *C. tropicalis* обладали 10 экстрактов из КЖ (50%) и лишь два экстракта из мицелия изолятов 307-011 и 122-011 *A. nobilis* и *A. kamtschatica* (10%). Наиболее активными против этого тест-организма ока-

зались экстракты из КЖ *A. saponariae* 119-011 и 201-011 (рис. 6в).

Экстракты из КЖ изученных грибов не вызвали индукцию экспрессии репортерного белка, реагирующего на присутствие ингибиторов синтеза белка у штамма *E. coli*- Δ TolC (pDualrep2). В то же время экстракты, полученные из КЖ *A. tenuissima* 494-011 и *A. alternata* 495-011, индуцировали экспрессию репортерного белка, реагирующего на активацию в клетках SOS-ответа; такую же индукцию вызывал фторхинолон левофлоксацин – ингибитор гиразы и топоизомераз II класса, использованный как положительный контроль.

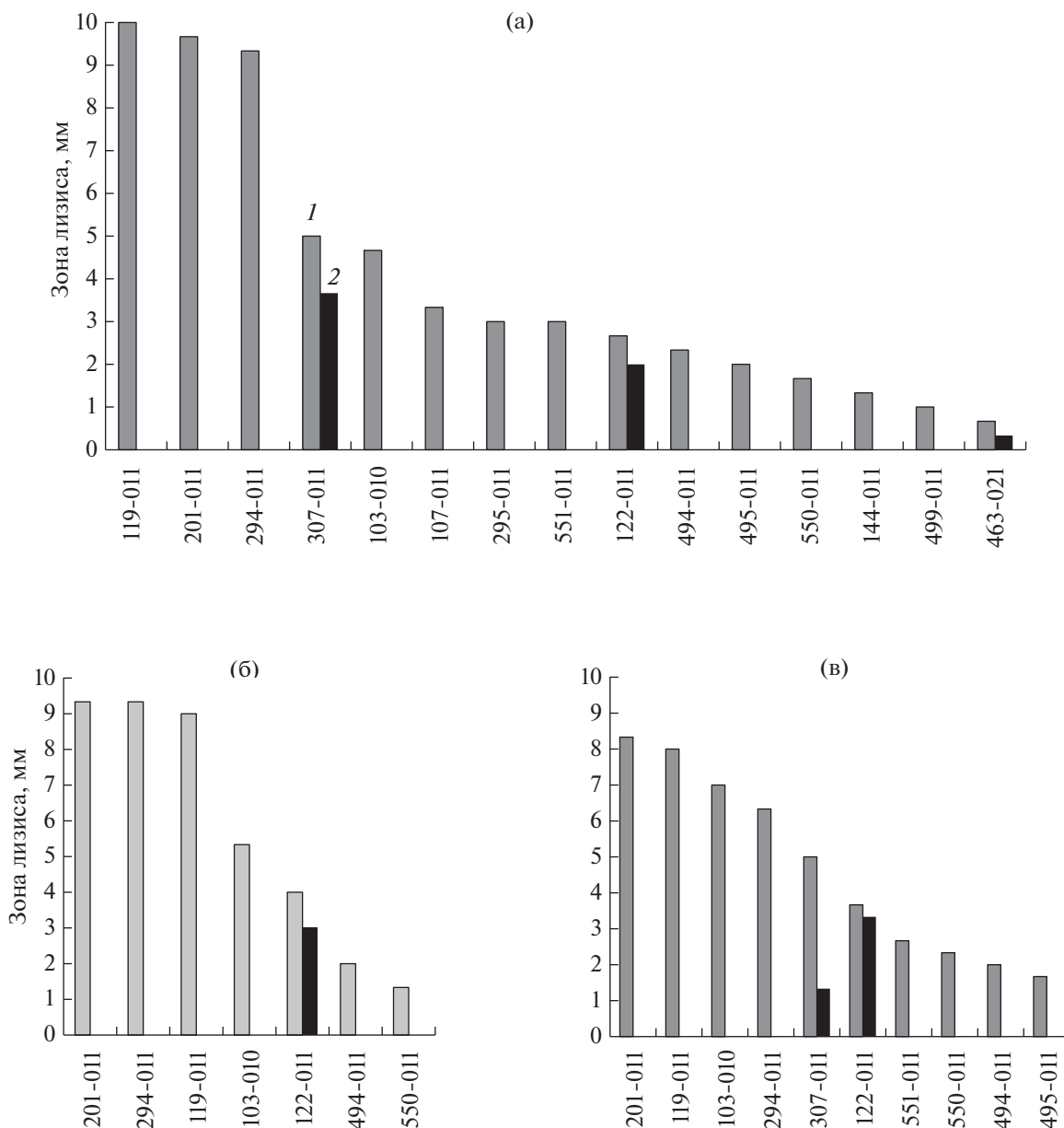


Рис. 6. Антибиотическая активность экстрактов (500 мкг/диск) из культуральной жидкости и мицелия альтернариоидных гифомицетов в отношении *Bacillus subtilis* (а), *Pseudomonas syringae* (б) и *Candida tropicalis* (в). 1 – экстракты из культуральной жидкости ($HCP_{0,05} = 0.78$); 2 – экстракты из мицелия ($HCP_{0,05} = 0.48$).

Фитотоксическая активность. Экстракты из мицелия изученных альтернариоидных микромицетов были малотоксичны или нефитотоксичны для листьев пырея. Листья арабидопсиса были чувствительными к экстрактам из мицелия лишь двух изолятов *A. kamtschatica* и *A. nobilis* (122-011 и 307-011) (рис. 7). Экстракты из КЖ грибов проявили существенную фитотоксическую активность как на листьях арабидопсиса, так и пырея. Однако чувствительность листьев этих растений к грибным метаболитам существенно различалась (рис. 7).

Относительно высокую неселективную фитотоксичность (длина/диаметр некроза около 10 мм) продемонстрировали комплексы экзометаболических веществ трех изолятов *A. saponariae* (119-011, 201-011, 294-011) и одного – *A. tenuissima* 494-011. Экстракт из КЖ *A. penicillata* 463-011 был более активен в отношении пырея, чем в отношении арабидопсиса. Листья арабидопсиса были более чувствительными к экстракту из КЖ *A. eryngii* 499-011, листья пырея – менее чувствительными (рис. 7).

При тестировании на листовых сегментах пырея экстракты из КЖ двух изолятов *A. kamtschati-*

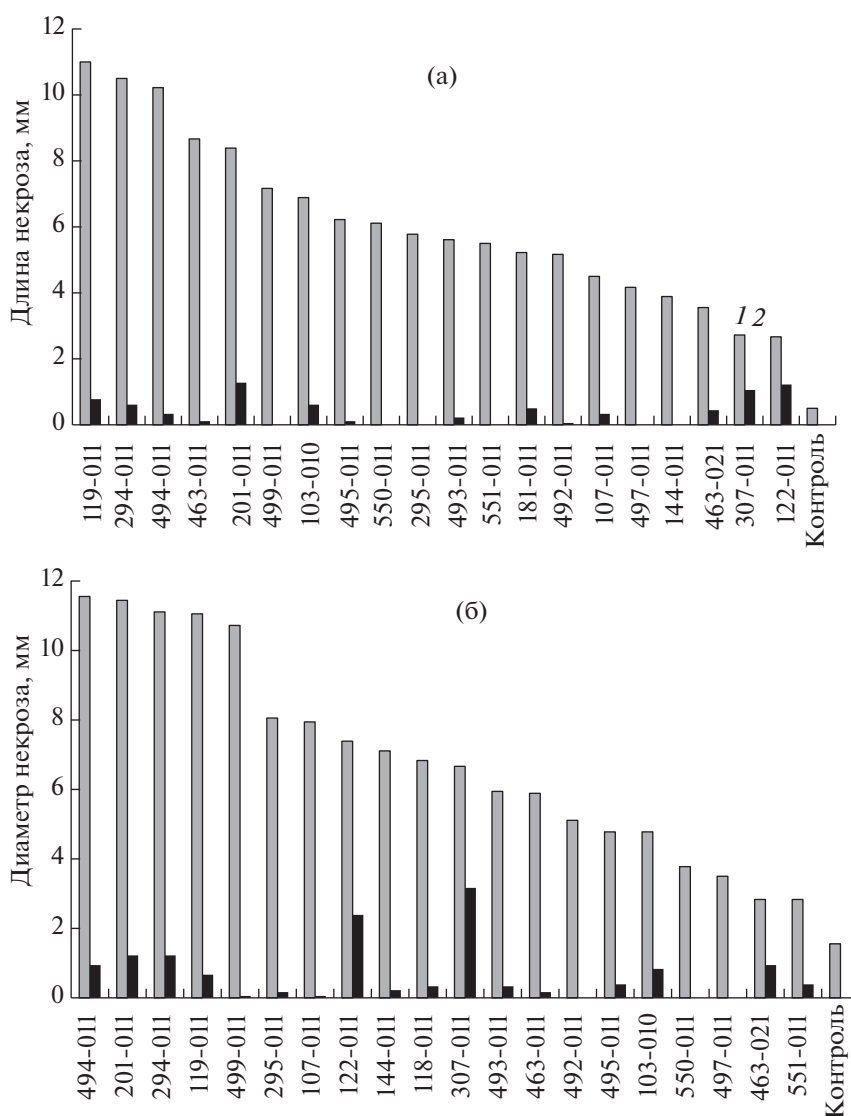


Рис. 7. Фитотоксическая активность экстрактов (5 мг/мл) из культуральной жидкости (1, $HCp_{0.05} = 2.1$) и мицелия (2, $HCp_{0.05} = 0.34$) *Alternaria* spp. на листовых сегментах пырея (а – длина некроза) и арабидопсиса (б – диаметр некроза).

sa и *A. nobilis* (122-011 и 307-011) показали минимальный уровень фитотоксической активности; листья арабидопсиса были к ним более чувствительными. Экзометаболиты *A. photistica* 550-011 и *A. avenicola* 551-011 были среднетоксичны для пырея (длина некроза 5–10 мм) и слаботоксичны для арабидопсиса. Низкий уровень фитотоксичности для листьев обоих тест-растений показали экстракты из КЖ *A. papavericola* 463-021 и *A. metachromatica* 497-011 (рис. 7).

Инсектицидная активность. Выявлено, что экстракты, полученные из КЖ и мицелия 8 изолятов различных видов альтернариоидных гифомицетов (из 13 использованных для эксперимента изолятов, относящихся к 11 видам) проявили инсектицидную активность против виковой тли. Суще-

ственная афидоцидная активность (гибель более 30% особей тли) отмечена у экстрактов из КЖ *A. saponariae* 201-011 и *A. penicillata* 463-011, а также у экстрактов из мицелия *A. japonica* 181-011 и *A. papavericola* 463-021 (рис. 8).

ОБСУЖДЕНИЕ

Рост и продуктивность. Изучение особенностей роста и определение продуктивности микроорганизмов – начальный этап поиска штаммов-продуцентов биологически активных веществ. Этому вопросу уделяется мало внимания на начальных этапах исследований: исследователи обычно концентрируются на определении биологической активности экстрактов. У многих фитопа-

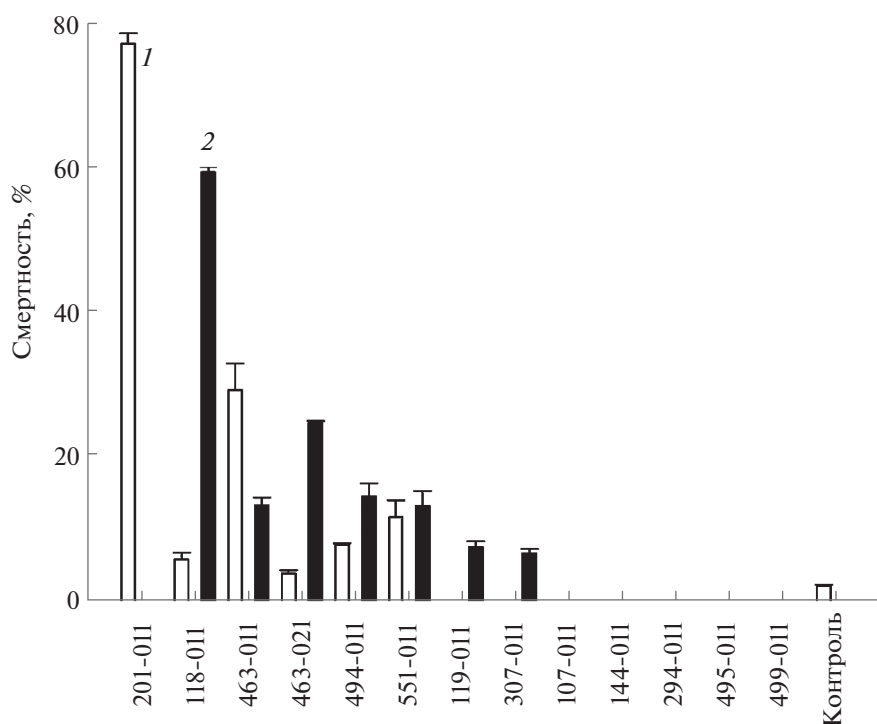


Рис. 8. Контактная инсектицидная активность 0.4%-ных экстрактов (среднее значение и стандартное отклонение) из культур различных изолятов *Alternaria* spp. в отношении виковой тли через 6 ч после обработки. 1 – экстракты из культуральной жидкости; 2 – экстракты из мицелия.

тогенных и эндофитных грибов средний уровень накопления экстрактивных веществ в культуральной жидкости находится в пределах 50–200 мг/л культуральной жидкости (Берестецкий и соавт., 2014, 2017). Выход экстрактивных веществ (ВЭВ) из культуральной жидкости изученных альтернариоидных микромицетов варьировал от 75 до 375 мг/л. Таким образом, грибы рода *Alternaria* характеризуются относительно высоким ВЭВ. Наиболее продуктивными (ВЭВ более 300 мг/л) были *A. nobilis* 307-011 и *A. saponariae* 201-011 (рис. 4). Несмотря на то, что наблюдались существенные различия в накоплении биомассы в процессе роста различных изолятов *Alternaria* spp., а также ВЭВ из нее (рис. 2, 3), определение этого параметра не столь важно, поскольку уровень биологической активности эндометаболитов был существенно ниже, чем у экзометаболитов изучаемых грибов.

Антимикробные свойства экстрактов из культур *Alternaria* spp., особенно эндофитных изолятов этих грибов, активно изучаются в последнее десятилетие. В скрининговой программе Vaz et al. (2009) обнаружено, что из более чем трехсот изолятов эндофитных грибов, выделенных из растений семейства *Orchidaceae*, произрастающих в Бразилии, выраженную антимикробную активность в отношении *Staphylococcus aureus* и *Bacillus cereus* проявил экстракт из культуры изолята *A. ar-*

borescens. Наряду со многими выделенными из листьев пшеницы грибами, изоляты *Alternaria* spp. продемонстрировали заметные антимикробные свойства (Sadrati et al., 2013). Экстракты из культур эндофитных изолятов *A. alternata*, *A. pelliculata* и *A. tangelonis*, выделенных из здоровых деревьев семейства *Cupressaceae*, проявили существенную антифунгальную и антибактериальную активность (Soltani, Moghaddam, 2014).

Из культур некоторых эндофитных изолятов мелкоспоровых видов рода *Alternaria* выделены и охарактеризованы антимикробные соединения как широкого, так относительно узкого спектра действия. Например, альтерсетин активен в отношении грамположительных бактерий на уровне ампициллина, тогда как грамтрицательные бактерии были малочувствительными к нему (Hellwig et al., 2002). Альтенусин действует на патогенные для человека грибы (например, *Paracoccidioides brasiliensis*), предположительно ингибируя образование клеточной стенки (Johann et al., 2012). Наблюдался синергетический эффект альтенусина в отношении *C. albicans* при его применении с сублетальными дозами некоторых химических фунгицидов класса азолов (Phaorongthai et al., 2013). Очень часто из культур мелкоспоровых альтернарий выделяют комплексы токсинов, которые по отдельности обладают слабой или

умеренной антимикробной активностью (Wang et al., 2014).

Антимикробными свойствами обладают и фитопатогенные *Alternaria* spp. Так, скрининг антимикробной активности у различных фитопатогенных аскомицетов методом агаровых блоков выявил наиболее высокий потенциал к образованию антибиотиков у представителей видов рода *Alternaria* spp., в частности: *A. euphorbiicola*, *A. eryngii*, *A. saponariae* и *A. sonchi* (Берестецкий, Курленя, 2014). В представленной работе показано, что более 70% изолятов изученных альтернариоидных микромицетов способно к образованию антимикробных веществ (рис. 2, б). Относительно высокую антибиотическую активность (зона лизиса 6–10 мм) проявили экстракты из КЖ *A. saponariae*, *A. kamtschatica*, *A. nobilis* и *A. macrospora*. Подтверждено также наличие антимикробных свойств у *A. eryngii*.

Из культуры *A. sonchi* был выделен антибиотик хлоромонилин, который демонстрирует широкий спектр антифунгальной активности в концентрации 10 мкг/мл, а также подавляет рост некоторых видов бактерий в концентрации около 1 мкг/диск (Cimmino et al., 2016a). Альтернатоксины С и D из культуры этого же гриба подавляли рост *B. subtilis* в концентрации 10 мкг/диск (Berestetskiy et al., 2015). Неселективные антимикробные вещества (сапонароксины В и С), действующие в концентрации около 100 мкг/диск, выделены из культуры *A. saponariae* 294-011 (Cimmino et al., 2016b). Эти исследования подтверждают, что за антимикробные свойства альтернариоидных микромицетов, использованных в представленной работе, отвечают их вторичные метаболиты. Более того, эти соединения могут иметь новые механизмы антибактериального действия: они не ингибировали процесс синтеза белка в бактериальных клетках, как многие антибиотики, образуемые грибами и бактериями (Кароог et al., 2017). С другой стороны, было подтверждено, что метаболиты из *A. alternata* и *A. tenuissima* (изоляты 494-011 и 495-011) вызывают в клетках *E. coli*-ΔTolC SOS-ответ. Из литературы известно, что альтернариол – обычный метаболит этих двух видов грибов – ингибирует топоизомеразу, что приводит к нарушениям в репликации ДНК и активации SOS-ответа (Fehg et al., 2009). Следует отметить, что ингибирование роста бактерий экстрактами этих изолятов было слабым (рис. 6), что также соответствует данным литературы (Fernandes et al., 2009; Arivudainambi et al., 2014).

За антимикробные свойства крупноспоровых видов – *A. solani* и *A. macrospora* могут отвечать антрахиноновые пигменты. Так, альтерсоланол А, образуемый многими крупноспоровыми *Alternaria* spp., ингибирует клеточное дыхание *Pseudomonas aeruginosa*, действуя как акцептор электронов

в цепи их передачи в мембранах (Haraguchi et al., 1992). 3-О-ацетил-альтерсоланол М и атроизомеры альтерпорриолов I и J запатентованы как потенциальные антимикробные соединения для борьбы с бактериями, обладающими множественной резистентностью к антибиотикам (Pretsch et al., 2010).

Фитотоксические свойства альтернариоидных микромицетов известны давно. Они образуют как неселективные, так и специфические для растений-хозяев фитотоксины. Многие из них рассматриваются как факторы вирулентности и гербицидные соединения. Этим направлениям исследований посвящен ряд крупных обзорных статей (Meena et al., 2017a; Chen, Qiang, 2017). Наша работа показала, что экстракты всех использованных в работе изолятов *Alternaria* spp. обладали фитотоксической активностью. Выявлены новые продуценты соединений с этим типом биологической активности: *A. avenicola*, *A. nobilis*, *A. kamtschatica*, *A. eryngii*, *A. penicillata*, *A. oregonensis*, *A. metachromatica* и *A. photistica*.

У мелкоспоровых *Alternaria* spp. из группы *tenuissima*, к которым относят *A. alternata* и *A. tenuissima*, одними из часто встречающихся фитотоксинов являются тенуазоновая кислота и тентоксин (Meena et al., 2017a). У других мелкоспоровых видов из секции *Infectoriae* (*A. infectoria*, *A. oregonensis*, *A. metachromatica*) и *Panax* (*A. avenicola*, *A. photistica*) эти токсины не обнаруживаются (Andersen et al., 1996, 2009). У крупноспоровых грибов этого рода (например, виды *A. solani* и *A. macrospora* из секции *Porri*) – макроспорин, альтерсоланол А, дегидрокурвуларин, цинниол (Andersen et al., 2008; Берестецкий и соавт., 2010). Недавно отнесенный к роду *Alternaria* вид *Brachycladium papaveris* (= *A. papavericola*) обладает фитотоксическими свойствами, ингибируя развитие проростков мака (Титова и соавт., 2013). Недавно нами было показано, что сапонароксины В и С, образуемые *A. saponariae* 294-011, обладают фитотоксическими и антимикробными свойствами (Cimmino et al., 2016b).

Инсектицидная активность. Представленные данные свидетельствуют о том, что некоторые виды микромицетов, относящиеся к роду *Alternaria*, способны к образованию метаболитов с инсектицидной активностью. Из выборки изолятов, представляющих 8 малоизученных видов, существенную активность проявило около 20% изолятов *Alternaria* spp. Однако следует отметить, что это первая скрининговая работа, посвященная изучению действия метаболитов грибов этого рода на членистоногих. Для углубленных исследований в дальнейшем может потребоваться оптимизация рабочих концентраций экстрактов, расширение спектра тестируемых насекомых, а также опреде-

ление инсектицидного действия микотоксинов, образуемых грибами этого рода.

Известно, что грибы рода *Alternaria* часто обнаруживаются на насекомых и способны вызывать их микозы (Sharma, Sharma, 2014). В спорадических работах показано, что некоторые *Alternaria* spp. могут образовывать инсектицидные метаболиты. Так, изоляты *A. brassicae* образуют полипептидные фитотоксины из группы деструксинов, некоторые из которых (например, деструксин В) обладают инсектицидными свойствами (Buchwaldt, Green, 1992; Sowjanya Sree et al., 2008). Тенуазоновая кислота в пониженных концентрациях, нетоксичных для чайной розы и розовой тли, способна достоверно ингибировать размножение вредителя (Yang et al., 2015). Экстракты из гриба *A. alternata* обладали инсектицидной активностью, ингибировали ацетилхолинэстеразу у галлерии, а также подавляли ее иммунные реакции – снижали количество гемоцитов, активность лизоцима и фенолоксидазы (Singh et al., 2012; Kaur et al., 2015). Нами было показано, что *A. papavericola* 463-021 (= *Brachycladium papaveris* N30 или VIZR 1.39) обладает инсектицидными свойствами: этанольный экстракт из мицелия этого гриба вызывал гибель виковой тли на уровне ботанического инсектицида нимацаль (Берестецкий и соавт., 2015).

Таким образом, наряду со многими почвенными, эндофитными и фитопатогенными микромицетами, грибы из рода *Alternaria* способны образовывать фитотоксины, антибиотики и инсектицидные метаболиты. Эти вещества, возможно, необходимы им для колонизации растений, конкурентной борьбы за субстрат, а также выживания на растительных остатках и в почве. По сравнению с другими грибами-обитателями филлосферы растений (Берестецкий и соавт., 2014, 2017), они обладают относительно высоким потенциалом как продуценты не только фитотоксических, но и антимикробных веществ: до 75% изучаемых грибов проявили антимикробные свойства. Кроме того, в нашей работе продемонстрирована полезность использования для скрининга антимикробных веществ репортерных систем, позволяющих определять также и предположительный механизм их действия. В связи с вышесказанным интенсивное изучение биоразнообразия грибов рода *Alternaria*, создание коллекций штаммов грибов этого рода, выделение и изучение спектра биологической активности (особенно антимикробной) их метаболитов представляется перспективным направлением дальнейших исследований.

Работа выполнена при поддержке грантов РНФ 14-27-00067 (выделение и идентификация грибов) и 18-44-04005 (работы по определению механизма антимикробной активности экстрактов) и проекта РАН № 0665-2014-0008 (определение биологической активности экстрактов).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Берестецкий А.О., Юзихин О.С., Каткова А.С., Добродумов А.В., Сивогризов Д.Е., Коломбет Л.В. Выделение, идентификация и характеристика фитотоксина, образуемого грибом *Alternaria cirsinioxia* // Прикл. биохимия и микробиология. 2010. Т. 46. № 1. С. 84–88.
- Berestetskii A.O., Yuzikhin O.S., Katkova A.S., Dobrodumov A.V., Sivogrirov D.E., Kolombet L.V. Isolation, identification, and characteristics of the phytotoxin produced by the fungus *Alternaria cirsinioxia* // Appl. Biochem. Microbiol. 2010. V. 46. P. 75–79.
- Берестецкий А.О., Аполлонова Л.С., Сокоорнова С.В., Черменская Т.Д. Инсектицидные свойства некоторых фитопатогенных аскомицетов // Вестник защиты растений. 2015. Т. 85. № 3. С. 52–54.
- Берестецкий А.О., Гасич Е.Л., Полуэктова Е.В., Николаева Е.В., Сокоорнова С.В., Хлопунова Л.Б. Биологическая активность грибов филлосферы сорных и дикорастущих травянистых растений // Микробиология. 2014. Т. 83. № 5. С. 534–542.
- Berestetskii A.O., Gasich E.L., Poluektova E.V., Nikolaeva E.V., Sokornova S.V., Khlopunova L.B. Biological activity of fungi from the phyllosphere of weeds and wild herbaceous plants // Microbiology. 2014. V. 83. P. 523–530.
- Берестецкий А.О., Курленя А.С. Антимикробные свойства некоторых фитопатогенных микромицетов // Микология и фитопатология. 2014. Т. 48. № 2. С. 123–134.
- Берестецкий А.О., Пантелева А.С., Ганнибал Ф.Б., Гомжина М.М., Гасич Е.Л., Сокоорнова С.В. Физиолого-биохимические свойства и биологическая активность фомоидных грибов, выделенных из филлосферы сорных и дикорастущих травянистых растений // Микология и фитопатология. 2017. Т. 51. № 5. С. 283–291.
- Ганнибал Ф.Б. Новые виды и новые находки в России грибов рода *Alternaria* sect. *Gypsophilae* // Микология и фитопатология. 2018. Т. 52. В печати.
- Ганнибал Ф.Б. Мониторинг альтернариозов сельскохозяйственных культур и идентификация грибов рода *Alternaria*. Методическое пособие. Под ред. М.М. Левицина. СПб.: ГНУ ВИЗР Россельхозакадемии, 2011. 70 с.
- Егоров Н. С. Основы учения об антибиотиках. М.: МГУ Наука, 2004. 528 с.
- Митина Г.В., Юзихин О.С., Исангалин Ф.Ш., Якимов А.П. Выделение и изучение химической структуры токсина с инсектицидной активностью из гриба *Lecanicillium muscarium* // Научное приборостроение. 2012. Т. 22. № 2. С. 3–10.
- Титова Ю.А., Шенин Ю.Д., Павлюшин В.А., Краснобаева И.Л. Вторичные эндометаболиты штамма *Brachycladium papaveris* 1.39 и его реизолятов // Микология и фитопатология. 2013. Т. 47. № 4. С. 266–273.
- Aly A.H., Edrada-Ebel R., Indriani I.D., Wray V., Müller W.E.G., Totzke F., Zirrgiebel U., Schächtele C., Kubbutat M.H., Lin W.H., Proksch P., Ebel R. Cytotoxic metabolites from the fungal endophyte *Alternaria* sp. and their subsequent detection in its host plant *Polygonum senegalense* // J. Nat. Prod. 2008. V. 71. P. 972–980.
- Andersen B., Thrane U. Differentiation of *Alternaria infectoria* and *Alternaria alternata* based on morphology, metabolite profiles, and cultural characteristics // Can. J. Microbiol. 1996. V. 42. P. 685–689.

- Andersen B., Sørensen J.L., Nielsen K.F., Gerrits van den Ende B., de Hoog S. A polyphasic approach to the taxonomy of the *Alternaria infectaria* species-group // Fungal Genet. Biol. 2009. V. 46. P. 642–656.
- Andersen B., Dongo A., Pryor B.M. Secondary metabolite profiling of *Alternaria dauci*, *A. porri*, *A. solani*, and *A. tomatophila* // Mycol. Res. 2008. V. 112. P. 241–250.
- Arivudainambi U.S.E., Kanugula A.K., Kotamraju S., Karunakaran C., Rajendran A. Antibacterial effect of an extract of the endophytic fungus *Alternaria alternata* and its cytotoxic activity on MCF-7 and MDA MB-231 tumour cell lines // Biol. Lett. 2014. V. 51. P. 7–17.
- Bashyal B.P., Wellensiek B.P., Ramakrishnan R., Faeth S.H., Ahmad N., Gunatilaka A.A.L. Alttoxins with potent anti-HIV activity from *Alternaria tenuissima* QUE1Se, a fungal endophyte of *Quercus emoryi* // Bioorg. Med. Chem. 2014. V. 22. P. 6112–6116.
- Buchwaldt L., Green H. Phytotoxicity of destruxin B and its possible role in the pathogenesis of *Alternaria brassicae* // Plant Pathol. 1992. V. 41. P. 55–63.
- Cai S., King J.B., Du L., Powell D.R., Cichewicz R.H. Bioactive sulfur-containing sulochrin dimers and other metabolites from an *Alternaria* sp. isolate from a Hawaiian soil sample // J. Nat. Prod. 2014. V. 77. P. 2280–2287.
- Chen S., Qiang S. Recent advances in tenuazonic acid as a potential herbicide // Pestic. Biochem. Physiol. 2017. V. 143. P. 252–257.
- Cimmino A., Pescitelli G., Berestetskiy A., Dalinova A., Krivorotov D., Tuzi A., Evidente A. Biological evaluation and determination of the absolute configuration of chloromonilicin, a strong antimicrobial metabolite isolated from *Alternaria sonchi* // J. Antibiot. 2016a. V. 69. P. 9–14.
- Cimmino A., Masi M., Minkovich E., Evidente M., Gannibal P., Krivorotov D., Chisty L., Berestetskiy A., Evidente A. Saponaroxins A–C, a new 19-oxa-tricyclohenicosatetraenone and, a new dioxacyclopropacycloundecene-10-carbaldehyde and its 6,7-dihydro derivative, produced by *Alternaria saponariae*, a pathogen of a medicinal plant *Saponaria officinalis* // Tetrahedron Lett. 2016b. V. 57. P. 1702–1705.
- Fehr M., Pahlke G., Fritz J., Christensen M.O., Boege F., Altemöller M., Podlech J., Marko D. Alternariol acts as a topoisomerase poison, preferentially affecting the II alpha isoform // Mol. Nutr. Food Res. 2009. V. 53. P. 441–451.
- Fernandes M.R.V., Costa e Silva T.A., Pfenning L.H., da Costa-Neto C.M., Heinrich T.A., de Alencar S.M., de Lima M.A., Ikegaki M. Biological activities of the fermentation extract of the endophytic fungus *Alternaria alternata* isolated from *Coffea arabica* L. // Braz. J. Pharm. Sci. 2009. V. 45. P. 677–685.
- Haraguchi H., Abo T., Hashimoto K., Yagi A. Action-mode of antimicrobial altersolanol A in *Pseudomonas aeruginosa* // Biosci. Biotechnol. Biochem. 1992. V. 56. P. 1221–1224.
- Hellwig V., Grothe T., Mayer-Bartschmid A., Endermann R., Geschke F.U., Henkel T., Stadler M. Altersetin, a new antibiotic from cultures of endophytic *Alternaria* spp. Taxonomy, fermentation, isolation, structure elucidation and biological activities // J. Antibiot. 2002. V. 55. P. 881–892.
- Johann S., Rosa L.H., Rosa C.A., Perez P., Cisalpino P.S., Zani C.L. Antifungal activity of altenusin isolated from the endophytic fungus *Alternaria* sp. against the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* // Rev. Iberoam. Micol. 2012. V. 29. P. 205–209.
- Kapoor G., Saigal S., Elongavan A. Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians // J Anaesthesiol. Clin. Pharmacol. 2017. V. 33. P. 300–305.
- Kaur H.P., Singh B., Thakur A., Kaur A., Kaur S. Studies on immunomodulatory effect of endophytic fungus *Alternaria alternata* on *Spodoptera litura* // J. Asia-Pacific Entomol. 2015. V. 18. P. 67–75.
- Lax A.R., Shepherd H.S., Edwards J.V. Tentoxin, a chlorosis-inducing toxin from *Alternaria* as a potential herbicide // Weed Technol. 1988. V. 2. P. 540–544.
- Lee H.B., Patriarca A., Magan N. *Alternaria* in food: eco-physiology, mycotoxin production and toxicology // Mycobiology. 2015. V. 43. P. 93–106.
- Lou J., Fu L., Peng Y., Zhou L. Metabolites from *Alternaria* fungi and their bioactivities // Molecules. 2013. V. 18. P. 5891–5935.
- Meena M., Gupta S.K., Swapnil P., Zehra A., Dubey M.K., Upadhyay R.S. *Alternaria* toxins: potential virulence factors and genes related to pathogenesis // Front. Microbiol. 2017. V. 8. P. 1451. doi 10.3389/fmicb.2017.01451
- Meena M., Swapnil P., Upadhyay R.S. Isolation, characterization and toxicological potential of *Alternaria*-mycotoxins (TeA, AOH and AME) in different *Alternaria* species from various regions of India // Sci. Rep. 2017. V. 7. P. 8777. doi 10.1038/s41598-017-09138-9
- Pretsch A., Proksch P., Debbab A. New Anthraquinone Derivatives // US patent application № 20120129927 A1. 2010.
- Okamura N., Haraguchi H., Hashimoto K., Yagi A. Altersolanol-related antimicrobial compounds from a strain of *Alternaria solani* // Phytochemistry 1993. V. 34. P. 1005–1009.
- Osterman I.A., Komarova E.S., Shiryayev D.I., Korniltsev I.A., Khven I.M., Lukyanov D.A., Tashliitsky V.N., Serebryakova M.V., Efremenkova O.V., Ivanenkov Y.A., Bogdanov A.A., Sergiev P.V., Dontsova O.A. Sorting out antibiotics' mechanisms of action: a double fluorescent protein reporter for high throughput screening of ribosome and DNA biosynthesis inhibitors // Antimicrob. Agents Chemother. 2016 V. 60. P. 7481–7489.
- Ostry V. *Alternaria* mycotoxins: an overview of chemical characterization, producers, toxicity, analysis and occurrence in foodstuffs // World Mycotoxin J. 2008. V. 1. P. 175–188.
- Phaopongthai J., Wiyakrutta S., Meksuriyen D., Sriubolmas N., Suwanborirux K. Azole-synergistic anti-candidal activity of altenusin, a biphenyl metabolite of the endophytic fungus *Alternaria alternata* isolated from *Terminalia chebula* Retz. // J. Microbiol. 2013. V. 51. P. 821–828.
- Phuwapraisirisan P., Rangsan J., Siripong P., Tippyang S. New antitumor fungal metabolites from *Alternaria porri* // Nat. Prod. Res. 2009. V. 23. P. 1063–1071.
- Qiang S., Wang L., Wei R., Zhou B., Chen S., Zhu Y., Dong Y., An C. Bioassay of the herbicidal activity of AAC-toxin produced by *Alternaria alternata* isolated from *Ageratina adenophora* // Weed Technol. 2010. V. 24. P. 197–201.
- Sadrati N., Daoud H., Zerroug A., Dahamna S., Bouharati S. Screening of antimicrobial and antioxidant secondary metabolites from endophytic fungi isolated from Wheat (*Triticum durum*) // J. Plant Prot. Res. 2013. V. 53. P. 128–136.
- Samson R.A., Hoekstra E.S., Frisvad J.C., Filtenborg O. Introduction to food- and airborne fungi. 6 edn. Utrecht: CBS, 2000, 389 p.

- Sharma I., Sharma A. Use of *Alternaria* spp. as a pest control agent: a review // World App. Sci. J. 2014. V. 31. P. 1869–1872.
- Siciliano I., Ortu G., Gilardi G., Gullino M.L., Garibaldi A. Mycotoxin production in liquid culture and on plants infected with *Alternaria* spp. isolated from rocket and cabbage // Toxins. 2015. V. 7. P. 743–754.
- Singh B., Thakur A., Kaur S., Chadha B.S., Kaur A. Acetylcholinesterase inhibitory potential and insecticidal activity of an endophytic *Alternaria* sp. from *Ricinus communis* // Appl. Biochem. Biotechnol. 2012. V. 168. P. 991–1002.
- Soltani J., Moghaddam M.S.H. Antiproliferative, antifungal, and antibacterial activities of endophytic *Alternaria* species from *Cupressaceae* // Cur. Microbiol. 2014. V. 69. P. 349–356.
- Sowjanya Sree K., Padmaja V., Murthy Y.L. Insecticidal activity of destruxin, a mycotoxin from *Metarhizium anisopliae* (*Hypocreales*), against *Spodoptera litura* (*Lepidoptera: Noctuidae*) larval stages // Pest Manag. Sci. 2008. V. 64. P. 119–125.
- Teiten M.-H., Mack F., Debbab A., Aly A.H., Dicato M., Proksch P., Diederich M. Anticancer effect of altersolanol A, a metabolite produced by the endophytic fungus *Stemphylium globuliferum*, mediated by its pro-apoptotic and anti-invasive potential via the inhibition of NF- κ B activity // Bioorganic Med. Chem. 2013. V. 21. P. 3850–3858.
- Vaz A. B.M., Mota R.C., Bomfim M.R.Q., Vieira M.L.A., Zani C.L., Rosa C.A., Rosa L.H. Antimicrobial activity of endophytic fungi associated with *Orchidaceae* in Brazil // Can. J. Microbiol. 2009. V. 55. P. 1381–1391.
- Wang J., Cox D.G., Ding W., Huang G., Lin Y., Li C. Three new resveratrol derivatives from the mangrove endophytic fungus *Alternaria* sp. // Mar Drugs. 2014. V. 12. P. 2840–2850.
- Wang Y., Yang M.H., Wang X.B., Li T.X., Kong L.Y. Bioactive metabolites from the endophytic fungus *Alternaria alternata* // Fitoterapia. 2014. V. 99. P. 153–158.
- Yang F., Yang B., Li B., Xiao C. *Alternaria* toxin-induced resistance in rose plants against rose aphid (*Macrosiphum rosivorum*): effect of tenuazonic acid // J. Zhejiang Univ. Sci. B. 2015. V. 16. P. 264–274.

Spectrum of Biological Activity of the *Alternaria* Fungi Isolated from the Phyllosphere of Herbaceous Plants

A. O. Berestetskiy^{1,*}, F. B. Gannibal¹, E. V. Minkovich¹, I. A. Osterman², D. R. Salimova¹, P. V. Sergiev², and S. V. Sokornova¹

¹All-Russian Research Institute of Plant Protection, St.-Petersburg, Russia

²Chemical Faculty, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

*e-mail: aberestetskiy@vizr.spb.ru

Received April 17, 2018

Abstract—Antimicrobial, phytotoxic, and insecticidal activity of 20 isolates of 16 *Alternaria* species isolated from above-ground organs of weeds and wild herbaceous plants was determined. Assessment of the antibacterial activity by the agar blocks and paper disks methods revealed antibacterial activity against *Bacillus subtilis* and/or *Pseudomonas syringae* in over 70% of the isolates. Antifungal activity against *Candida tropicalis* was found in 30% of the isolates. The reporter system used in the work revealed no effect of the studied extracts on the ribosomes, although some of them inhibited topoisomerase. Extracts from the culture liquid of all *Alternaria* spp. isolates were toxic to isolated leaves of *Arabidopsis thaliana* and *Elytrigia repens*. Insecticidal activity of the extracts against vetch aphid (*Megoura viciae*) larvae was revealed in 40% of the isolates. Thus, fungi from the phyllosphere of weeds and wild herbaceous plants may exhibit a broad range of biological activity. This feature may probably be of practical importance for toxicological assessment of those weed pathogens that are evaluated as potential bioherbicides. Our results show that *Alternaria* fungi may play a significant regulatory role in formation of the communities of phyllosphere organisms and are promising producers of antimicrobial compounds with potentially new mechanisms of action.

Keywords: micromycetes, *Alternaria*, spectrum of the biological activity, extracts, metabolites, antibiotics

РОЛЬ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ МИКРООГАНИЗМОВ БИОПЛЕНОК КАМЕНИСТЫХ СУБСТРАТОВ В СИСТЕМЕ САМООЧИЩЕНИЯ ОЗЕРА БАЙКАЛ

© 2018 г. М. Ю. Сулова^а, * , О. С. Пестунова^а, Е. В. Суханова^а, Ю. Р. Штыкова^а,
Т. Я. Косторнова^а, И. В. Ханаев^а, М. В. Сакирко^а, **В. В. Парфенова^а**

^аЛимнологический институт Сибирского отделения РАН, Иркутск, 664033, Россия

*e-mail: suslova@lin.irk.ru

Поступила в редакцию 31.01.2018 г.

В результате эколого-микробиологического исследования биопленок каменистых субстратов в литоральной зоне Южного Байкала (август 2012 г.), сформированных в районах с различной антропогенной нагрузкой, выявили отличия количественного и качественного состава различных физиолого-биохимических групп культивируемых микроорганизмов. Отличительной чертой эпилитических биопленок района Байкальского целлюлозно-бумажного комбината (БЦБК) является максимальная численность исследуемых групп микроорганизмов (органотрофы – 770.2 ± 290.3 тыс. КОЕ/см², амилोलитики – 38.1 ± 7.7 тыс. КОЕ/см², фосфатрастворяющие – 4.8 ± 1.4 тыс. КОЕ/см², фосформобилизирующие – 212.0 ± 27.6 тыс. КОЕ/см², фенолоксиляющие – 15.7 ± 2.4 тыс. КОЕ/см², плесневые грибы – 3.2 ± 0.4 тыс. КОЕ/см², общие колиформные бактерии – 193.3 ± 28.2 КОЕ/см², общее число микроорганизмов (ОМЧ, при 37°C) – 24.9 ± 1.7 тыс. КОЕ/см²), что свидетельствует о высокой деструкционной активности биопленок в ответ на антропогенную нагрузку исследуемого района. Эпилитические биопленки района п. Большие Коты характеризуются минимальными значениями численности органотрофных и фосфатрастворяющих микроорганизмов и отсутствием плесневых грибов.

Ключевые слова: оз. Байкал, эпилитические биопленки, органотрофы, амилолитики, фосфатмобилизирующие, фосфатрастворяющие, нефтеокисляющие, фенолоксиляющие, целлюлозоразрушающие микроорганизмы

DOI: 10.1134/S0026365618060186

По современным представлениям известно, что 95–99% всех микроорганизмов в природных местах обитания существуют в виде биопленок (Николаев, Плакунов, 2007). Биопленки, которые преобладают в различных экосистемах, часто состоят из высоко структурированных многовидовых сообществ. Перифитон (обрастание, биопленки) – это сообщество организмов, развивающееся на плотном субстрате в водной экосистеме за пределами придонного слоя воды (Константинов, 1986). В том случае, где в качестве субстрата выступают камни, валуны и скалы, оно называется эпилитон (Протасов, 2010). Исследование микробного сообщества эпилитических биопленок в озере Байкал проводятся относительно недавно. Первые результаты о видовом и морфологическом разнообразии микроорганизмов биопленок каменистых пород различного минералогического состава литорали озера Байкал и стальных пластин, искусственно помещенных на дно этой зоны, опубликованы в 2008 и 2010 гг. (Парфенова и соавт., 2008; Мальник, 2010; Мальник и соавт.,

2013). Впервые методом пироксевенирования получены сведения о микробной составляющей планктона и биопленок в озере Байкал: показано таксономическое разнообразие бактериальных сообществ и различия в их структуре (Парфенова и соавт., 2013).

Большую значимость приобретают исследования литоральной зоны, где происходят интенсивные процессы превращения веществ, непосредственное участие в которых принимает перифитон. Микроорганизмы, обитающие в перифитоне литорали оз. Байкал, играют исключительно важную роль в круговороте вещества и энергии водоема. Они участвуют в продукции и деструкции органического вещества автохтонного и аллохтонного происхождения, в результате чего непрерывно поддерживаются процессы биопродукции и интенсивного самоочищения озера. Основные процессы биоремедиации в мелководной части озера происходят с участием микробного сообщества биопленок, которые формируются на природном субстрате каменистой литорали. Это со-

общество состоит из целого комплекса микроорганизмов – бактерий, актиномицетов, дрожжей, грибов, микроорганизмов круговорота азота, фосфора, серы, от физиологической активности которых зависит интенсивность процесса деструкции органического вещества различной природы. Очень важно исследовать состав основных групп микроорганизмов в биопленочных сообществах и их физиолого-биохимическую активность для оценки как влияния антропогенного фактора, так и способности экосистемы к самоочищению. Сообщества биопленок реагируют на любые изменения естественной среды обитания уменьшением или увеличением численности различных физиологических групп, изменением структуры сообщества, то есть могут служить индикаторами при изучении уровня антропогенной нагрузки на водную экосистему. Быстро адаптируясь к меняющимся условиям, биопленки активно участвуют в процессах самоочищения, что способствует поддержанию стабильности природных экосистем (Costerton et al., 1987; Flemming, 2002).

В последнее время особое внимание уделяется случаям начала эвтрофикации участков прибрежной зоны оз. Байкал. В 2011 г. на береговой линии Лиственничного залива обнаружено выраженное нарушение зональной поясности, с заселением зеленой нитчатой водоросли *Spirogyra* sp., превышением санитарно-микробиологических и химических норм воды оз. Байкал (Кравцова и соавт., 2012). В 2013 г. была обнаружена чрезвычайная экологическая ситуация в районе северной оконечности Байкала, где на сотни метров вдоль береговой линии простирались огромные черно-зеленые скопления водоросли рода *Spirogyra*, которая массово развивалась на дне озера до глубины 5–7 м (Тимошкин и соавт., 2014а). Безусловно, случаи эвтрофикации имеют место и на других участках прибрежной зоны Байкала, используемых для рекреационной деятельности (Тимошкин и соавт., 2014б). Данные процессы являются первым признаком крупномасштабного изменения прибрежной части экосистемы оз. Байкал вследствие антропогенной нагрузки и требуют серьезного внимания исследователей. Схожую проблему влияния антропогенной нагрузки на качественный и количественный состав микробного сообщества эпиплитических биопленок отмечали в Кольском заливе Баренцева моря (Мирошниченко, 2016), в Средиземном море (Sanz-Lazaro et al., 2015), в реках Новой Зеландии (Washington et al., 2013).

Согласно гидрохимической оценке вод выбренных районов, антропогенное влияние имеет место. На период проводимых исследований гидрохимический анализ вод показал воздействие ОАО “БЦБК” на экологию озера Байкал. По данным ФГБУ “Иркутское УГМС” в 2012 г. в зоне влияния сброса сточных вод, по сравнению с фоновыми станциями, большинство максимальных

значений химических показателей было превышено в 3 раза. Наблюдались нарушения качества воды, в которой максимальное содержание минеральных веществ и сульфатов превышали нормы в 1.2 раза, взвешенных веществ в 5.3 раза, хлоридов в 3.5 раза, фенолов – в 4 раза. Так же были детектированы превышения ПДК по меди в 9.7 раза, свинца, кадмия – в 1.2 раза, марганца – в 3.1 раза, алюминия – в 1.5 раза, бериллия – в 1.3 раза, ртути – в 2 раза. Содержание никеля и ванадия находилось на уровне ПДК (Гос. доклад ..., 2013).

По гидрохимической оценке ФГБУ “Иркутское УГМС” района Култук – Слюдянка уровни наблюдаемых веществ в 2011 г. не превышали допустимых норм, однако по сравнению с предыдущим обследованием (2008 г.) увеличилось содержание кремния, азота нитратного и хлоридов в 1.1 раза. Среднее содержание фосфатов, сульфатов и минеральных веществ, по сравнению с предыдущим обследованием, не изменилось (Гос. доклад ..., 2012).

Согласно данным, полученным сотрудниками лаборатории гидрохимии и химии атмосферы ЛИН СО РАН, в Листвянке в августе 2011 г. отмечены следующие гидрохимические показатели: мг Si/л – 1.166; мг NH₄/л – 0.425; мг NO₂/л – 0.137; мг PO₄/л – 0.204; мг NO₃/л – 0.298 (Кравцова и соавт., 2012).

По результатам исследований той же лаборатории в районе п. Большие Коты были получены данные за 2012 г., на основании которых превышения ПДК не выявлены, и значения химических показателей, по сравнению с районом п. Листвянка, были ниже (мг Si/л – 0.51; мг NH₄/л – 0.020; мг NO₂/л – 0.002; мг PO₄/л – 0.006; мг NO₃/л – 0.11; мг O/л – 0.69).

Цель работы – изучить количественный состав различных культивируемых физиолого-биохимических групп микроорганизмов сообществ эпиплитических биопленок литорали озера Байкал, формирующихся в районах с различной антропогенной нагрузкой и оценить их роль в процессе самоочищения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Отбор проб. В ходе экспедиционных работ в литоральной зоне южного Байкала с 14 по 17 августа 2012 г. на научно-исследовательском судне “Г. Титов” (ЛИН СО РАН) группой водолазных исследований под руководством И.В. Ханаева со дна были подняты природные камни (41 образец с 8 трансект). В зависимости от экологических условий, исследовали районы с различным антропогенным влиянием – напротив Байкальского целлюлозно-бумажного комбината (БЦБК) (26 проб, 5 трансект S1–6, S12–21, S27–36), на-

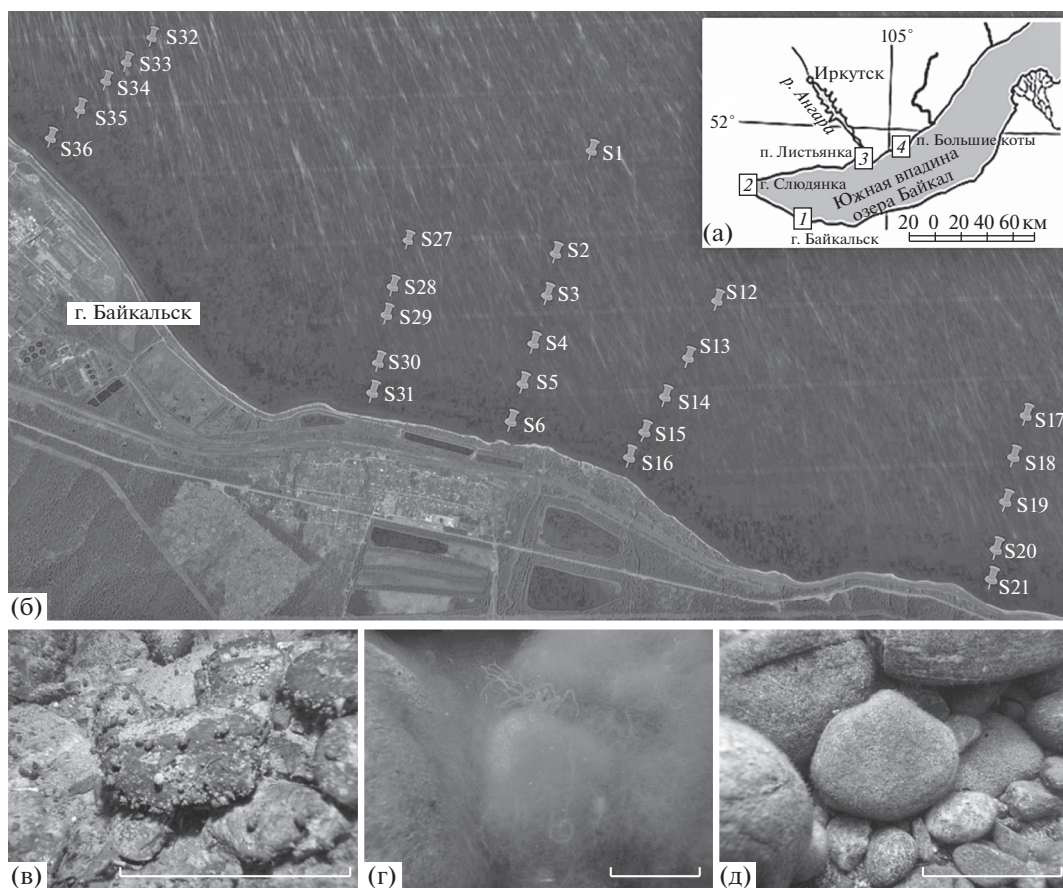


Рис. 1. Схема отбора проб эпилитических биопленок: а – схема расположения районов отбора в Южном Байкале (1 – напротив БЦБК; 2 – напротив г. Слюдянка; 3 – напротив п. Листвянка; 4 – напротив п. Б. Коты); б – схема отбора проб биопленок в районе БЦБК (S – наименование станций); каменные субстраты с биопленками отобранные на станциях S1 (в), S4 (г) и S53 (д), фото Ханаева И.В. Масштабная метка – 10 см.

против г. Слюдянка (5 проб, 1 трансекта S40–S44), напротив п. Листвянка (5 проб, 1 трансекта S45–S49) и фоновый район напротив п. Большие Коты (5 проб, 1 трансекта S50–S54) (рис. 1а) с минимальной непостоянной антропогенной нагрузкой. Пробы в районе БЦБК отбирали по схеме, представленной на рис. 1б, центральная трансекта S1–S6 ориентирована на трубу от БЦБК, трансекта S12–S16 – от центральной на восток 1 км, S17–S21 – 3 км, трансекта S27–S31 – от центральной на запад 1 км, S32–S36 – 3 км. Пробы биопленок на природных каменных субстратах каждой трансекты отбирали по глубинам 0.5, 1, 3, 5 и 10 м. Исключение составила станция S1, где отбор каменного субстрата осуществляли в районе выхода трубы БЦБК на глубине 32.5 м.

Описание биопленок. В районе БЦБК все дно, в том числе и каменные субстраты, покрыты большим количеством зеленых водорослей, за исключением станции S1 (рис. 1в). Биопленки района БЦБК характеризовались наибольшей толщиной, которая составляла около 1 мм и имела зелено-коричневый цвет (рис. 1г), а в районе

г. Слюдянка биопленки толщиной до 0.5 мм имели серо-черную окраску. Район п. Листвянки характеризовался наличием зеленых водорослей, но в меньшем количестве, чем в районе БЦБК. Биопленки, отобранные в районе п. Листвянка, были толщиной до 0.5 мм и имели зелено-песочную окраску, а биопленки, отобранные в районе п. Б. Коты, имели беловато-песочную окраску и толщину до 0.25 мм (рис. 1д).

Культивирование микроорганизмов. В асептических условиях с поверхности каждого каменного субстрата скальпелем соскребали 4 см² биопленки и суспендировали в колбе со 100 мл стерильной байкальской воды, затем в течение 30 мин встряхивали на орбитальном шейкере OS-10 (“Bio-San”) со скоростью 150 об./мин. После этого суспензии давали отстояться 5 мин и использовали ее для разведения 10⁻² (1 мл суспензии в колбу с 99 мл стерильной байкальской воды) и посевов.

Культивировали следующие группы микроорганизмов: органотрофы – на среде РПА:10 (Горбенко, Дзюбан, 1992); фенолоксиляющие – на

минеральной среде Егоровой (Руководство по методам гидробиологического анализа..., 1983); нефтеокисляющие – на среде Раймонда (Raymond, 1961) с добавлением сырой нефти (“Ангарский нефтехимический завод”) на поверхность агаризованной среды; дрожжи – на среде Сабуро (Нетрусов, 2005); плесневые грибы – на среде Чапека (Кузнецов, Романенко, 1963); амилोलитики – на крахмальном агаре (Родина, 1965); целлюлозо-разрушающие микроорганизмы (среда Гетчинсона для аэробов, Омелянского для анаэробов) (Кузнецов, Романенко, 1963).

В рамках цикла фосфора были определены две группы микроорганизмов. Первая группа включала в себя фосфатрастворяющие микроорганизмы (ФРМ), способные переводить минеральные нерастворимые соединения фосфора в растворимое состояние. Вторая – фосфатмобилизирующие микроорганизмы (ФММ), разлагающие органические соединения фосфора с освобождением растворимых фосфатов.

ФММ определяли на картофельно-минеральном агаре (Родина, 1965). ФРМ учитывали на основной среде следующего состава (г/л): дрожжевой экстракт – 0.2; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0.5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.1; KCl – 0.2; глюкоза – 10; агар – 15 и растворы: 10% CaCl_2 – 60 мл, 10% K_2HPO_4 – 40 мл. Готовили основную среду и растворы в отдельных емкостях, перед посевом в разогретую основную среду вносили в начале раствор хлорида кальция, а затем дигидрофосфата калия.

Так же в пробах биопленок определяли санитарно-показательные микроорганизмы: общее число микроорганизмов (ОМЧ, при 37°C), общие колиформные бактерии (ОКБ), энтерококки, споры сульфитредуцирующих клостридий (МУК 4.2.1884-04). ОКБ является чувствительным показателем при выявлении источника фекального загрязнения. Показатель ОМЧ – это количественный показатель, отражающий общее содержание мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов. Соотношение значений показателя ОМЧ, определенных при температурах 22 и 37°C – коэффициент самоочищения (К) – позволяет оценить активность и состояние процессов самоочищения природных водоемов. Количество ОМЧ при 37°C позволяет оценить число аллохтонной микрофлоры (внесенной в водоем в результате антропогенного загрязнения, в т.ч. и фекального), количество ОМЧ при 22°C – автохтонной микрофлоры (типичной для конкретной экосистемы). Эта разница более выражена при завершении процесса самоочищения (К равен 4 и выше).

Посевы суспензий и разведений осуществляли в двух повторностях.

Статистический анализ данных проводили в программе R-Studio 3.3.1 (<https://cran.r-project.org/>

bin/windows/base/old/3.1.1/). Для определения достоверных различий между выборками использовали тест Манна–Уитни–Вилкоксона. Уровень значимости – 0.05. Для выявления зависимости между признаками применяли коэффициент корреляции Пирсона.

В качестве доверительного интервала приведены значения стандартной ошибки среднего при уровне значимости 0.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В круговороте углерода принимают участие микроорганизмы различных физиологических и эколого-трофических групп. Разложение легко растворимого органического вещества осуществляется органотрофными микроорганизмами, определение которых в озере Байкал осуществляется на рыбопептонном агаре, разбавленном в 10 раз. По результатам исследований показано, что в районах значительного антропогенного влияния число органотрофных микроорганизмов на порядок выше, чем в фоновом районе п. Б. Коты (тыс. КОЕ/см²): в районе БЦБК в среднем по всем 5 трансектам – 630.6 ± 79.4 , п. Листвянка – 430.2 ± 188.6 , г. Слюдянка – 220.5 ± 39.6 , п. Б. Коты – 33.8 ± 12.8 (рис. 2а). Следовательно, легко растворимого органического вещества было больше в биопленках, подверженных антропогенной нагрузке в районах БЦБК, г. Слюдянка, Лиственичного залива, чем в биопленках района п. Б. Коты.

Также в эпилитических биопленках из района БЦБК выявлена высокая численность микроорганизмов, обладающих амилолитической активностью, с максимальной численностью в биопленках на станции S1 в месте выхода трубы – 74.8 тыс. КОЕ/см². В среднем по трансекте около трубы количество амилолитиков (тыс. КОЕ/см²) составило 38.1 ± 7.7 , восточнее трубы – 13.9 ± 1.3 , западнее – $21.2 \pm 3.$, возле п. Б. Коты – 5.7 ± 1.1 (рис. 2б).

Наличие нерастворимых неорганических фосфатов свидетельствует об антропогенном воздействии на водоем. Индикаторами таких соединений являются ФРМ. В биопленках района БЦБК по трансекте S1–S6 средняя численность ФРМ составила 316 ± 0.3 КОЕ/см²; на расстоянии 1 км, как к востоку, так и к западу, численность была выше и составила по трансекте S12–S16 820 ± 177 КОЕ/см², S27–S31 790 ± 276 КОЕ/см², а на расстоянии 3 км на трансекте S17–S21 3200 ± 1153 КОЕ/см², S32–S36 4820 ± 1434 КОЕ/см². В районах г. Слюдянка и п. Листвянка численность ФРМ равна 1114 ± 490 и 1626 ± 484 КОЕ/см² соответственно. В фоновом районе п. Б. Коты средняя численность ФРМ составила 76 ± 24 КОЕ/см². Согласно полученным результатам по численности ФРМ показано, что район п. Б. Коты меньше всего подвер-

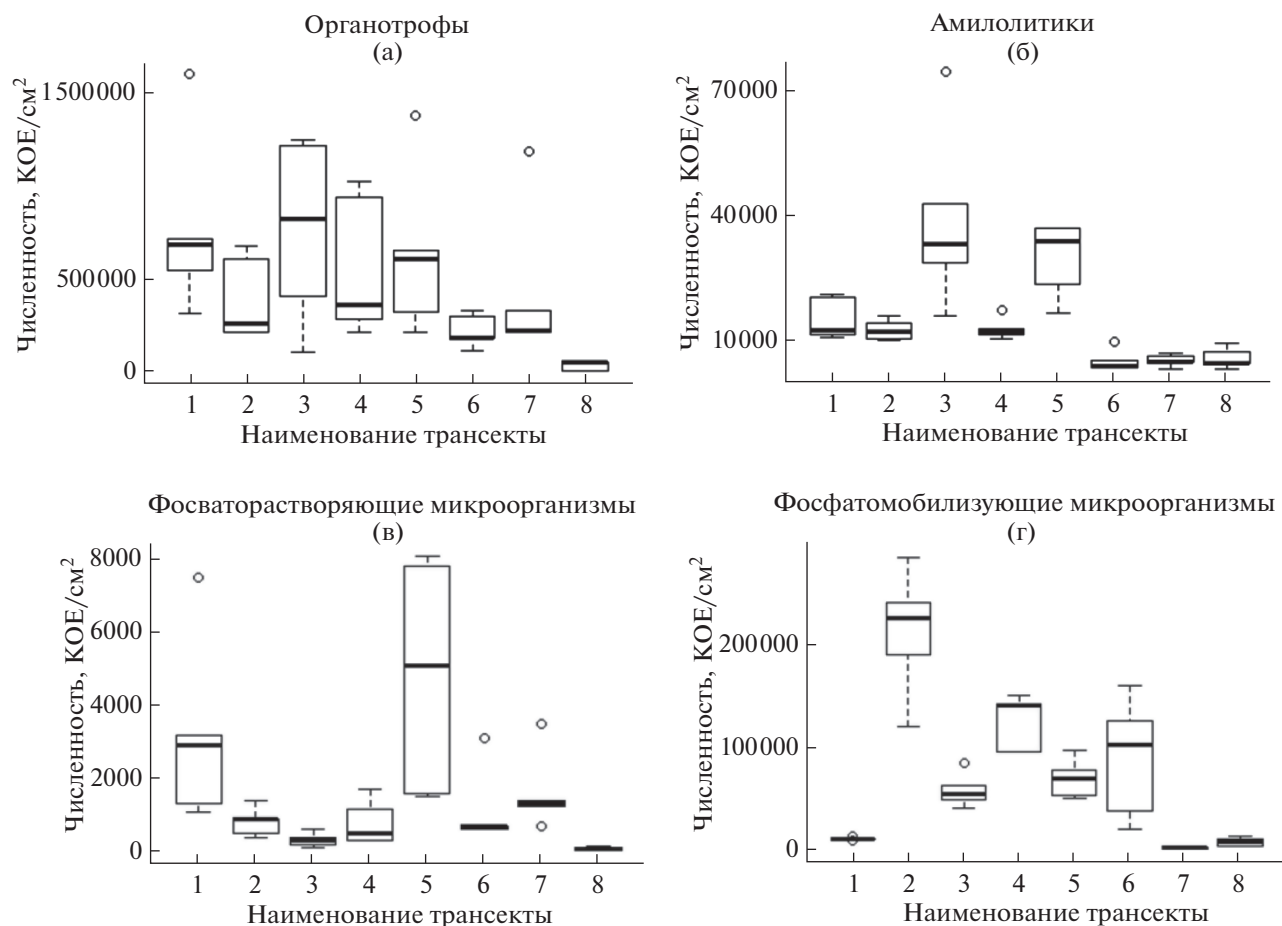


Рис. 2. Численность органотрофных (а), амилотических (б), фосфатрастворяющих (ФРМ) (в) и фосфатмобилизующих (ФММ) (г) микроорганизмов в эпиплитических биопленках оз. Байкал, КОЕ/см². 1–8 наименование трансект (1 – БЦБК S17–21; 2 – БЦБК S12–16; 3 – БЦБК S1–6; 4 – БЦБК S27–31; 5 – БЦБК S32–36; 6 – г. Слюдянка S40–44; 7 – п. Листвянка, БЦБК S45–49; 8 – п. Б. Коты S50–54).

жен загрязнению неорганическими фосфатами, которые являются одним из компонентов хозяйственно-бытовых отходов. Максимальные значения численности данной группы микроорганизмов детектировали в биопленках района БЦБК на расстоянии 3 км от трубы (рис. 2в). Сравнивая численность ФРМ биопленок с количеством фосфатов в воде двух районов п. Листвянка и Б. Коты, выявлена прямая корреляционная зависимость. Чем выше концентрация фосфатов в воде, тем выше численность ФРМ в биопленках. Для выявления зависимости между признаками применяли коэффициент корреляции Пирсона, который был равен 0.75, при уровне значимости 0.01.

Очевидно, что органического фосфора в биопленках больше, чем неорганического, и подтверждением этому является более высокая численность ФММ, чем ФРМ (рис. 2в, 2г). Число ФММ превышает ФРМ до двух порядков. Исключением явились показатели станции п. Листвянка с минимальной численностью ФММ 1940 ± 503 КОЕ/см²,

что близко к численности ФРМ (1626 ± 484 КОЕ/см²). Максимальные значения регистрировали на станциях БЦБК S12–S16 (212.6 ± 27.6 тыс. КОЕ/см²) и S27–S31 (124.5 ± 12.1 тыс. КОЕ/см²) (рис. 2г).

С целью контроля наличия в биопленках микроорганизмов, способных окислять ароматические и сложные углеводородные соединения, была определена численность фенол- и нефтеокисляющих микроорганизмов. В результате проведенных исследований показано, что процент встречаемости данных групп микроорганизмов в эпиплитических биопленках равен 100. Суммарно численность фенолоокисляющих микроорганизмов в два раза выше, чем нефтеокисляющих. В эпиплитических биопленках максимальная численность фенолоокисляющих микроорганизмов детектирована на станциях БЦБК S12–S16 в 1 км к востоку от трубы – 15.68 ± 2.4 тыс. КОЕ/см², на станциях г. Слюдянка – 10.4 ± 1.9 тыс. КОЕ/см², в п. Листвянка – 8.8 ± 1.2 тыс. КОЕ/см² (рис. 3а).

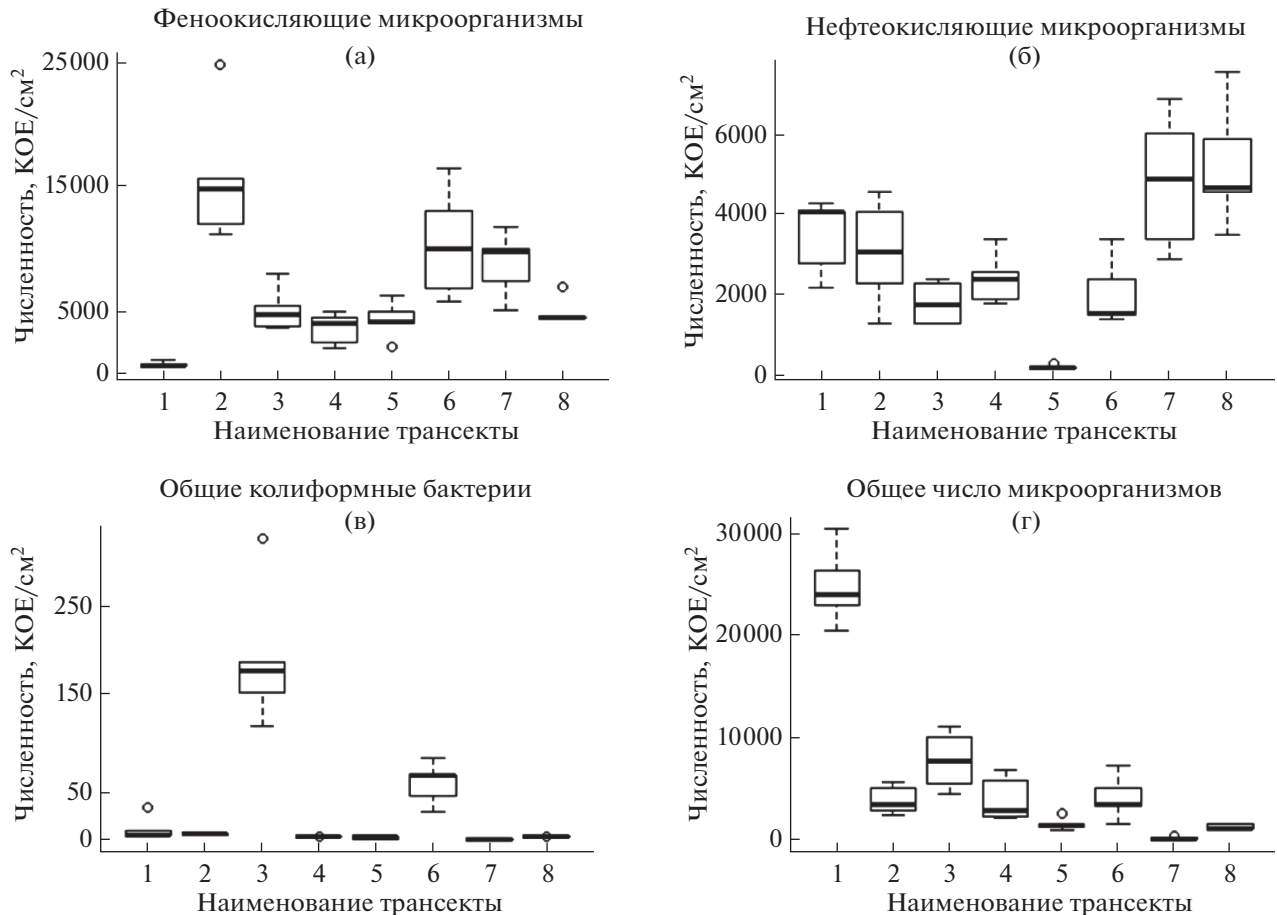


Рис. 3. Численность фенолоксиляющих (а), нефтеоксиляющих (б) микроорганизмов, общих колиформных бактерий (ОКБ), (в) общего числа микроорганизмов (ОМЧ) (г) в эпилимнитических биопленках оз. Байкал, КОЕ/см². 1–8 наименование трансект (1 – БЦБК S17–21; 2 – БЦБК S12–16; 3 – БЦБК S1–6; 4 – БЦБК S27–31; 5 – БЦБК S32–36; 6 – г. Слюдянка S40–44; 7 – п. Листвянка, БЦБК S45–49; 8 – п. Б. Коты S50–54).

Количество нефтеоксиляющих микроорганизмов (КОЕ/см²) в биопленках района трубы БЦБК достигало 1800 ± 193 , восточнее – 3300 ± 531 , западнее – 1300 ± 392 , максимум обнаружен в районе п. Б. Коты (5260 ± 698) и п. Листвянка (4826 ± 758), повышенные значения наблюдали также около г. Слюдянка (2046 ± 383) (рис. 3б). Высокая численность данной группы микроорганизмов обусловлена высокой нагрузкой данных районов водным видом транспорта. Листвянка является небольшим портовым поселком, с хорошо развитой туристической водной инфраструктурой, а для п. Б. Коты – это единственный вид транспорта.

Мониторинг фенол- и нефтеоксиляющих микроорганизмов в районе БЦБК осуществляет ФГБУ «Иркутское управление по гидрометеорологии и мониторингу окружающей среды», которое определяет их численность в планктоне и в донных отложениях. По результатам, представленным в государственных докладах ФГБУ «Ир-

кутское УГМС», в отличие от полученных нами, численность в воде и донных осадках фенолоксиляющих микроорганизмов меньше, чем нефтеоксиляющих, с процентом встречаемости в бентосе фенолоксиляющих – 52.5% и нефтеоксиляющих микроорганизмов – 80.25%. Численность фенолоксиляющих колеблется от 0 до 14.3 тыс. КОЕ/г вл. ила за последние 6 лет, что коррелирует с полученными результатами в нашей работе, а численность нефтеоксиляющих – от 0 до 10^6 кл./г вл. ила, что на два порядка выше представленных в этой статье. Вероятнее всего, такие различия в численности нефтеоксиляющих микроорганизмов связаны с различиями методов определения (Гос. доклад..., 2011, 2012, 2013, 2015, 2016, 2017). Надо отметить, что высокий процент встречаемости данных групп микроорганизмов в эпилимнитических биопленках указывает на более активное микробное сообщество, чем в воде и в бентосе.

Качественный анализ на наличие аэробных и анаэробных целлюлозоразрушающих микроорга-

низмов в исследуемых образцах биопленок показал, что аэробные целлюлозоразрушающие микроорганизмы детектируются повсеместно в районе БЦБК и г. Слюдянка, а в Ливенничном заливе и п. Б. Коты – в 80% проб. Мониторинг данной группы микроорганизмов в районе БЦБК осуществляет ФГБУ “Иркутское УГМС”, которое определяет наличие их в планктоне и в донных отложениях. В донных осадках процент встречаемости колеблется от 52 до 100% со средним значением 84%, в зависимости от сезона и года (так, в октябре 2012 г. их доля составила 78%) (Гос. доклад..., 2011, 2012, 2013, 2015, 2016, 2017). Полученные данные так же указывают на более высокую активность микробного сообщества эпиплитических биопленок в районе БЦБК. Анаэробные целлюлозоразрушающие микроорганизмы в районе БЦБК обнаружены в 65% станций, на трансектах западнее трубы они выявлены на 50% станций, на трансекте напротив г. Слюдянка все биопленки содержали анаэробов, напротив п. Ливенничного залива – в трех, а напротив п. Б. Коты – в четырех.

Эукариотические группы микроорганизмов – дрожжи и грибы – в эпиплитических биопленках самые малочисленные и редко встречаемые, по результатам настоящей работы. Дрожжи в количестве от 50 до 100 КОЕ/см² обнаружены только в районе г. Слюдянка (3 станции). По литературным данным дрожжи и в водной толще определяли в незначительном количестве (от 0 до 2 тыс. кл./л); авторы отмечали, что в районах, подверженных антропогенному воздействию, их численность выше, а разнообразие меньше (Максимова и соавт., 1982, Колесницкая, Максимова, 1982). Микроскопические грибы детектировали в биопленках на 14 из 41 станции, как около БЦБК, так и возле населенных пунктов, при этом отмечено увеличение их численности западнее трубы БЦБК. Напротив п. Б. Коты грибы не обнаружены, что указывает на меньшую активность деструкционных процессов органического вещества в биопленках из данного района.

Анализируя результаты по исследованию санитарных показателей, таких как ОКБ, ОМЧ, энтерококки и клостридии, можно дать дополнительную оценку степени загрязнения свежим фекальными стоками исследуемых районов. По результатам проведенной работы надо отметить, что бактерии родов *Enterococcus* и *Clostridium* не детектировали ни в одной из исследуемых проб биопленок.

Общие колиформные бактерии обнаружены в 58% всех исследуемых проб биопленок. Максимальная численность ОКБ была в биопленках трансекты напротив трубы БЦБК, где она составила 193 ± 28 КОЕ/см², напротив г. Слюдянка – 61 ± 10 КОЕ/см², в остальных биопленках чис-

ленность в среднем составила 5.48 КОЕ/см², а в пробах напротив п. Ливенничного залива ОКБ не обнаружены (рис. 3в). Так же в биопленках напротив п. Ливенничного залива общая численность аллохтонной микрофлоры (ОМЧ при 37°C) была минимальной и составила 160 ± 66 КОЕ/см², а максимальную численность детектировали в биопленках на трансекте в 3 км от трубы к востоку (24860 ± 1689 КОЕ/см²). Напротив трубы численность была равна 7720 ± 1078 КОЕ/см², на расстоянии 1 км от трубы средняя численность составила 3920 ± 804 КОЕ/см², в биопленках трансекты напротив г. Слюдянка – 4120 ± 960 КОЕ/см², в районе п. Б. Коты – 1280 ± 111 КОЕ/см² (рис. 3г).

По результатам санитарно-микробиологического анализа в эпиплитических биопленках большую фекальную антропогенную нагрузку имеет район напротив трубы БЦБК и г. Слюдянка. Тем не менее, высокий коэффициент самоочищения во всех исследуемых биопленках позволяет сделать вывод о завершенности процессов самоочищения.

Таким образом, результаты комплексного эколого-микробиологического изучения биопленок каменистых субстратов в литоральной зоне Южного Байкала (август 2012 г.), отобранные в районах с различной антропогенной нагрузкой, выявили различия количественного и качественного состава исследуемых физиолого-биохимических групп микроорганизмов. Показано, что в эпиплитических биопленках района БЦБК определена высокая численность всех исследуемых групп микроорганизмов, за исключением нефтеокисляющих. Районы населенных пунктов г. Слюдянка и Ливенничного залива так же характеризуются высокой численностью исследуемых групп микроорганизмов в эпиплитических биопленках и максимальными значениями численности нефтеокисляющих микроорганизмов, что может быть связано с высокой нагрузкой данных районов водным видом транспорта.

Высокий процент встречаемости (100%) целлюлозоразрушающих, фенол- и нефтеокисляющих микроорганизмов в биопленках, по сравнению с водой и бентосом, указывает на более высокую активность микробного сообщества эпиплитических биопленок в районе БЦБК (Гос. доклад..., 2011, 2012, 2013, 2015, 2016, 2017).

В эпиплитических биопленках фонового района п. Б. Коты отмечена минимальная численность органотрофных микроорганизмов и ФРМ, а также отсутствие плесневых грибов и дрожжей, что указывает на меньшую активность процессов разложения.

Результаты санитарно-микробиологического анализа эпиплитических биопленок показали, что большую фекальную антропогенную нагрузку

имеет район БЦБК напротив трубы и г. Слюдянка.

Высокая численность исследуемых групп микроорганизмов в районах БЦБК, г. Слюдянка, п. Листвянка свидетельствует о значительной деструкционной активности культивируемого микробного сообщества эпилитических биопленок в ироответ на большую антропогенную нагрузку в данных местах. Загрязнение водоемов сточными водами и отходами промышленных предприятий обуславливает активное размножение органотрофных микроорганизмов, которые расщепляют сложные органические соединения до простых минеральных. Таким образом, необходимо отметить основную роль микроорганизмов в самоочищении и удалении растворимых веществ в прдных водоемах. Исследуемые группы микроорганизмов эпилитических биопленок так же можно считать индикаторными, т.к. они реагируют на поступления загрязнений различного характера (Кондратьева и соавт. 2013).

Работа выполнена в рамках государственного задания по теме № 0345-2016-0003 (AAAA-A16-116122110061-6) “Микробные и вирусные сообщества в биопленках ...”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Государственный доклад о состоянии и об охране окружающей среды Иркутский области в 2010 году. Иркутск. 2011. С. 251–252.
- Государственный доклад о состоянии и об охране окружающей среды Иркутский области в 2011 году. Иркутск. 2012. С. 277–278.
- Государственный доклад о состоянии и об охране окружающей среды Иркутский области в 2012 году. Иркутск. 2013. С. 240–244.
- Государственный доклад о состоянии и об охране окружающей среды Иркутский области в 2014 году. Иркутск. 2015. С. 213–214.
- Государственный доклад о состоянии и об охране окружающей среды Иркутский области в 2015 году. Иркутск. 2016. С. 206–207.
- Государственный доклад о состоянии и об охране окружающей среды Иркутский области в 2016 году. Иркутск. 2017. С. 168–169.
- Горбенко А.Ю., Дзюбан А.Н. О возможности количественного учета олигокарбофильного (олиготрофного) бактериопланктона на богатой питательной среде // Микробиология. 1992. Т. 61. № 3. С. 531–532.
- Колесницкая Г.Н., Максимова Э.А. Видовой состав дрожжей в водах южного Байкала // Микробиология. 1982. Т. 51. № 3. С. 501–505.
- Кондратьева Л.М., Литвиненко З.Н., Морозова О.Ю. Роль биопленок в трансформации гидрофобных ароматических углеводородов // Вода: химия и экология. 2013. № 5. С. 51–58.
- Константинов А. С. Общая гидробиология: Учебник для студентов биол. спец. вузов. – 4-е изд. перераб. и доп. – М.: Высшая школа, 1986. 472 с.
- Кравцова Л.С., Ижболдина Л.А., Ханаев И.В., Помазкина Г.В., Домышева В.М., Кравченко О.С., Грачев М.А. Нарушение вертикальной зональности зеленых водорослей в открытом Лиственничном заливе озера Байкал, как следствие локального антропогенного воздействия // Доклады Академии наук (Общая биология). 2012. Т. 447. № 2. С. 227–229.
- Kravtsova L.S., Izhboldina L.A., Khanaev I.V., Pomazkina G.V., Domysheva V.M., Kravchenko O.S., and Grachev M.A. Disturbances of the vertical zoning of green algae in the coastal part of the Listvennichnyi gulf of lake Baikal // Dokl. Biol. Sci. V. 447. P. 350–353.
- Кузнецов С.И., Романенко В.И. Микробиологическое изучение внутренних водоемов. М.: АН СССР, 1963. 130 с.
- Максимова Э.А., Максимов В.Н., Колесницкая Г.Н. Количество дрожжей в воде Южного Байкала в течение года // Микробиология. 1982. Т. 51. № 5. С. 860–865.
- Мальник В.В. Микробное сообщество биопленок на поверхности раздела фаз “вода–твердое тело” литоральной зоны оз. Байкал. Автореферат дис. ... канд. биол. наук. 23.04.2010. Улан-Удэ: БГУ. 24 с.
- Мальник В.В., Парфенова В.В., Сутурин А.Н., Тимошкин О.А., Павловская Н.С. Характеристика сообществ микроорганизмов из оз. Байкал, развивающихся на стальной пластине и в природной воде // Сиб. экол. журн. 2013. № 6. С. 769–777.
- Malnik V.V., Parfenova V.V., Suturin F.N., Timochkin O.A., Pavlovskaya N.S. Description of the Lake Baikal microorganism communities growing on a steel plate and in the natural water surrounding this substratum // Contemporary Problems of Ecology. 2013. V. 6. P. 583–586.
- Мирошниченко Е.С. Бактериоценозы эпилитона литорали Южного и Среднего Кольского залива Баренцева моря. Автореферат дис. ... канд. биол. наук. 19.05.2016. М.: МГУ. 23 с.
- Нетрусов А.И. Практикум по микробиологии. М.: ИЦ Академия, 2005. 608 с.
- Николаев Ю.А., Плакунов В.К. Биопленка – “город микробов” или аналог многоклеточного организма? // Микробиология. 2007. Т. 76. № 2. С. 149–163.
- Nikolaev Yu.A., Plakunov V.K. Biofilm – “city of microbes” or an analogue of multicellular organisms? // Microbiology (Moscow). 2007. V. 76. P. 125–138.
- Парфенова В.В., Гладких А.С., Белых О.И. Сравнительный анализ биоразнообразия бактериальных сообществ планктона и биопленки в озере Байкал // Микробиология. 2013. Т. 82. № 1. С. 94–105.
- Parfenova V.V., Gladkikh A.S., Belykh O.I. Comparative analysis of biodiversity in the planktonic and biofilm bacterial communities in Lake Baikal // Microbiology (Moscow). V. 82. P. 91–101.
- Парфенова В.В., Мальник В.В., Бойко С.М., Шевелева Н.Г., Логачева Н.Ф., Евстигнеева Т.Д., Сутурин А.Н., Тимошкин О.А. Сообщества гидробионтов, развивающиеся на поверхности раздела фаз вода–горные породы оз. Байкал // Экология. 2008. № 3. С. 211–216.
- Parfenova V.V., Mal'nik V.V., Boiko S.M., Sheveleva N.G., Logacheva N.F., Evstigneeva T.D., Suturin A.N., Timoshkin O.A. Communities of hydrobionts developing at the water–rock interface in Lake Baikal // Russian J. Ecol. 2008. V. 39. P. 198–204.

Протасов А.А. Перифитон как экотопическая группировка гидробионтов // Journal of Siberian Federal University. Biology. 2010. № 1. С. 40–56.

Родина А.Г. Методы водной микробиологии. Практическое руководство АН СССР. М., Л.: Наука, 1965. 363 с.

Руководство по методам гидробиологического анализа поверхностных вод и донных отложений. Под ред. И.С. Якорь. Л.: Финансы и статистика, 1983. 240 с.

Тимошкин О.А., Бондаренко Н.А., Волкова Е.А., Томберг И.В., Вишняков В.С., Мальник В.В. Массовое развитие зеленых нитчатых водорослей родов *Spirogyra* и *Stigeoclonium* (*Chlorophyta*) в прибрежной зоне Южного Байкала // Гидробиологический журнал. 2014. № 5. С. 15–26.

Тимошкин О.А., Мальник В.В., Сакирко М.В., Боедекер К. Экологический кризис на Байкале. Ученые ставят диагноз // Наука из первых рук. 2014. № 5. С. 74–91.

Costerton J.W., Cheng K.J., Geesey G.G., Ladd T.I., Nickel J.C., Dasgupta M., Marrie T.J. Bacterial biofilms in nature and disease // Annu. Rev. Microbiol. 1987. V. 41. P. 435–464.

Flemming H.C. Biofouling in water systems—cases, causes and countermeasures // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2002. V. 59. P. 629–640.

Sanz-Lazaro C., Fodelianakis S., Guerrero-Meseguer L., Marín A., Karakassis I. Effects of organic pollution on biological communities of marine biofilm on hard substrata // Environ. Pollut. 2015. V. 201. P. 17–25.

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

Washington V.J., Lear G., Neale M.W., Lewis G.D. Environmental effects on biofilm bacterial communities: a comparison of natural and anthropogenic factors in New Zealand streams // Freshwater Biol. 2013. V. 58. P. 2277–2286.

Role of Cultured Microorganisms from Biofilms Formed on Rocky Substrates in the Lake Baikal Self-Purification System

M. Yu. Suslova^{1,*}, O. S. Pestunova¹, E. V. Sukhanova¹, Yu. R. Shtykova¹, T. Ya. Kostornova¹
I. V. Khanaev¹, M. V. Sakirko¹, and V. V. Parfenova^{1,†}

¹*Limnological Institute, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia*

*e-mail: suslova@lin.irk.ru

Received January 31, 2018

Abstract—Differences in the quantitative and qualitative compositions of various physiological and biochemical groups of cultured microorganisms were revealed in biofilms formed on stony substrates in the littoral zone of Southern Baikal (August 2012) in the areas with different anthropogenic load. Maximal abundance of microorganisms was registered in epilithic biofilms from the area of Baikalsk Pulp and Paper Plant: organotrophs ($770.2 \pm 290.3 \times 10^3$ CFU/cm²); amylolytics ($38.1 \pm 7.7 \times 10^3$ CFU/cm²); phosphate-solubilizing microorganisms ($4.8 \pm 1.4 \times 10^3$ CFU/cm²); phosphate-mobilizing microorganisms ($212.0 \pm 27.6 \times 10^3$ CFU/cm²); phenol-oxidizing microorganisms ($15.7 \pm 2.4 \times 10^3$ CFU/cm²); molds ($3.2 \pm 0.4 \times 10^3$ CFU/cm²); and total coliform bacteria (193.3 ± 28.2 CFU/cm²), with the total microbial abundance (TMA at 37°C) of $24.9 \pm 1.7 \times 10^3$ CFU/cm², which indicated high degrading activity of the biofilms in response to the anthropogenic load in the area. Epilithic biofilms of the Bol'shie Koty area exhibited the lowest abundance of organotrophic and phosphate-solubilizing microorganisms, while molds were absent.

Keywords: Lake Baikal, epilithic biofilms, organotrophs, amylolytics, phosphate-solubilizing microorganisms, phosphate-mobilizing microorganisms, petroleum-oxidizing microorganisms, phenol-oxidizing microorganisms, cellulose-degrading microorganisms

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИ

ПЕРВЫЕ СВЕДЕНИЯ О БАКТЕРИАЛЬНОМ СООБЩЕСТВЕ
ПИЩЕВАРИТЕЛЬНОГО ТРАКТА ЭНДЕМИЧНЫХ БАЙКАЛЬСКИХ
БРЮХОНОГИХ МОЛЛЮСКОВ ВИДА *BENEDICTIA BAICALENSIS*

© 2018 г. Ю. Р. Штыкова^{а, *}, Т. Я. Ситникова^а, Н. В. Кулакова^а,
Е. В. Суханова^а, И. В. Ханаев^а, **В. В. Парфенова^а**

^аЛимнологический институт СО РАН, Иркутск, 664033, Россия

*e-mail: tulupova@lin.irk.ru

Поступила в редакцию 07.07.2017 г.

Впервые исследовано разнообразие и проведен сравнительный анализ состава микробиоты пищеварительного тракта байкальских эндемичных брюхоногих моллюсков *Benedictia baicalensis* (*Caenogastropoda*) и грунта из мест их обитания. Из содержимого желудка и кишечника моллюсков изолированы штаммы, отнесенные к 11 родам гетеротрофных бактерий: *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Bacillus*, *Staphylococcus* и *Micrococcus*. В результате молекулярно-генетического анализа суммарной ДНК в пищеварительном тракте моллюсков определены нуклеотидные последовательности генов 16S рРНК бактерий родов *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Mesorhizobium*, *Deefgea* и неидентифицированных бактерий филума *Tenericutes*. Обнаружено, что большинство выделенных штаммов способны утилизировать различные органические вещества, в том числе животного происхождения, что объясняется всеядным типом питания моллюсков *B. baicalensis*. Показано, что культивируемое бактериальное сообщество пищеварительного тракта моллюсков формируется, в основном, за счет грамотрицательных бактерий (95–97% выделенных культур), несмотря на то, что 51% штаммов, изолированных из грунта, представлены грамположительными кокковидными и спорообразующими палочковидными бактериями. Низкая частота встречаемости штаммов грамположительных бактерий в пищеварительном тракте по сравнению с донными осадками (в 5 и более раз), предполагает их использование моллюсками в качестве питательного субстрата.

Ключевые слова: брюхоногие моллюски, микробиота пищеварительного тракта, внеклеточные ферменты бактерий, оз. Байкал

DOI: 10.1134/S0026365618060150

Микроорганизмы кишечника гидробионтов играют большую роль в их жизнедеятельности. Структура микробного сообщества хорошо изучена у многих морских беспозвоночных – ракообразных, морских ежей, трепангов, олигохет и полихет, креветок, двустворчатых моллюсков (Harris, 1993; Chaston, Goodrich-Blair, 2010; Богатыренко, Бузалева, 2016). Бактериальные сообщества кишечника описаны лишь у трех видов пресноводных легочных моллюсков семейства *Planorbidae*; разнообразие микроорганизмов представлено 18 филумами (Van Norn *et al.*, 2012).

По сравнению с внешней средой, в кишечнике животных содержится больше питательных веществ, а также поддерживается относительный физический и химический гомеостаз, поэтому часть бактерий, поглощенных из среды обитания, накапливаются в кишечнике (Harris, 1993). Сходный качественный и количественный микробный состав кишечника отмечен для моллюсков и

водной среды их обитания (Syvokiene *et al.*, 2008; Gayathri *et al.*, 2011). Известно, что часть поглощенных из внешней среды бактерий являются питательным субстратом, а другие микроорганизмы способствуют усвоению разнообразной пищи, дополняя пищеварительные ферменты кишечника моллюсков (Harris, 1993; Brendelberger, 1997; Simon, 1999; Chaston, Goodrich-Blair, 2010). Моллюски, подобно млекопитающим животным, обладают собственной (резидентной) кишечной микробиотой, которая живет и размножается в их кишечнике постоянно и состоит с моллюском-хозяином в мутуалистических отношениях. Примером резидентных бактерий в кишечнике моллюсков являются анаэробные бактерии группы спирохет, специфично ассоциированные с кристаллическим столбиком растительно- и детритоядных моллюсков (Margulis, Hinkle, 2006). Кристаллический столбик находится в желудке моллюсков и содержит амилолитические ферменты, необходи-

мые для усвоения растительной пищи (Young, 1932). Ранее нами показано, что спирохеты присутствуют в кристаллическом столбике у 12 видов пресноводных брюхоногих моллюсков, в том числе у *B. baicalensis* (Sitnikova et al., 2012). В кишечнике концентрируются не только автохтонные микроорганизмы водоема, но и различные аллохтонные условно-патогенные микроорганизмы, попадающие в водоем в результате антропогенной деятельности. Известно, что в кишечнике морских двустворчатых накапливаются бактерии рода *Vibrio* (Parvathi, 2004). Имеются данные о присутствии в кишечнике моллюсков таких патогенов, как сальмонеллы, ботулоклостридии, листерии, микоплазмы (Sayler et al., 1976; Marsollier et al., 2004), а также антибиотико-резистентные штаммы колиформных бактерий (Watkinson et al., 2007). Некоторые исследователи рассматривают микробиоту кишечника моллюсков как индикатор загрязнения водоема (Syvokiene, Mickeniene, 2002; Syvokiene et al., 2008). Изучение адаптивных возможностей условно-патогенных микроорганизмов в составе микробных сообществ кишечника гидробионтов имеет большое значение при исследованиях функционирования водных экосистем.

Брюхоногие моллюски одни из постоянных и многочисленных компонентов биоценоза озера Байкал. По способу потребления пищи среди байкальских эндемичных видов гастропод (~110 видов) существуют фильтраторы, собиратели и пасущиеся на субстрате моллюски, поедающие, главным образом, растительную пищу и детрит. Согласно исследованиям состава пищевого комка среди представителей рода *Benedictia* имеются всеядные пасущиеся на субстрате виды. К ним относятся улитки вида *B. baicalensis* (Gerstfeldt) (*Caenogastropoda: Benedictiidae*), обитающие на каменистых и смешанных песчано-каменистых грунтах литорали и сублиторали озера. Кроме растительной пищи в виде планктонных и бентосных диатомовых, в составе пищевого комка этих улиток обнаружены животный детрит (останки червей, ракообразных и личинок насекомых); выяснено, что гастроподы этого вида пропускают через кишечник грунт и способны захватывать кусочки тканей мертвых рыб (Ситникова, 2004). Также ранее проводимые исследования показали, что байкальские гастроподы широко используют в пищу бактерии, заселяющие поверхность грунта и камней (Родина, 1954).

Цель работы — изучить разнообразие бактерий пищеварительного тракта эндемичных брюхоногих моллюсков *B. baicalensis* и донных осадков из мест их обитания; исследовать способность выделенных штаммов бактерий утилизировать органические соединения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Район отбора проб. Материал собран из зоны глубин 3–15 м каменисто-песчаных грунтов в зал. Лиственничный юго-западного побережья оз. Байкал (51°51'18.8" с.ш., 104°51'35.6" в.д.) с помощью легкой водолазной техники. Гидрологический режим залива характерен для литоральной зоны озера, подвергающейся более жестким, чем пелагиаль, физико-химическим условиям. Согласно результатам исследований, проведенных в период с 2003 по 2006 гг., сезонные колебания температур в районе отбора проб изменялись в диапазоне от 0.1°C в зимний период и до 19°C в летний (Тимошкин и соавт., 2009). Выраженная амплитуда суточных и сезонных колебаний температуры воды (более интенсивный прогрев и охлаждение), динамика концентрации биогенных элементов, обогащенные органическим веществом речные стоки, антропогенные загрязнения объектов, расположенных на побережье п. Листвянка, влияют на разнообразие микроорганизмов прибрежной зоны (Панасюк и соавт., 2002; Белых и соавт., 2013).

Материалом для исследования послужили содержимое кишечника байкальских эндемичных брюхоногих моллюсков *B. baicalensis* и донные осадки, собранные весной 2010 г. В период отбора проб температура воды находилась в пределах от 0.2 до 5°C. После отбора животных сразу помещали в контейнеры с байкальской водой, пробы донных осадков отбирали в стерильные емкости. Отобранный материал помещали в термосумку и доставляли в лабораторию, где проводили дальнейшие исследования.

Моллюсков вскрывали в асептических условиях “*in vivo*”. Перед вскрытием раковину животных обрабатывали 70% этиловым спиртом и прополаскивали в стерильной воде. С помощью тонких препаровальных инструментов тело моллюска извлекали из раковины и под бинокулярным микроскопом проводили разрез желудка. Содержимое желудка, объемом 50–100 мкл, извлекали дозаторной пипеткой, фрагмент прямой кишки с фекалиями вырезали тонким пинцетом.

Культивирование. Ввиду особенностей гидрологического режима и интенсивной антропогенной нагрузки в районе отбора проб, посев содержимого желудка, фекалий моллюсков и образцов грунта с места отбора проб проводили на среды с разной концентрацией органических веществ, используя различную температуру и длительность инкубации. Для выделения максимального разнообразия гетеротрофных бактерий культивирование проводили на рыбо-пептонном агаре, разведенном в 10 раз (концентрация органических веществ составила 1.6 г/л) при температуре 22°C от 5 до 10 сут, а также на среде Эндо (концентрация органических веществ составила

23 г/л) при температуре 37°C в течение 24–48 ч. Селективная среда Эндо выбрана для обнаружения бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, которые, как известно, являются обитателями желудочно-кишечного тракта и принимают активное участие в пищеварительных процессах животных и человека. Выращивание колоний бактерий отсеивали в чистые культуры. Родовую идентификацию полученных изолятов проводили с помощью изучения тинкториальных свойств, морфологии клеток и колоний, выявления способности продуцировать окислительно-восстановительные ферменты, утилизировать углеводы, спирты и азотсодержащие вещества (МУ 04-723/3; МР 3923-85; Определитель бактерий Берджи, 1997; Практикум по микробиологии, 2005; Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2005, 2009). Морфологию клеток и тинкториальные свойства исследовали с помощью световых микроскопов ИМТ-2-21 ("Olympus", Япония) и Axiostar plus ("Carl Zeiss Light Microscopy", Германия). Выделенные штаммы были собраны в коллекцию и исследованы на способность утилизировать органические субстраты, используя метод посева уколом на агаризованные питательные среды с крахмалом, обезжиренным молоком, желатином, яичным желтком и трибутирином. Учет результатов проводили по наличию вокруг колоний зон продуктов гидролиза (Практикум по микробиологии, 2005).

Молекулярно-генетический анализ. Суммарную ДНК выделяли из содержимого желудка и фекалий *B. baicalensis*, используя коммерческий набор РИБО-сорб ("АмплиСенс", Москва). Амплификацию генов 16S рРНК проводили с помощью универсальных праймеров 9f 5'-gagtttgatcctggctcag-3' и 1525r 5'-agaaggaggtgatccagcc-3' (Liesack et al., 1991). Полимеразную реакцию (ПЦР) проводили в 25 мкл реакционной смеси с помощью коммерческого набора Tergus PCR kit ("Евроген", Москва). Условия ПЦР включали: этап начальной денатурации ДНК при 95°C – 3 мин; 30 циклов амплификации: 94°C – 20 с, 50°C – 20 с, 72°C – 1.5 мин с и заключительный этап элонгации при 72°C – 15 мин. ПЦР-фрагменты клонировали в векторе рTZ57R/T, после чего проводили трансформацию компетентных клеток штамма *E. coli* DH-5 α . Полученные клоны анализировали в ПЦР с универсальными плазмидными праймерами M13F 5'-ggtgtaaaccgacggccagtg-3' и M13R 5'-gggataacaatttcacacagga-3' ("Евроген", Москва). Визуализацию ампликонов проводили в 1% агарозном геле, полученные ПЦР-фрагменты вырезали и элюировали ДНК с помощью двукратного замораживания (–20°C; 1 ч) и центрифугирования (10000 об./мин; 30 мин). Для постановки реакции секвенирования использовали набор DTCS ("Beckman Coulter", США), 10 нг ДНК и 5 пмоль праймера M13, согласно протоколу фирмы-про-

изводителя. Нуклеотидные последовательности библиотеки гена 16S рРНК определяли с помощью автоматического секвенатора SEQ-8800 ("Beckman Coulter", США; ЦКП ЛИН СО РАН "Ультрамикрoанализ"). Выравнивание полученных нуклеотидных последовательностей проводили с помощью программы BioEdit 7.0.9.0. Выбор филогенетической модели и филогенетический анализ проводили в программе MEGA 6 (Tamura et al., 2013), используя метод ML. Будстреп-анализ был рассчитан на 1000 реплик. Нуклеотидные последовательности гена 16S рРНК депонированы в международную базу данных GenBank с номерами доступа KY048448–KY048453.

Сравнение частоты встречаемости штаммов, выделенных из пищеварительного тракта моллюсков и донных осадков, проведено с использованием критерия Хи-квадрат Пирсона. При уровне значимости ≤ 0.01 различия приняты за статистически достоверные.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Разнообразие микробного сообщества пищеварительного тракта моллюсков и среды их обитания. В результате проведенных исследований получено 165 штаммов из содержимого желудка, 185 – из фекалий, 148 – из донных осадков. Выделенные штаммы были разделены на три условных группы: неферментирующие аэробные грамотрицательные бактерии (НГОБ), ферментирующие факультативно-анаэробные грамотрицательные бактерии семейства *Enterobacteriaceae* (энтеробактерии) и грамположительные бактерии (ГПБ) – кокки и спорообразующие палочки. В донных осадках идентифицированы штаммы 12 родов.

Группа НГОБ составила более половины выделенных штаммов из содержимого желудка (64%) и фекалий (59%) моллюсков. Доля энтеробактерий была в 2 раза ниже (30% в содержимом желудка и 38% в фекалиях). Штаммы группы ГПБ встречаются в единичном количестве (6% в содержимом желудка и 3% в фекалиях).

В донных осадках, напротив, преобладала группа ГПБ (51%). Встречаемость группы НГОБ и кишечных бактерий составила 38 и 11% соответственно (рис. 1).

В группе НГОБ определены штаммы родов *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium* и *Alcaligenes*, из них штаммы рода *Pseudomonas* составили наибольшую долю встречаемости от всех культивированных гетеротрофов – 50.9% в содержимом желудка, 43.2% в фекалиях моллюсков и 24.3% в донных осадках (табл. 1).

Штаммы семейства *Enterobacteriaceae* представлены родами *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter* и *Klebsiella*. Среди кишечной микрофлоры моллюсков доминировал род *Enterobacter* с частотой

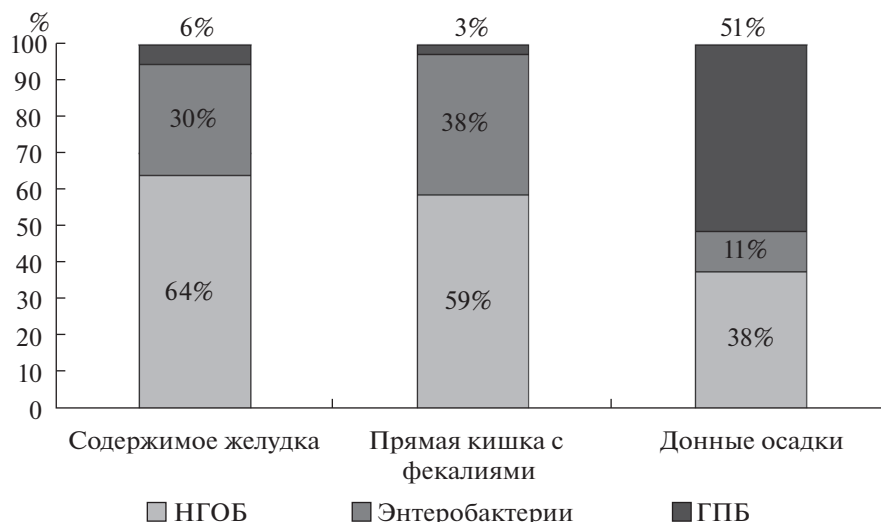


Рис. 1. Встречаемость штаммов групп НГОБ, ГПБ и энтеробактерий, выделенных из содержимого желудка, прямой кишки с фекалиями гастропод *B. baicalensis* и донных осадков из мест сбора.

той встречаемости 17.6% в содержимом желудка и 16.8% в фекалиях. Бактерии рода *Escherichia* в фекальной микробиоте моллюсков имели встречаемость почти в 3 раза больше, чем в желудочной (13.5 против 4.2%). В донных осадках штаммы кишечных бактерий представлены в единичном количестве (табл. 1).

Группу ГПБ составили штаммы родов *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* и *Micrococcus*. В пищеварительном тракте моллюсков данные штаммы отмечены в единичных количествах, некоторые из них вовсе отсутствовали (например, *Streptococcus*). В донных осадках частота встречаемости бактерий рода *Bacillus* достигала 28.4%, а кокков

Таблица 1. Разнообразие и частота встречаемости штаммов бактерий, выделенных из пищеварительного тракта *B. baicalensis* и донных осадков

Группа	Род	Содержимое желудка		Прямая кишка с фекалиями		Донные осадки	
		число штаммов	частота встречаемости, %	число штаммов	частота встречаемости, %	число штаммов	частота встречаемости, %
НГОБ	<i>Pseudomonas</i>	84	50.9	80	43.2	36	24.3
	<i>Acinetobacter</i>	7	4.2	13	7.0	10	6.8
	<i>Alcaligenes</i>	0	0	5	2.7	2	1.4
	<i>Flavobacterium</i>	15	9.1	11	5.9	8	5.4
Энтеробактерии	<i>Escherichia</i>	7	4.2	25	13.5	1	0.7
	<i>Citrobacter</i>	3	1.8	5	2.7	2	1.4
	<i>Enterobacter</i>	29	17.6	31	16.8	4	2.7
	<i>Klebsiella</i>	11	6.7	10	5.4	9	6.1
ГПБ	<i>Bacillus</i>	4	2.4	1	0.5	42	28.4
	<i>Staphylococcus</i>	5	3.0	2	1.1	15	10.1
	<i>Streptococcus</i>	0	0	0	0	2	1.4
	<i>Micrococcus</i>	0	0	2	1.1	17	11.5
Всего		165	100	185	100	148	100

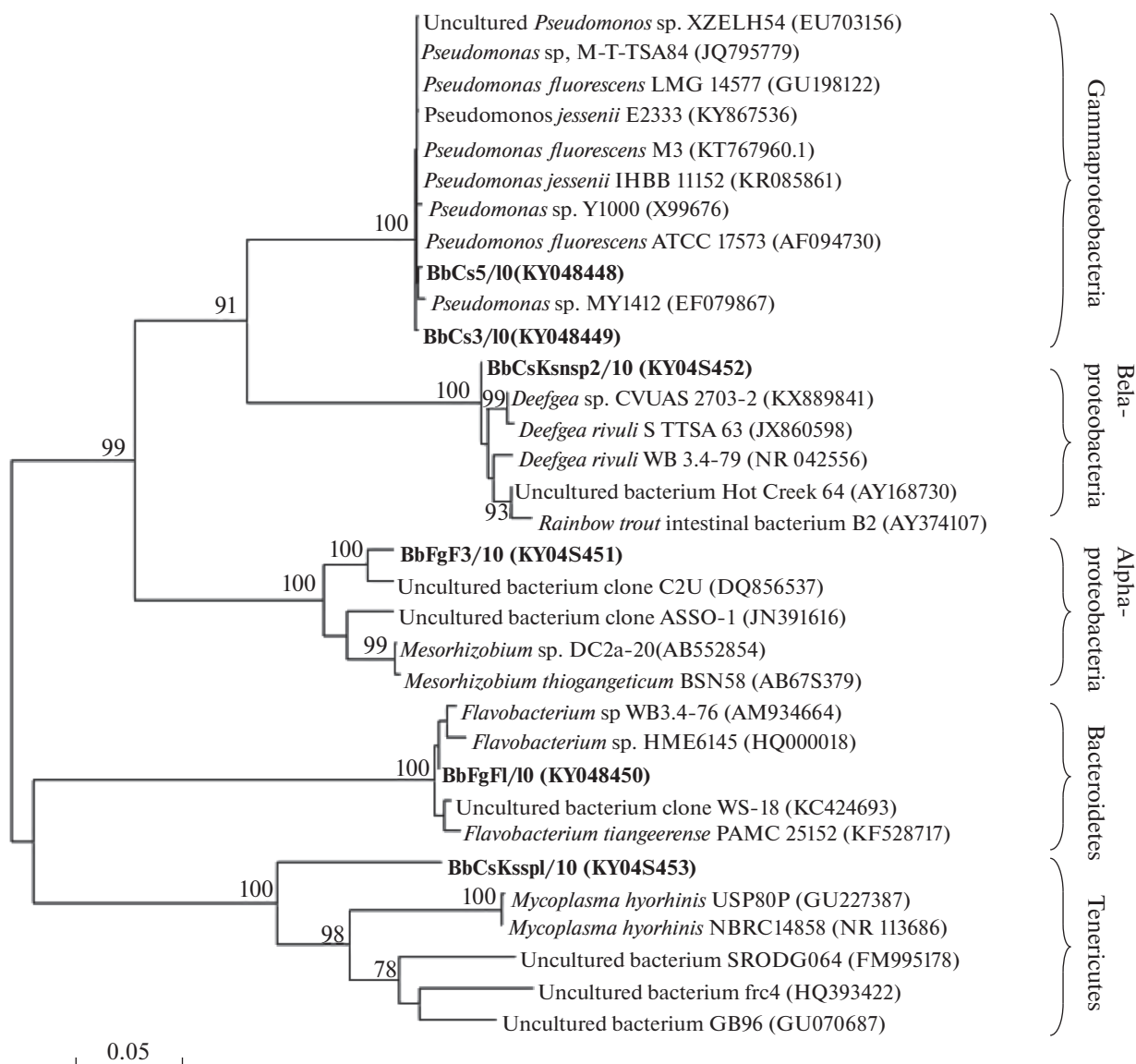


Рис. 2. Филогенетическое дерево, построенное на основе сравнения последовательностей гена 16S рДНК длиной 1148 п.н. с помощью метода максимального правдоподобия с бутстреп-поддержкой на основе 1000 повторностей. Последовательности, полученные в данном исследовании, выделены жирным шрифтом.

родов *Staphylococcus* и *Micrococcus* – 10.1 и 11.5% соответственно (табл. 1).

Статистически значимые различия выявлены между частотой встречаемости штаммов микробиоты пищеварительного тракта моллюсков и донных осадков, но не обнаружены между частотой встречаемости штаммов, выделенных из содержимого желудка и фекалий моллюсков.

В результате молекулярно-генетического анализа клонов получены нуклеотидные последовательности, принадлежащие 3 филумам: *Proteobacteria* (классы *Alpha-*, *Beta-* и *Gammaproteobacteria*), *Bacteroidetes* и *Tenericutes* (рис. 2).

Наибольшая гомология получена с последовательностями, выделенными из планктона пресной и морской воды, а также микрофлоры пищеварительного тракта моллюсков, ракообразных и насекомых. Последовательности BbCs 5/10, BbCs 3/10 и BbFgF 1/10 принадлежали бактериям родов *Pseudomonas* и *Flavobacterium* с высоким процентом гомологии (99%). Последовательности гена 16S рДНК клонов BbCs 5/10 и BbCs 3/10 были идентичны *Pseudomonas jessenii* и *P. fluorescens*, а также *Pseudomonas* sp. Y1000, выделенной из глубинных вод оз. Байкал. Последовательность клона BbFgF 1/10 идентична виду *Flavobacterium tiangeerense* и другим *Flavobacterium* sp., выделенным из водных экосистем.

Таблица 2. Частота встречаемости штаммов, утилизирующих различные органические соединения, %

Группа штаммов	Содержимое желудка					Прямая кишка с фекалиями					Донные осадки				
	Кр	Жел	Мол	Тр	ЯЖ	Кр	Жел	Мол	Тр	ЯЖ	Кр	Жел	Мол	Тр	ЯЖ
НГОБ	92.5	87.7	84.0	72.6	71.7	90.8	86.2	82.6	80.7	82.6	44.6	60.7	53.6	48.2	33.9
Энтеробактерии	82.0	58.0	52.0	46.0	40.0	94.4	63.4	64.8	46.5	38.0	81.3	0	0	0	0
ГПБ	55.6	44.4	33.3	77.8	44.4	60.0	20.0	0	60.0	0	57.9	34.2	32.9	30.3	26.3
Всего	87.3	76.4	71.5	64.9	60.6	90.8	75.7	74.4	67.0	63.2	55.4	40.5	37.2	33.8	26.4

Примечание. Расчет процентной доли проводили от общей суммы штаммов каждой группы; “Кр” – крахмал, “Жел” – желатин, “Мол” – обезжиренное молоко, “Тр” – трибутирин, “ЯЖ” – яичный желток.

Последовательность BbFgF 3/10 имела наибольшее сходство (98%) с последовательностью некультивируемой бактерии кишечника морских крабов вида *Eriocheir sinensis* (DQ856537). Культивируемые бактерии вида *Mesorhizobium thiogangeticum* и различные *Mesorhizobium* sp. с данным клоном имели более низкую гомологию (94%). Для нуклеотидной последовательности клона BbCsKsnp2/10 было обнаружено максимальное сходство (99%) с различными некультивируемыми бактериями рода *Deefgea* и видом *Deefgea rivuli*. Низкую гомологию (87%) имели последовательности клона BbCsKssp 1/10 с *Mycoplasma hyorhinitis*, а также с некультивируемыми бактериями, полученными из микрофлоры пищеварительной железы устрицы (FM995178) и кишечной микрофлоры моллюсков вида *Halotis diversicolor* (GU070687 и HQ393422) (рис. 2).

Физиолого-биохимические свойства гетеротрофных бактерий пищеварительного тракта моллюсков и среды их обитания. Большинство полученных в данном исследовании штаммов проявили способность утилизировать хотя бы один из тестируемых субстратов. В содержимом желудка и фекалиях моллюсков встречаемость таких штаммов составила 94 и 93% соответственно, а в донных осадках их доля была несколько меньше – 71%. Усвоение всех тестируемых органических соединений наблюдали для 40 и 50% штаммов, выделенных, соответственно, из желудка и фекалий моллюсков, и только для 17% для выделенных из донных осадков.

Среди бактерий, выделенных из содержимого желудка и фекалий, можно отметить высокую встречаемость штаммов, осуществляющих гидролиз крахмала (87.3 и 90.8% соответственно) и трибутирина (64.9 и 67.0%), а также на средах с желатином (76.4 и 75.7%), обезжиренным молоком (71.5 и 74.4%) и яичным желтком (60.6 и 63.2%). Более половины из них были представлены НГОБ. Среди бактерий данной группы, выделенных из пищеварительного тракта моллюсков, наблюдали высокую встречаемость штаммов, усваивающих тот или иной тестируемый субстрат – от 71.7 до 92.5% (табл. 2). Большинство энтеробакте-

рий из содержимого желудка и фекалий расщепляли крахмал (82.0 и 94.4% соответственно); среди ГПБ наиболее часто встречались штаммы, гидролизующие трибутирин (77.8 и 60.0% соответственно) и крахмал (55.6 и 60.0% соответственно) (табл. 2).

Культуры бактерий из донных осадков, способные к утилизации тестируемых органических веществ, встречались в меньшем количестве, чем из пищеварительного тракта моллюсков. Большинство из них расщепляли крахмал (55.4%), а штаммы, усваивающие остальные тестируемые субстраты, составили еще меньшую долю (от 26.4 до 40.5%). Среди НГОБ, выделенных из донных осадков, более половины разжижали желатин и образовывали характерные зоны на среде с обезжиренным молоком (60.7 и 53.6% соответственно), для энтеробактерий отметили только гидролиз крахмала (81.3%). В группе ГПБ также преобладали штаммы, усваивающие крахмал (57.9%) (табл. 2).

Таким образом, в коллекции выделенных бактерий, культивируемых из пищеварительного тракта моллюсков, доминировали штаммы, утилизирующие крахмал, в большинстве представленные НГОБ и энтеробактериями. Штаммы, гидролизующие желатин и обезжиренное молоко также чаще встречались среди НГОБ, а трибутирин и яичный желток – среди НГОБ и ГПБ. В среде обитания встречаемость штаммов, расщепляющих тестируемые субстраты, была ниже. Статистически значимых различий между частотой встречаемости таких штаммов среди НГОБ, ГПБ и энтеробактериями в донных осадках не выявлено.

ОБСУЖДЕНИЕ

Сходство качественного состава гетеротрофных микроорганизмов в пищеварительном тракте моллюсков и среде обитания очевидно, так как гастроподы, соскребая с поверхности грунта пищу (и пропуская его через кишечник), собирают находящиеся в донных осадках микроорганизмы

(Harris, 1993; Syvokiene, Mickeniene, 2002; Syvokiene et al., 2008; Gayathri et al., 2011).

Часть попавших в кишечник бактерий, вероятно, лизируются пищеварительными ферментами и являются пищей моллюсков (Harris, 1993). Таковыми могут являться грамположительные бактерии, обнаруженные в донных осадках в среде обитания гастропод, и почти полностью отсутствовавшие в желудке и фекалиях. Известно, что представители рода *Bacillus* составляют большую часть культивируемых бактерий из донных осадков оз. Байкал (Максимова, Максимов, 1989). Не исключено, что эти бактерии подавляются другими в результате конкуренции за питательный субстрат в кишечнике моллюсков (Harris, 1993). Кроме того, учитывая выявленную способность грамположительных бактерий, выделенных в данном исследовании, утилизировать органические соединения, можно предположить их участие в процессе расщепления компонентов пищи в пищеварительной системе моллюсков.

Среди грамотрицательных бактерий наибольшая встречаемость в пищеварительном тракте моллюсков определена для бактерий рода *Pseudomonas*, представляющих обширную группу микроорганизмов, широко населяющих биосферу и принимающих активное участие в процессах минерализации органических веществ. Повсеместная распространенность данной группы бактерий в различных биотопах объясняется их выраженной приспособляемостью к разнообразным условиям внешней среды. Представители рода *Pseudomonas* составляют в среднем 80% от всех культивируемых гетеротрофов в водной толще озера Байкал. Наибольшее их количество зарегистрировано в литоральной зоне озера вблизи населенных пунктов (Павлова и соавт., 2003). Известно, что псевдомонады доминируют в микробиоте двустворчатых и брюхоногих моллюсков из морских и пресноводных экосистем (Pujalte et al., 1999; Syvokiene, 2002). Накапливание грамотрицательных бактерий в кишечном тракте моллюсков, возможно, связано с их способностью вырабатывать гидролитические ферменты, расщепляющие органические вещества, а также устойчивостью к секрету пищеварительной железы моллюсков, благодаря трехслойному строению клеточной оболочки. Вероятно, такие “активные” штаммы могут представлять симбионтную транзитную микрофлору моллюска, так как из их пищеварительного тракта они выделены в большем количестве, чем из донных осадков. Такие предположения были изложены в более ранних исследованиях микробиоты кишечника водных беспозвоночных (Harris, 1993; Chaston, Goodrich-Blair, 2010). Ранее считали, что гастроподы, имеющие кристаллический стелек в желудке, утилизируют главным образом растительную пищу (Young, 1932). Присутствие в кишечнике *B. baicalensis* бактерий, расщепляющих

белки, подтверждает, что моллюски способны питаться животной пищей (Roepstorff et al., 2003).

Обнаруженные в пищеварительном тракте моллюсков и донных осадках микроорганизмы родов *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes* и *Acinetobacter*, а также бактерии семейства *Enterobacteriaceae* входят в состав микрофлоры человека и теплокровных животных. Эти группы бактерий встречаются в литоральных водах и донных осадках оз. Байкал, вблизи населенных пунктов, в том числе у пос. Листвянка, где были собраны моллюски (Намсараев, Земская, 2000; Панасюк и соавт., 2002; Timoshkin et al., 2016). Представители родов *Escherichia* и *Enterobacter* (сем. *Enterobacteriaceae*), найденные в желудочно-кишечном тракте *B. baicalensis*, являются постоянными обитателями кишечника не только теплокровных животных, но и наземных беспозвоночных, например, пчел (Чечеткина и соавт., 2011), а также байкальских лососевидных рыб (Дзюба и соавт., 2014).

Бактерии родов *Mesorhizobium* и *Deeferia* являются сапрофитными и встречаются повсеместно. Представители рода *Mesorhizobium* – азотфиксаторы, *Deeferia* – хитинолитики (Stackebrandt et al., 2007; Tatsukami et al., 2013), поэтому можно предположить участие бактерий рода *Deeferia* в переваривании моллюсками останков личинок насекомых, а бактерий рода *Mesorhizobium* – в утилизации продуктов пищеварения моллюсков. Найденные в пищеварительном тракте гастропод представители филума *Tenericutes* являются внутриклеточными симбионтами человека, животных и растений, обладая разными видами симбиотических ассоциаций с хозяином. Микоплазмы часто являются паразитами в жаберных клетках рыб и встречаются в эпителиальных клетках кишечника моллюсков (King et al., 2012). Также, известно, что моллюски могут участвовать в распространении патогенных для животных микобактерий вида *Mycobacterium ulcerans* (возбудителя язвы Бурули) (Marsollier et al., 2004). В экосистеме оз. Байкал рода *Deeferia* и *Mycoplasma* обнаружены в микробиоценозе кишечника байкальских лососевидных рыб (Дзюба и соавт., 2014).

Таким образом, первые исследования микробного сообщества пищеварительного тракта байкальских гастропод *B. baicalensis* позволили определить, что в их желудке и фекалиях присутствуют микроорганизмы, характерные, главным образом, для донных осадков литорали озера. Проведенные эксперименты показали, что выделенные из кишечника моллюсков грамотрицательные бактерии способны утилизировать природные органические соединения, что объясняет высокую активность моллюсков в усвоении пищи растительного и животного происхождения. Высокая частота их встречаемости в пищеварительном тракте моллюсков предполагает наличие с ними симбиотических

связей. На основании низкой частоты встречаемости грамположительных бактерий в желудке и фекалиях моллюсков, по сравнению с донными осадками, можно предположить, что данные бактерии лизируются пищеварительными ферментами и являются для моллюсков пищей. Выявленные некультивируемые представители филума *Tenericutes*, возможно, наряду с бактериями группы спирохет, обнаруженными ранее у *B. baicalensis* (Sitnikova et al., 2012), представляют собственную микрофлору пищеварительного тракта моллюсков. Дальнейшие исследования будут направлены на сравнение количественных показателей микробиоты пищеварительного тракта моллюсков и донных осадков, а также более подробное изучение состава микрофлоры желудка и кишечника гастропод *B. baicalensis* методами молекулярной биологии.

Авторы признательны к.б.н. А.Б. Купчинскому за помощь в сборе моллюсков, к.б.н. О.И. Белых и к.б.н. М.Ю. Суловой за помощь в интерпретации и оформлении результатов исследований. Работа выполнена в рамках госзадания Лимнологического института СО РАН № 0345-2016-0003 (АААА-А16-116122110061-6), а также при финансовой поддержке РФФИ, проект № 15-29-02515-офи_м.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Белых М.П., Суханова Е.В., Белькова Н.Л. Особенности культивируемых гетеротрофных микроорганизмов литоральной зоны озера Байкал // Изв. Иркутского гос. ун-та. 2013. Т. 6. № 3(1). С. 20–26.
- Богатыренко Е.А., Бузолева Л.С. Характеристика бактериального сообщества кишечника дальневосточного трепанга *Apostichous japonicus* // Микробиология. 2016. Т. 85. № 1. С. 92–99.
- Bogatyrenko E.A., Buzoleva L.S. Characterization of the gut bacterial community of the Japanese sea cucumber *Apostichopus japonicus* // Microbiology (Moscow). 2016. V. 85. P. 116–123.
- Дзюба Е.В., Суханова Е.В., Деникина Н.Н., Белькова Н.Л. Сравнительный анализ микробиоценозов кишечника лососевидных рыб с разными пищевыми стратегиями // Фундаментальные исследования. 2014. № 11. С. 2429–2433.
- Максимова Э.А., Максимов В.Н. Микробиология вод Байкала. Иркутск: Иркутский ун-т, 1989. 165 с.
- МР 3923-85. Методические рекомендации по идентификации грамотрицательных неферментирующих микроорганизмов.
- МУ 04-723/3. Методические указания по микробиологической диагностике заболеваний, вызываемых энтеробактериями.
- Намсараев Б.Б., Земская Т.И. Микробиологические процессы круговорота углерода в донных осадках озера Байкал. Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2000. 160 с.
- Определитель бактерий Берджи / Под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита, Дж. Стейли, С. Уильямса. М.: Мир, 1997. 432 с.
- Павлова О.Н., Дрюккер В.В., Косторнова Т.Я., Никулина И.Г. Особенности распространения бактерий рода *Pseudomonas* в озере Байкал // Сиб. экол. журн. 2003. Т. 3. С. 267–272.
- Панасюк Е.Ю., Дрюккер В.В., Парфенова В.В., Косторнова Т.Я. Биоразнообразие и распределение бактерий семейства *Enterobacteriaceae* и неферментирующей группы в озере Байкал // Сиб. экол. журн. 2002. Т. 4. С. 485–490.
- Практикум по микробиологии: Учебное пособие для студентов высших учебных заведений / Под ред. Нетрусова А.И. М.: Издательский центр “Академия”, 2005. 608 с.
- Родина А.Г. Бактерии в продуктивности каменистой литорали озера Байкал // Тр. конф. Зоол. инст. Акад. наук СССР. 1954. № 2. С. 172–201.
- Ситникова Т.Я. Переднежаберные брюхоногие моллюски (Gastropoda: Prosobranchia) Байкала: морфология, таксономия, биология и формирование фауны: Дис. ... докт. биол. наук. 03.00.08. Иркутск, 2004. 242 с.
- Тимошкин О.А., Иванов В.Г., Оболкин В.А., Шерстянкин П.П. Динамика температуры воды в мелководной зоне западного борта южного Байкала в районе междисциплинарного полигона у мыса Березовый по данным непрерывного измерения с помощью датчиков ONSET StowAway Tid Bit Loggers // Аннотированный список фауны озера Байкал и его водосборного бассейна: в 2 томах. Т. II: Водоёмы и водотоки юга Восточной Сибири и Северной Монголии, книга 1 / Под ред. д.б.н. О.А. Тимошкина. Новосибирск: Наука. 2009. С. 727–731.
- Тулупова Ю. Р., Парфенова В. В., Ситникова Т. Я., Сороковикова Е. Г., Ханаев И. В. Первые сведения о бактериях семейства *Spirochaetaceae* пищеварительного тракта эндемичных брюхоногих моллюсков озера Байкал // Микробиология. 2012. Т. 81. № 4. С. 500–507.
- Tulupova Y.R., Parfenova V.V., Sitnikova T.Y., Sorokovnikova E.G., Khanaev I.B. First report on bacteria of the family *Spirochaetaceae* from digestive tract of endemic gastropods from Lake Baikal // Microbiology (Moscow). 2012. V. 81. P. 460–467.
- Чечёткина У.Е., Евтеева Н.И., Речкин А.И., Радаев А.А. Энтеробактерии в составе микрофлоры пищеварительной системы медоносных пчел в различные сезоны года // Вестник ННГУ. 2011. № 2 (2). С. 149–153.
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2nd ed. The *Gammaproteobacteria* / Eds. Brenner D.J., Krieg N.R., Stapley J.T., Garrity G.M. New York: Springer, 2005. V. 2. Part B. 1108 p.
- Bergey's manual of systematic bacteriology. 2nd ed. The *Firmicutes* / Eds. De Vos P, Garrity G.M., Jones D., Krieg N.R., Ludwig W., Rainey F.A., Schleifer K.-H., Whitman W.B. New York: Springer, 2009. V. 3. 1450 p.
- Brendelberger H. Bacteria and digestive enzymes in the alimentary tract of *Radix peregra* (Gastropoda, Lymnaeidae) // Limnol. Oceanogr. 1997. V. 42. P. 1635–1638.
- Chaston J., Goodrich-Blair H. Common trends in mutualism revealed by model associations between invertebrates and bacteria // FEMS Microbiol. Rev. 2010. V. 34. P. 41–58.
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2nd edn. V. 2 (The *Proteobacteria*), part B (The *Gammaproteobacteria*).

- p. 1 / Eds. Brenner D.J., Krieg N.R., Staley J.T. & Garrity G.M. New York: Springer, 2005.
- Gayathri V., Ganga Baheerathi C., Revathi K., Sethi S. Identification of gut microflora from Green Mussel (*Perna viridis*) // Suppl. Adv. Biotech. 2011. V. 10. № 10. P. 119–122.
- Harris J.M. The presence, nature, and role of gut microflora in aquatic invertebrates: a synthesis // Microb. Ecol. 1993. V. 25. P. 195–231.
- King G.M., Judd G., Kuske C.R., Smith C. Analysis of stomach and gut microbiomes of the eastern oyster (*Crassostrea virginica*) from coastal Louisiana, USA // PLoS ONE. 2012. V. 7. E. 51475.
- Liesack W., Weyland H., Stackebrandt E. Potential risks of gene amplification by PCR as determined by 16S rDNA analysis of a mixed-culture of strict barophilic bacteria // Microb. Ecol. 1991. V. 21. P. 191–198. doi 10.1007/BF02539153
- Margulis L., Hinkle G. Large symbiotic spirochetes: *Clevelandina*, *Cristispira*, *Diplocaelyx*, *Hollandina* and *Pillotina* // Prokaryotes. 2006. V. 7. P. 971–982.
- Marsollier L., Severin T., Aubry J., Merritt R.W. Aquatic snails, passive hosts of *Mycobacterium ulcerans* // Appl. Environ. Microbiol. 2004. V. 70. P. 6296–6298.
- Parvathi A., Kumar H.S., Karunasagar I., Karunasagar I. Detection and enumeration of *Vibrio vulnificus* in oysters from two estuaries along the Southwest Coast of India, using molecular methods // Appl. Environ. Microbiol. 2004. V. 70. P. 6909–6913.
- Pujalte M.J., Ortigosa M., Macian M.C., Garay E. Aerobic and facultative anaerobic heterotrophic bacteria associated to Mediterranean oysters and seawater // Int. Microbiol. 1999. V. 2. P. 259–266.
- Ropstorf P., Sitnikova T.Ya., Timoshkin O.A., Pomazkina G.V. Observation on stomach contents, food uptake and feeding strategies of endemic baikalian gastropods // Berliner Palaobiologische Abhandlungen. 2003. V. 4. P. 151–156.
- Sayler G.S., Nelson J.D., Justice A., Colwell R.R. Incidence of *Salmonella* spp., *Clostridium botulinum*, and *Vibrio parahaemolyticus* in an estuary // Appl. Environ. Microbiol. 1976. V. 31. P. 723–730.
- Simon C.A., McQuaid C. Extracellular digestion in two co-occurring intertidal mussels (*Perna perna* (L.) and *Choromytilus meridionalis* (Kr)) and the role of enteric bacteria in their digestive ecology // J. Exp. Marine. Biol. Ecol. 1999. V. 234. P. 59–81.
- Sitnikova T., Michel E., Tulupova Yu., Khanaev I., Parfenova V., Prozorova L. Spirochetes in gastropods from Lake Baikal and North American freshwaters: new multi-family, multi-habitat host records // Symbiosis. 2012. V. 56. P. 103–110.
- Stackebrandt E., Lang E., Cousin S., Pauker O., Brambilla E., Kroppenstedt R., Lunsdorf H. *Deefgea rivuli* gen. nov., sp. nov., a member of the class *Betaproteobacteria* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2007. V. 57. P. 639–645.
- Syvokiene J., Mickeniene L. Change in the intestinal microflora of molluscs from the Neris river depending on pollution // Acta. Zool. Lituanica. 2002. V. 12. P. 76–81.
- Syvokiene J., Mickeniene L., Barsiene J. Bacteria in the digestive system of molluscs from Lithuanian lakes // Ecologija. 2008. V. 54. P. 271–277.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0 // Mol. Biol. Evol. 2013. V. 30. P. 2725–2729.
- Tatsukami Y., Nambu M., Morisaka H., Kuroda K., Ueda M. Disclosure of the differences of *Mesorhizobium loti* under the free-living and symbiotic conditions by comparative proteome analysis without bacteroid isolation // BMC Microbiol. 2013. V. 13. P. 180.
- Timoshkin O.A., Samsonov D.P., Yamamuro M., Moore M.V., Belykh O.I., Malnik V.V., Sakirko M.V., Shirokaya A.A., Bondarenko N.A., Domyshva V.M., Fedorova G.A., Kochetkov A.I., Kuzmin A.V., Lukhnev A.G., Medvezhonkova O.V., Nepokrytykh A.V., Pasyunkova E.M., Poberezhnaya A.E., Potapuskaya N.V., Rozhkova N.A., Sheveleva N.G., Tikhonova I.V., Timoshkina E.M., Tomberg I.V., Volkova E.A., Zaitseva E.P., Zvereva Yu.M., Kupchinsky A.B., Bukshuk N.A. Rapid ecological change in the coastal zone of Lake Baikal (East Siberia): Is the site of the world's greatest freshwater biodiversity in danger? // J. Great Lakes Res. 2016. V. 42. P. 487–497.
- Van Horn D.J., Garcia J.R., Loker E.S., Mitchell K.R., Mkoji G.M., Adema C.M., Takacs-Vesbach C.D. Complex intestinal bacterial communities in three species of planorbid snails // J. Mollus. Stud. 2012. V. 78. P. 74–80.
- Watkinson A.J., Micalizzi G.B., Graham G.M., Bates J.B., Costanzo S.D. Antibiotic-resistant *Escherichia coli* in wastewaters, surface waters, and oysters from an urban riverine system // Appl. Environ. Microbiol. 2007b. V. 73. P. 5667–5670.
- Young C. M. Feeding and digestion in *Pterocera* and *Vermetus*, with a discussion of the occurrence of the crystalline style in the *Gastropoda* // Science Reprints Great Barrier Reef Expedition, British Museum (Natural History). 1932. № 1. P. 259–281.

First Reports on the Bacterial Community of the Digestive System of Endemic Baikal Gastropods *Benedictia baicalensis*

Yu. R. Shtykova^{1,*}, T. Ya. Sitnikova¹, N. V. Kulakova¹, E. V. Sukhanova¹, I. V. Khanayev¹, and V. V. Parfenova^{1,†}

¹*Limnological Institute, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia*

*e-mail: tulupova@lin.irk.ru

Received July 7, 2017

Abstract—Diversity and comparative analysis of the microbiota composition of the digestive system of Lake Baikal endemic gastropods *Benedictia baicalensis* (Caenogastropoda) and of the bottom sediments from their

habitat were studied. Strains belonging to 11 genera of heterotrophic bacteria (*Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, and *Micrococcus*) were isolated from the stomach and gut content. Molecular genetic analysis of total DNA from the digestive tract revealed the nucleotide sequences of the genera *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Mesorhizobium*, *Deefgea*, and of the phylum *Tenericutes*. Most isolates were found to utilize various organic substance, including those of animal origin, which was probably due to the pantophagy of these mollusks. The cultured bacterial community of *B. baicalensis* digestive system was shown to be formed by gram-negative bacteria (95–97% strains), although in the bottom sediments 51% of the isolates were gram-positive coccoid and spore-forming rod-shaped bacteria. Low frequency of occurrence or complete absence of gram-positive bacteria in the mollusk intestine compared to the bottom sediments (fivefold or more) may indicate their use as a nutrient substrate.

Keywords: gastropods, digestive system microbiota, bacterial extracellular enzymes, Lake Baikal

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА СТРУКТУРЫ МИКРОБИОМОВ ПОГРЕБЕННЫХ И СОВРЕМЕННЫХ ПОЧВ ПРИ ПОМОЩИ АНАЛИЗА МИКРОБНОЙ ДНК

© 2018 г. Т. И. Чернов^{a, *}, А. Д. Железова^a, О. В. Кутюва^a, А. О. Макеев^b, А. К. Тхакахова^a,
Н. А. Бгажба^a, Ф. Г. Курбанова^a, А. В. Русаков^c, Т. А. Пузанова^b, О. С. Хохлова^d

^aПочвенный институт им. В.В. Докучаева, Москва, 109017, Россия

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

^cСанкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, 199034, Россия

^dИнститут физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН, Пущино, 142290, Россия

*e-mail: chern-off@mail.ru

Поступила в редакцию 04.04.2018 г.

Проанализированы микробиомы погребенных почв под разновозрастными археологическими земляными сооружениями (погребальными курганами и оборонительными валами) и фоновых современных почв. Анализ микробной ДНК проводили при помощи количественной ПЦР и секвенирования ампликонов гена 16S рРНК. Показано, что в погребенных почвах численность и разнообразие микроорганизмов снижаются. Таксономическая структура микробиомов погребенных почв значительно отличалась от структуры современных почв: в погребенных почвах крайне низка доля бактериального филума *Verrucomicrobia*. Отмечено, что мощность насыпи должна быть достаточной для изоляции почвы от влияния корней растений, в противном случае микробиом может практически не отличаться от фоновых современных почв. Основным фактором изменений структуры микробного сообщества в погребенных почвах, скорее всего, является уровень минерализации запасенного (в отсутствие поступления свежего) органического вещества. В данном исследовании не выявлено черт микробиомов погребенных почв, которые могли бы использоваться в качестве маркеров типа погребенной почвы.

Ключевые слова: погребальные курганы, палеопочвы, структура почвенных микробиомов, ДНК, 16S рРНК, *Verrucomicrobia*.

DOI: 10.1134/S0026365618060071

Палеопочвы или погребенные почвы — это почвы, поверхность которых перекрыта естественными или антропогенными отложениями. Погребенные почвы являются ценным источником информации о климате, ландшафтах и биоте данной территории в прошлом, поскольку они сохраняют многие нативные свойства на протяжении десятков и сотен тысяч лет. В отличие от современных поверхностных почв, свойства погребенных почв в процессе диагенеза (изменения почвы после погребения) могут меняться с разной скоростью или, в случае законсервированных почв, не меняться совсем (Соколов, 2004; Рябогина, Якимов, 2010). Информация, полученная при изучении погребенных почв, может представлять интерес для палеоэкологических и почвенно-археологических реконструкций.

Возможность выживания микроорганизмов в таких почвах обусловлена несколькими факторами. Во-первых, в погребенных почвах часто может поддерживаться относительно высокая влаж-

ность из-за близкого расположения грунтовых вод (Архангельская и соавт., 2008). По этой же причине зимнее или летнее иссушение практически не отражается на них (Marfenina et al., 2009). Во-вторых, погребенные почвы могут содержать достаточное количество органических (в том числе гумусовых) веществ. Имеются сведения, что основные потери органических веществ и гумуса в палеопочвах происходят в первые 100–300 лет после погребения (Демкин и соавт., 2010), после чего процессы разрушения тормозятся, при этом часть органического вещества в виде остаточного гумуса (около 7% от исходного содержания) может сохраняться в погребенных почвах неограниченно долгое время (Иванов и соавт., 2009). В-третьих, погребенные почвы характеризуются сравнительно низким содержанием кислорода, что, с одной стороны, может способствовать развитию в них анаэробных или микроаэрофильных микроорганизмов, а с другой стороны, способствует длительному сохранению покоящихся

форм микроорганизмов и замедляет деградацию микробной ДНК. Наконец, в-четвертых, палеопочвы характеризуются относительно малой сезонной амплитудой колебания температур (Архангельская и соавт., 2008; Marfenina et al., 2009). То есть микроорганизмы могут находиться практически в термостатных условиях, что может обеспечивать высокую выживаемость клеток, особенно психротолерантов.

Численность, биомасса и активность микроорганизмов в палеопочвах, как правило, ниже, чем в современных поверхностных почвах (Khomutova et al., 2004; Makeev et al., 2018). При этом некоторые исследования демонстрируют, что гумусовые горизонты погребенных почв превышают по численности, биомассе и видовому разнообразию микроорганизмов минеральные горизонты (Marfenina et al., 2009; Демкин и соавт., 2010; Shen et al., 2010) и могут быть сопоставимы по этим показателям с современными гумусовыми горизонтами (Борисов и соавт., 2006). Из погребенных почв могут быть выделены жизнеспособные грибы (Marfenina et al., 2009) и даже зеленые водоросли (Темралеева и соавт., 2017). То есть жизнеспособность микроорганизмов в погребенных почвах сохраняется.

Имеются данные, что возраст микробной биомассы в погребенных почвах под степными курганами I–IV века н.э., определенный при помощи датирования по ^{14}C , примерно совпадает с возрастом кургана (Демкина и соавт., 2009). Согласно ряду исследований эколого-трофическая структура культивируемой части микробного сообщества погребенных почв может быть обусловлена климатической ситуацией в эпоху создания земляной насыпи, прежде всего – влажностью (Khomutova et al., 2004; Демкина и соавт., 2009; Mitusov et al., 2009). Таким образом, по крайней мере часть микробного комплекса погребенных почв может наследоваться со времени погребения и являться возможным источником информации для палео-экологических реконструкций.

Исследования микробных сообществ погребенных почв при помощи молекулярно-генетических методов – ПЦР и высокопроизводительного секвенирования (NGS), достаточно немногочисленны. Показано, что микробная ДНК может быть выделена из почв, погребенных на значительной глубине (Chandler et al., 1998), а также сохраняется в погребенных пеплом вулканических почвах (Huang et al., 2016). В погребенных почвах раннего бронзового века (около 5000 лет назад) при низком содержании жизнеспособной микробной биомассы обнаруживается достаточно высокое содержание микробной ДНК, при этом ее количество хорошо коррелирует с общей микробной биомассой (Blagodatskaya et al., 2003).

Большинство данных о структуре микробных сообществ погребенных почв получено стандарт-

ными микробиологическими и биохимическими методами исследования, а сведения об их таксономическом разнообразии ограничены культивируемыми формами микроорганизмов. При этом таксономическая структура микробных сообществ, определяемая при помощи NGS, может служить маркером диагенетических изменений в погребенной почве (Makeev et al., 2018).

Настоящее исследование было предпринято с целью сравнительного анализа таксономической структуры микробных сообществ разновозрастных погребенных и фоновых современных почв при помощи молекулярно-генетических методов: количественной ПЦР и высокопроизводительного секвенирования. Мы попытались ответить на вопросы о том, насколько отличаются микробиомы погребенных и фоновых современных почв и связаны ли возраст и тип погребенной почвы со структурой обнаруженных микробиомов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследования служили почвы, погребенные под археологическими земляными сооружениями (погребальными курганами и оборонительными валами) разного возраста, от бронзового века (1500–1700 лет д.н.э.) до раннего Средневековья (400–500 лет н.э.), а также фоновые современные почвы. Возраст земляных насыпей (т.е. длительность погребения почвы) определялся по археологическим находкам или радиоуглеродным методом.

Местоположение разрезов и характеристики почв указаны в табл. 1. Исследуемые погребенные почвы вскрыты под: разновозрастными оборонительными валами городища железного века у с. Мухино Задонского р-на Липецкой обл. (Лп-м1п, Лп-м2п) и городища раннего железного века у с. Ксизово Задонского района Липецкой области (Лп-к9п); погребальным курганом бронзового века у д. Власовка Грибановского р-на Воронежской обл. (Гр-1п); оборонительным валом городища скифского времени у поселка городского типа (п.г.т.) Борисовка Белгородской обл. (Бор-1п); оборонительным валом городища раннего железного века Ножа-Вар у г. Ядрин, республика Чувашия (Ядр-1п) и фундаментом строений Московского Кремля (Км-1п, Км-2п).

Почвы отнесены к типам дерново-подзолистых, темно-серых и черноземов (Полевой определитель почв России, 2008), по классификации WRB – Albic Retisols, Luvisc Phaeozems и Luvisc Chernozems соответственно (USS Working Group WRB, 2014). Образцы отбирались из гумусо-аккумулятивных (А), минеральных (В) и элювиальных (Е) горизонтов (табл. 1).

Отбор образцов для молекулярно-биологических анализов осуществили в пределах выбранного

Таблица 1. Характеристики объектов исследования

Площадка	Номер образца	Горизонт	Индекс разреза	Тип почвы	Координаты	Возраст, лет	Мощность насыпи, см	
I Борисовка	1	A	Бор-1п	Темно-серая	N 50°37'16" E 36°00'18"	2410–2640	150	
	2	B						
	3	A	Бор-2ф	Темно-серая		Современная	–	
	4	B						
II Ядрин	5	A	Ядр-1п	Дерново-подзолистая	N 55°54'50" E 46°14'37"	2000	200	
	6	E						
	7	B						
	8	A	Ядр-2ф	Дерново-подзолистая		N 55°54'44" E 46°14'49"	Современная	–
	9	E						
	10	B						
III Кремль	11	A	Км-1п	Дерново-подзолистая	N 55°45'11" E 37°37'10"	2500	Культурные слои и каменный фундамент	
	12	B	Км-2п	Дерново-подзолистая	N 55°45'11" E 37°37'10"	2500		
IV Власовка	13	A	Гр-1п	Чернозем	N 51°35'24" E 42°20'04"	3500–3700	175	
	14	A	Гр-4ф	Чернозем	N 51°35'24" E 42°20'04"	Современная	–	
V Мухино	15	A	Лп-м1п	Темно-серая	N 52°18'00" E 38°54'13"	2500	120	
	16	A	Лп-м2п	Чернозем	N 52°18'00" E 38°54'13"	1600–1500	80	
	17	A	Лп-м3ф	Темно-серая	N 52°18'01" E 38°54'04"	Современная	–	
VI Ксизово	18	A	Лп-к9п	Темно-серая	N 52°17'39" E 38°55'24"	2400–2600	30	
	19	A	Лп-к8ф	Темно-серая	N 52°17'40" E 38°55'24"	Современная	–	

почвенного горизонта в трехкратной повторности. Объем одного образца составлял 20–50 г. Образцы доставляли в лабораторию в течение 3–10 сут в закрытых полиэтиленовых пакетах, до анализа образцы хранили при температуре -70°C . Перед выделением ДНК повторности образцов почвы объединяли для получения смешанного образца.

Выделение тотальной ДНК проводили из навески почвы массой 0.5 г при помощи набора реагентов PowerSoil DNA Isolation Kit (“MO BIO Laboratories”, США).

Оценку содержания почвенного органического вещества (гумуса) в исследуемых образцах почвы проводили по классическим методом Тюрина (Аринушкина, 1970) с пересчетом содержания гумуса в процентах от массы почвы.

Количественную оценку содержания рибосомальных генов бактерий, архей и грибов осуществляли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени. Для учета архей и бактерий использовали праймеры на ген 16S рРНК, для учета грибов – на регион ITS. Реакцию проводили в амплификаторе Real-Time CFX96 Touch (“Bio-Rad”) с измерением интенсивности флуоресценции реакционной смеси в каждом цикле. Реакционную смесь готовили из препарата SuperMix Eva Green (“Bio-Rad”). В качестве количественных стандартов концентрации генов 16S рРНК для бактерий использовали растворы клонированных фрагментов рибосомального оперона штамма K12 *Escherichia coli*, для архей – штамма FG-07 *Halobacterium salinarum*, для гри-

бов – штамма дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* Meyen 1В-D1606. Для каждого образца реакцию проводили в трех повторностях. Концентрацию генов рассчитывали с помощью программного обеспечения CFX Manager. Концентрацию генов в препаратах ДНК пересчитывали в количество генов на 1 г почвы с учетом разведений и массы навески.

Секвенирование 16S рРНК и биоинформатический анализ данных. Подготовку проб и секвенирование ампликонов гена 16S рРНК проводили на приборе Illumina MiSeq в соответствии с методикой производителя.

Обработку данных секвенирования осуществляли с помощью программ QIIME (Caporaso et al., 2010) и Trimmomatic (Bolger et al., 2014). Проводили выравнивание последовательностей нуклеотидов (trimming) с помощью Trimmomatic. Прямые и обратные чтения (риды), имеющие перекрытие не менее 180 нуклеотидов, объединяли при помощи алгоритма fastq-join, далее работали с объединенными ридами. С помощью QIIME проводили проверку качества секвенирования. Сиквенсы объединяли в операционные таксономические единицы (ОТЕ) на основе критерия 97% сходства нуклеотидного состава и удаления синглтонов (ОТЕ, содержащих только один сиквенс) и последовательностей генов 16S рРНК хлоропластов и митохондрий.

Определение таксономической принадлежности ОТЕ проводилось с использованием базы данных SILVA версии № 128 от 2017 года.

Статистические анализы проводили с использованием программ QIIME, Microsoft Excel и Statistica.

Для оценки общего разнообразия (альфа-разнообразия) микробных сообществ рассчитывали следующие показатели: количество обнаруженных ОТЕ, индекс Chao1 (оценка реального числа ОТЕ в микробиоме) (Collwell et al., 1994) и индекс Шеннона. Для оценки сходства микробиомов друг с другом (бета-разнообразия) использовали метрику weighted UniFrac (Lozupone et al., 2011). Визуализацию результатов анализа бета-разнообразия проводили при помощи неметрического многомерного шкалирования (NMDS) в двумерном пространстве. При оценке альфа- и бета-разнообразия проводили нормализации данных по 2960 сиквенсам для каждого образца.

Для оценки корреляции численности рибосомальных генов и индексов разнообразия микробиома с возрастом почвы и содержанием гумуса рассчитывали коэффициенты корреляции Пирсона (R). Возраст современной почвы при этом принимали за 0, для погребенных почв брали центр временного диапазона возраста.

Для оценки значимости различий разнообразия, численности и представленности отдельных

групп микроорганизмов в погребенных и современных почвах использовали U -критерий Манна–Уитни с уровнем значимости $p = 0.05$. Для оценки значимости различий разнообразия, численности и представленности отдельных групп микроорганизмов в погребенных почвах разных типов (черноземах, темно-серых и дерново-подзолистых) использовали вариацию критерия Манна–Уитни для многомерных данных – критерий Краскела–Уоллиса.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Содержание почвенного органического вещества. Содержание гумуса во всех погребенных почвах ниже, чем в фоновых современных почвах (табл. 2) и достигает 0.34–0.48% в минеральных (В) горизонтах и 1.39–2.91% в гумусовых (А).

Численность рибосомальных генов микроорганизмов. Согласно результатам количественной ПЦР численность рибосомальных генов архей в изученных почвах находится в пределах порядка 10^9 , а бактерий и грибов – порядка 10^{10} копий гена на 1 г сухой почвы (рис. 1). Наиболее высокие значения численности всех трех групп микроорганизмов отмечены для современных почв, наиболее низкие – для погребенных. Численность микробных генов в погребенных почвах (за исключением почвы Лп-к9п) ниже, чем в фоновых современных почвах той же площадки.

Количество микробных генов отрицательно коррелирует с возрастом почвы ($R = -0.70$ для генов бактерий, $R = -0.59$ для архей и $R = -0.69$ для грибов) и положительно коррелирует с содержанием гумуса ($R = 0.80$ для генов бактерий, $R = 0.47$ для архей и $R = 0.37$ для грибов). Согласно критерию Манна–Уитни численность генов бактерий, грибов и архей в погребенных почвах достоверно меньше, чем в современных. Достоверной разницы численности микроорганизмов в трех типах погребенных почв (черноземах, темно-серых, дерново-подзолистых) по критерию Краскела–Уоллиса не обнаружено.

Таксономическая структура микробиомов. После секвенирования и первичной обработки данных (объединения прямых и обратных ридов, удаления синглтонов, генов хлоропластов и митохондрий) было получено от 2969 до 14746 сиквенсов для каждого образца почвы. Среднее количество сиквенсов на образец – 9093, абсолютное большинство сиквенсов имеет длину 285–290 нуклеотидов.

Прокариотные сообщества как современных, так и погребенных почв преимущественно состоят из представителей филумов *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Firmicutes*, *Gemmatimonadetes*, *Nitrospirae*, *Planctomycetes*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia* и архей филума *Thaumarchaeota*

Таблица 2. Содержание гумуса, численность и разнообразие микроорганизмов в исследованных почвах

Номер образца	Гумус, %	Численность рибосомальных генов микроорганизмов в почве, 10 ⁹ /г			Разнообразие прокариотных биомов		
		бактерии	археи	грибы	кол-во ОТЕ	индекс Chao1	индекс Шеннона
1	1.7	53.2	6.7	33.0	666	1070	7.8
2	0.3	43.2	6.6	27.8	560	882	7.7
3	5.4	249.4	31.7	291.8	667	1332	6.8
4	1.1	79.9	8.5	58.2	547	975	7.1
5	2.5	117.3	3.5	26.2	476	787	6.7
6	0.6	36.8	4.0	32.2	519	836	7.5
7	0.5	24.7	3.5	18.1	407	571	6.8
8	3.6	286.2	10.6	283.3	919	1602	8.5
9	1.9	241.2	18.3	380.0	721	1268	7.8
10	1.5	79.7	8.0	136.6	473	853	6.8
11	n/a	71.3	8.7	15.8	396	609	6.1
12	n/a	10.3	4.2	6.0	382	634	5.3
13	2.9	36.0	3.7	22.0	500	805	7.3
14	4.0	175.7	25.4	110.8	600	1031	7.3
15	2.3	25.1	3.5	12.9	576	863	7.8
16	1.6	117.2	15.3	76.2	554	940	7.0
17	3.4	208.4	28.1	336.9	644	1215	7.3
18	7.4	135.8	11.9	149.4	517	883	7.1
19	1.4	354.3	9.6	109.0	715	1247	7.4

(рис. 2). Другие филумы прокариот были представлены не во всех исследованных образцах и, как правило, имели долю в сообществе менее 1%.

Основным отличием состава микробиомов погребенных и современных почв является разная представленность филума *Verrucomicrobia*. Если в микробиомах современных почв доля *Verrucomicrobia* составляет 21–40%, то в погребенных почвах их доля на порядок меньше. Исключение составляет погребенная почва Лп-м2п, в микробиоме которой *Verrucomicrobia* имеют высокую долю (47%). Как в современных, так и в погребенных почвах *Verrucomicrobia* практически полностью представлены порядком *Chthoniobacteriales* класса *Spartobacteria*. Бактерии филума *Actinobacteria*, *Chloroflexi*, *Gemmatimonadetes* и *Nitrospirae* обладали большей долей в микробиомах погребенных почв (до 9.2%), чем современных (1–4%). Согласно анализу коэффициентов корреляции, доля *Verrucomicrobia* отрицательно связана с мощностью насыпи ($R = -0.87$), а доля *Nitrospirae* ($R = 0.86$), *Gemmatimonadetes* ($R = 0.61$), *Actinobacteria* ($R = 0.49$) и *Chloroflexi* ($R = 0.49$) – положительно. Доля других филумов, согласно значениям *U*-критерия Манна–Уитни, значимо не различалась в современных и погребенных почвах.

Достоверных различий доли каких-либо филумов между тремя типами погребенных почв по критерию Краскела–Уоллиса не обнаружено.

Оценка общего разнообразия микробиомов. При нормализации всех анализируемых микробиомов по 2960 сиквенсам в микробиомах погребенных почв было выявлено от 381 до 666 ОТЕ прокариот, в микробиомах современных почв – от 473 до 919 ОТЕ (табл. 2, рис. 4). Индекс Chao1 (оценка реального количества ОТЕ в сообществе) варьирует для микробиомов погребенных почв от 571 до 1069, для микробиомов современных почв – от 853 до 1332. Индекс Шеннона для погребенных почв составляет от 5.3 до 7.8, для современных – от 6.8 до 8.5.

Значения показателей альфа-разнообразия отрицательно коррелируют с возрастом почвы ($R = -0.57$ для количества обнаруженных ОТЕ, $R = -0.69$ для индекса Chao1 и $R = -0.24$ для индекса Шеннона) и положительно – с содержанием гумуса ($R = 0.54$ для количества обнаруженных ОТЕ, $R = 0.61$ для индекса Chao1 и $R = 0.03$ для индекса Шеннона). Согласно критерию Манна–Уитни, количество обнаруженных ОТЕ и индекс Chao1 достоверно меньше в погребенных почвах по сравнению с современными. Значимых разли-

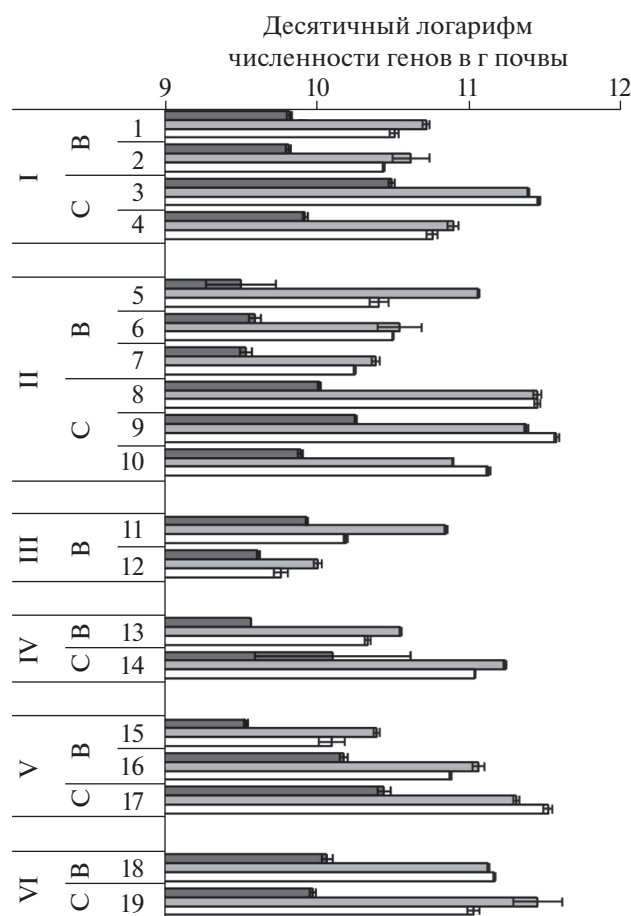


Рис. 1. Численность рибосомальных генов бактерий (Bac), архей (Arc) и грибов (Fun) в погребенных (B) и современных (S) почвах. Цифрами отмечены номера площадок и образцов согласно табл. 1.

чий по значению индекса Шеннона не обнаружено. Достоверных различий доли каких-либо индексов разнообразия в трех типах погребенных почв по критерию Краскела–Уоллиса не обнаружено.

Анализ сходства микробиомов. На рис. 4 представлена двумерная диаграмма по методу NMDS, отображающая оценку сходства микробиомов по метрике weighted UniFrac. Микробиомы погребенных и современных почв образуют на диаграмме два непересекающихся кластера, за исключением микробиома погребенной почвы Лп-к9п, который попадает в кластер современных почв (рис. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ

Численность бактерий, архей и грибов, оцененная по количеству копий рибосомальных генов, в погребенных почвах меньше, чем в фоновых современных. Одним из основных факторов, определяющих численность и биомассу микро-

организмов в почве, является содержание углерода органического вещества (Semenov et al., 2018). Известно, что запасенное в погребенных почвах органическое вещество постепенно минерализуется в процессе их диагенеза (Иванов с соавт., 2009; Демкин и соавт., 2010). Низкое содержание гумуса в исследованных погребенных почвах по сравнению с фоновыми, вероятно, является основным фактором снижения в них численности микроорганизмов. Другой причиной также может быть более низкое содержание кислорода в погребенных почвах.

Среди всех прокариотных филумов наиболее сильно изменяется при погребении почвы доля *Verrucomicrobia*, преимущественно крупного класса *Spartobacteria*. Доля этой группы в микробиоме имеет сильную отрицательную корреляцию с мощностью насыпи (чем больше насыпь, тем меньше доля *Verrucomicrobia*). Экологические особенности представителей этой группы исследованы слабо, однако имеются данные о том, что они являются аэробными гетеротрофами (Sangwan et al., 2005), потребителями легкодоступных органических веществ растительного происхождения (Kant et al., 2011), и их доля в сообществе связана с содержанием органического углерода (Fierer et al., 2013). Некоторые предыдущие исследования демонстрировали снижение доли *Verrucomicrobia* вниз по профилю почвы, от гумусовых к минеральным горизонтам (Semenov et al., 2018; Walters et al., 2011). Низкая доля *Verrucomicrobia* в исследованных погребенных почвах может быть связана как с низким содержанием доступного органического вещества, так и с микроаэрофильными условиями, или с обоими факторами.

Общее разнообразие микробиомов (альфа-разнообразие) слабо различается в погребенных и современных почвах. Индекс Шеннона, который при большом видовом богатстве, характерном для почв, практически полностью определяется выравненностью сообщества (Чернов и соавт., 2015), в погребенных и современных почвах значимо не различается. При этом количество ОТЕ (видовое богатство) в погребенных почвах ниже, чем в современных. Количество видов прокариот в почве может определяться обогащенностью почвы органическим углеродом (Zhou et al., 2002). В данном исследовании также наблюдается корреляция количества ОТЕ и индекса Chao1 с содержанием почвенного органического вещества. Мы предполагаем, что меньшее видовое богатство прокариот в погребенных почвах, как и их численность, обусловлено низким содержанием доступного углерода и изоляцией от поступления свежего органического вещества с поверхности.

Оценка сходства микробиомов при помощи метрики weighted UniFrac показала разделение прокариотных сообществ погребенных и совре-

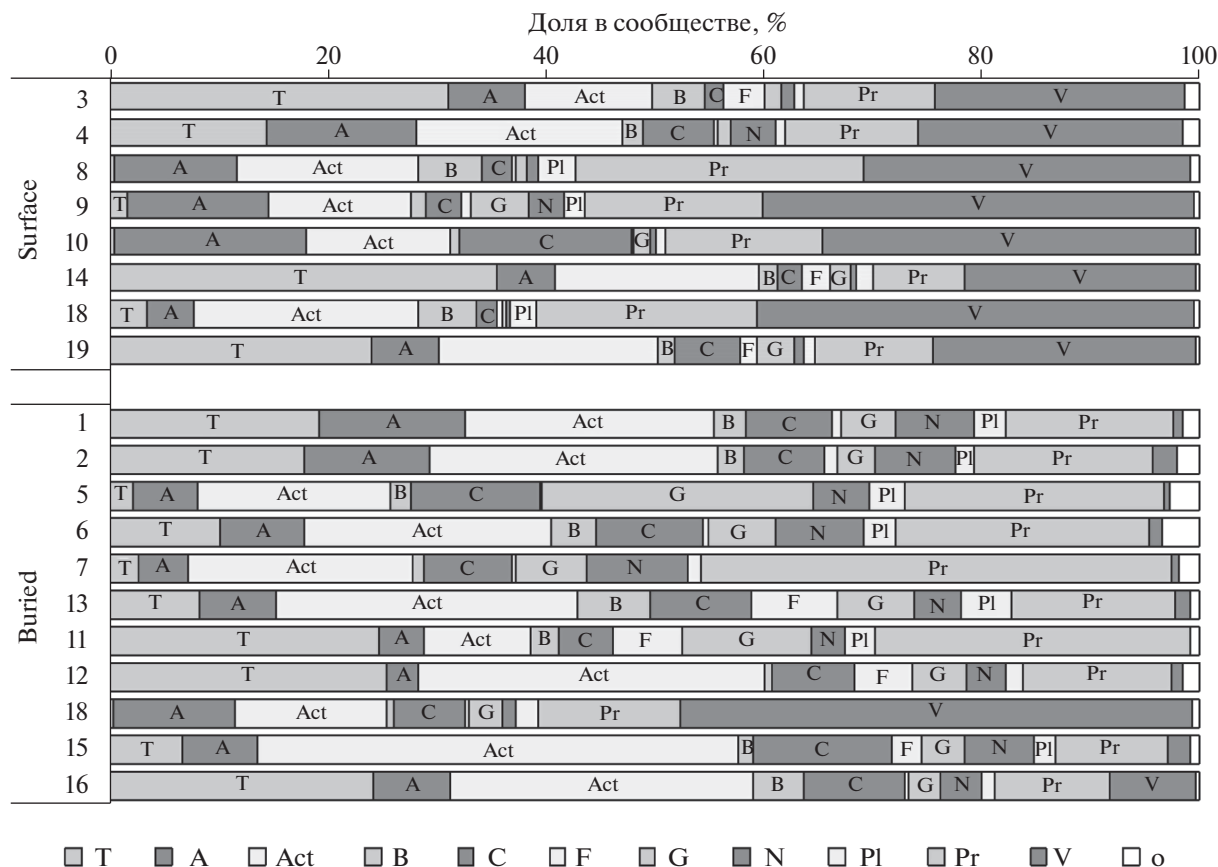


Рис. 2. Таксономическая структура микробиомов погребенных (Buried) и современных (Surface) почв на уровне филумов. Представлены филумы *Thaumarchaeota* (T), *Acidobacteria* (A), *Actinobacteria* (Act), *Bacteroidetes* (B), *Chloroflexi* (C), *Firmicutes* (F), *Gemmatimonadetes* (G), *Nitrospirae* (N), *Planctomycetes* (Pl), *Proteobacteria* (Pr), *Verrucomicrobia* (V) и другие (o). Цифрами отмечены номера площадок и образцов согласно табл. 1.

менных фоновых почв на два непересекающихся кластера (см. далее). Таким образом, в процессе диагенеза структура прокариотного сообщества почвы значительно изменяется, становясь несхожей с современными аналогами погребенных почв.

Исключением из вышеописанных особенностей погребенных почв является почва Лп-к9п (образец № 18). В ее микробиоме высокую долю (47%) имеет филум *Verrucomicrobia* (рис. 2), она попадает в кластер современных почв на диаграмме NMDS (рис. 4) и обладает наибольшей численностью генов бактерий и грибов среди погребенных почв (рис. 1). Хотя формально эта почва является погребенной, она перекрыта земляной насыпью очень небольшой мощности – 30 см (табл. 1). По всей видимости, из-за малой мощности насыпи данная почва испытывает влияние внешних факторов, прежде всего – корней растений, и экологические условия в ней соответствуют скорее современным, а не погребенным почвам. Мы предполагаем, что именно изоляция погребенных почв от влияния корней растений,

прежде всего – от привнесения свежего органического вещества, является основным драйвером изменений микробиома погребенных почв по сравнению с их современными аналогами. Другими факторами данных изменений могут являться уровень залегания грунтовых вод, геоморфологическое положение памятника, аэрированность погребенной почвы и характер современного использования территории.

В данном исследовании нам не удалось выявить достоверную связь численности микроорганизмов, общего разнообразия прокариот или доли каких-либо прокариотных филумов в микробиоме с типом погребенной почвы. Возможно, для задач палеоэкологических реконструкций может лучше подойти не анализ общих характеристик микробиома, а детекция конкретных функциональных генов микроорганизмов, связанных с типом растительного покрова, например, симбиотических генов клубеньковых бактерий (Акимова и соавт., 2017), микоризных грибов или паразитов растений.

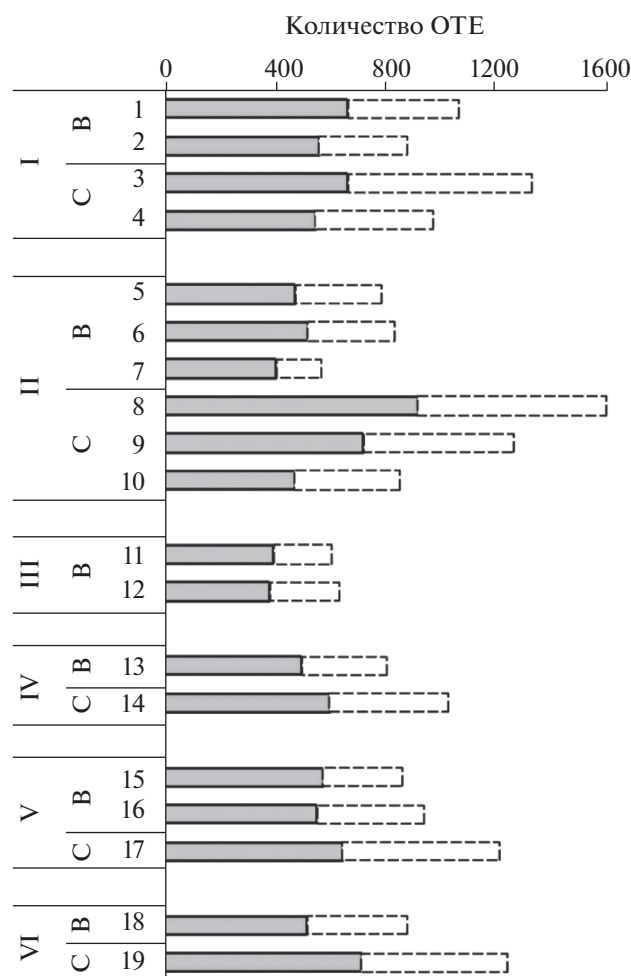


Рис. 3. Оценка разнообразия микробных сообществ: количество обнаруженных ОТЕ (OTUs) и оценка реального количества ОТЕ по индексу Chao1 в микробиомах погребенных (Buried) и современных (Surface) почв. Цифрами отмечены номера площадок и образцов согласно табл. 1.

В погребенных почвах численность микроорганизмов и видовое богатство микробиомов ниже, чем в современных аналогах. Численность и разнообразие микроорганизмов положительно связаны с содержанием углерода и отрицательно — с возрастом почвы. Таксономическая структура прокариот значительно меняется в результате погребения. Доля филума *Verrucomicrobia* в микробиоме сильно снижается при погребении почвы и отрицательно связана с мощностью насыпи. Доли филумов *Nitrospirae*, *Gemmatimonadetes*, *Actinobacteria* и *Chloroflexi* выше в погребенных почвах и положительно связаны с мощностью насыпи.

Настоящее исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда. Полевые исследования и пробоподготовка выполнены в рамках проекта № 16-17-10280, микробиологический анализ — в рамках проекта № 17-16-01057. В

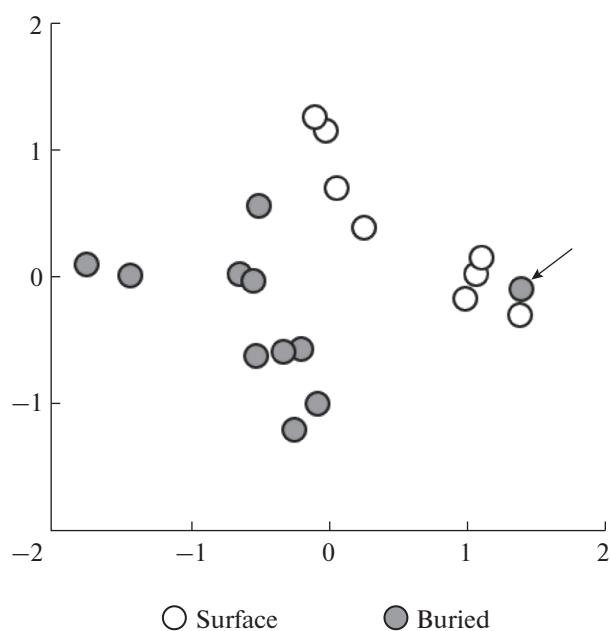


Рис. 4. Двумерные диаграммы сходства микробиомов погребенных (Buried) и современных (Surface) почв, построенные по методу NMDS на основе метрики сходства weighted UniFrac. Цифрами отмечены номера образцов согласно табл. 1. Стрелкой показано положение микробиома почвы Лп-к9п (образец 18).

работе использовано оборудование ЦКП “Геномные технологии, протеомика и клеточная биология” ВНИИСХМ и ЦКП “Функции и свойства почв и почвенного покрова” Почвенного института им. В.В. Докучаева.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Акимова Е.С., Гуменко Р.С., Вершинина З.Р., Баймиев А.Х., Баймиев А.Х. Маркеры для поиска клубеньковых бактерий на основе симбиотических генов // *Микробиология*. 2017. № 86. № 5. С. 621–628.
- Akimova E.S., Gumenko R.S., Verшинina Z.R., Baymiev A.K., Baymiev A.K. Genetic markers for search of rhizobia based on symbiotic genes // *Microbiology*. 2017. V. 86. P. 640–646.
- Аринушкина Е.В. Руководство по химическому анализу почв. М.: Изд-во: МГУ, 1970. 488 с.
- Архангельская Т.А., Прохоров М.В., Мазиров М.А. Годовая динамика температуры пахотных почв палеокриогенных комплексов Владимирского ополья // *Криосфера Земли*. 2008. № 3. С. 80–86.
- Борисов А.В., Демкина Т.С., Демкин В.А. Палеопочвы и климат Ергеней в эпоху бронзы IV–II тысячелетия до н.э. М.: Наука, 2006. 210 с.
- Демкин В.А., Борисов А.В., Демкина Т.С., Хомутова Т.Э., Золотарева Б.Н., Каширская Н.Н., Демкина Е.В. Степные пирамиды Евразии: уникальный архив голоценовых палеопочв // *Палеопочвы и индикаторы континентального выветривания в истории биосферы*. Се-

- рия "Геобиологические системы в прошлом". М.: ПИН РАН, 2010. С. 132–163.
- Демкина Т.С., Хомутова Т.Э., Каширская Н.Н., Стретович И.В., Демкин В.А. Характеристика микробных сообществ степных подкурганых палеопочв сарматского времени (I–IV вв. НЭ) // Почвоведение. 2009. № 7. С. 836–846.
- Demkina T.S., Khomutova T.E., Kashirskaya N.N., Stretovich I.V., Demkin V.A. Characteristics of microbial communities in steppe paleosols buried under kurgans of the Sarmatian time (I–IV centuries AD) // Euras. Soil Sci. 2009. V. 42. P. 778–787.
- Иванов И.В., Песочина Л.С., Семенов В.М. Биоминерализация органического вещества в современных целинных, пахотных, погребенных и ископаемых черноземах // Почвоведение. 2009. № 10. С. 1192–1202.
- Ivanov I.V., Pesochina L.S., Semenov V.M. Biological mineralization of organic matter in the modern virgin and plowed chernozems, buried chernozems, and fossil chernozems // Euras. Soil Sci. 2009. V. 42. P. 1109–1119.
- Полевой определитель почв России. М.: Почв. ин-т им. В.В. Докучаева, 2008. 182 с.
- Рябогина Н.Е., Якимов А.С. Палинологические и палеопочвенные исследования на археологических памятниках: анализ возможностей и методика работ // Вестн. археологии, антропологии и этнографии. 2010. № 2. С. 189–201.
- Соколов И.А. Теоретические проблемы генетического почвоведения. Изд. 2-е. Новосибирск: Гуманитарные технологии, 2004. 288 с.
- Темралева А.Д., Москаленко С.В., Ельцов М.В., Вагатов И.М., Овчинников А.Ю., Гугалинская Л.А., Алифанов В.М., Пинский Д.Л. Устойчивость, морфологическая и молекулярно-генетическая идентификация водорослей погребенных почв // Почвоведение. 2017. № 8. С. 983–991.
- Temraleeva A.D., Moskalenko S.V., El'tsov M.V., Vagapov I.M., Ovchinnikov A.Y., Gugalinskaya L.A., Alifanov V.M., Pinskiy D.L. Stability and morphological and molecular-genetic identification of algae in buried soils // Euras. Soil Sci. 2017. V. 50. P. 952–960.
- Чернов Т.И., Тхакахова А.К., Кутовая О.В. Оценка различных индексов разнообразия для характеристики почвенного прокариотного сообщества по данным метагеномного анализа // Почвоведение. 2015. № 4. С. 462–468.
- Chernov T.I., Tkhakakhova A.K., Kutovaya O.V. Assessment of diversity indices for the characterization of the soil prokaryotic community by metagenomic analysis // Euras. Soil Sci. 2015. V. 48. P. 410–415.
- Blagodatskaya E.V., Khokhlova O.S., Anderson T.H., Blagodatskii S.A. Extractable microbial DNA pool and microbial activity in paleosols of Southern Urals // Microbiology (Moscow). 2003. V. 72. P. 750–755.
- Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data // Bioinformatics. 2014. V. 30. P. 2114–2120.
- Caporaso J.G., Kuczynski J., Stombaugh J., Bittinger K., Bushman F.D., Costello E.K., Fierer N., Gonzalez Peña A., Goodrich J.K., Gordon J.I., Huttlely G.A., Kelley S.T., Knights D., Koenig J.E., Ley R.E., Lozupone C.A., McDonald D., Muegge B.D., Pirrung M., Reeder J., Sevinsky J.R., Turnbaugh P.J., Walters W.A., Widmann J., Yatsunenko T., Zaneveld J., Knight R. QIIME allows analysis of high throughput community sequencing data // Nature Methods. 2010. V. 7. P. 335–336.
- Chandler D.P., Brockman F.J., Bailey T.J., Fredrickson J.K. Phylogenetic diversity of archaea and bacteria in a deep subsurface paleosol // Microbial Ecol. 1998. V. 36. P. 37–50.
- Collwell R.K., Coddington J.A. Estimating terrestrial biodiversity through extrapolation // Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 1994. V. 345. № 1311. P. 101–118.
- Fierer N., Ladau J., Clemente J.C., Leff J.W., Owens S.M., Pollard K.S., Knight R., Gilbert J.A., McCulley R.L. Reconstructing the microbial diversity and function of pre-agricultural tallgrass prairie soils in the United States // Science. 2013. V. 342. P. 621–624.
- Huang Y.T., Lowe D.J., Zhang H., Cursons R., Young J.M., Churchman G.J., Schipper L.A., Rawlence N.J., Wood J.R., Cooper A. A new method to extract and purify DNA from allophanic soils and paleosols, and potential for paleoenvironmental reconstruction and other applications // Geoderma. 2016. V. 274. P. 114–125.
- Kant R., Van Passel M.W., Palva A., Lucas S., Lapidus A., del Rio T.G., Dalin E., Tice H., Bruce D., Goodwin L., Pitluck S., Larimer F.W., Land M.L., Hauser L., Sangwan P., de Vos W.M., Janssen P.H., Smidt H. Genome sequence of *Chthoniobacter flavus* Ellin428, an aerobic heterotrophic soil bacterium // J. Bacteriol. 2011. V. 193. P. 2902–2903.
- Khomutova T.E., Demkina T.S., Borisov A.V., Kashirskaya N.N., Yeltsov M.V., Demkin V.A. An assessment of changes in properties of steppe kurgan paleosols in relation to prevailing climates over recent millennia // Quaternary Res. 2007. V. 67. P. 328–336.
- Khomutova T.E., Demkina T.S., Demkin V.A. Estimation of the total and active microbial biomasses in buried subkurgan paleosols of different age // Microbiology (Moscow). 2004. V. 73. P. 196–201.
- Lozupone C., Lladser M.E., Knights D., Stombaugh J., Knight R. UniFrac: an effective distance metric for microbial community comparison // ISME J. 2011. V. 57. P. 169–172.
- Makeev A., Aseeva E., Rusakov A., Sorokina K., Puzanova T., Khokhlova O., Kust P., Kurbanova F., Chernov T., Kutovaya O., Lebedeva M., Mihailov E. The environment of the Early Iron Age at the southern fringe of the forest zone of the Russian Plain // Quaternary Int. 2018. doi 10.1016/j.quaint.2018.04.002
- Marfenina O.E., Sakharov D.S., Ivanova A.E., Rusakov A.V. Mycological complexes in Holocene and Late Pleistocene paleohorizons and in fragments of paleosols // Euras. Soil Sci. 2009. V. 42. P. 432–439.
- Mitusov A.V., Mitusova O.E., Pustovoytov K., Lubos C.M., Dreibrödt S., Bork H.R. Palaeoclimatic indicators in soils buried under archaeological monuments in the Eurasian steppe: a review // Holocene. 2009. V. 19. P. 1153–1160.

- Sangwan P., Kovac S., Davis K.E.R., Sait M., Janssen P.H. Detection and cultivation of soil *Verrucomicrobia* // Appl. Environ. Microbiol. 2005. V. 71. P. 8402–8410.
- Semenov M.V., Chernov T.I., Tkhakakhova A.K., Zhelezova A.D., Ivanova E.A., Kolganova T.V., Kutovaya O.V. Distribution of prokaryotic communities throughout the Chernozem profiles under different land uses for over a century // Appl. Soil Ecol. 2018. (in press) doi 10.1016/j.apsoil.2018.03.002
- Shen W.-S., Yin R., Lin X.-G., Cao Z.-H. Bacterial communities in a buried ancient paddy soil from the Neolithic Age // Pedosphere. 2010. V. 20. P. 389–398.
- USS Working Group WRB. World Reference Base for Soil Resources 2014: International soil classification system for naming soils and creating legends for soil maps. World Soil Resources Reports No 106. FAO, Rome. 2014. 181 p.
- Walters W.A., Knight R., Fierer N. The under-recognized dominance of *Verrucomicrobia* in soil bacterial communities // Soil Biol. Biochem. 2011. V. 43. P. 1450–1455.
- Zhou J., Xia B., Treves D.S., Wu L.-Y., Marsh T.L., O'Neill R.V., Palumbo A.V., Tiedje J.M. Spatial and resource factors influencing high microbial diversity in soil // Appl. Environ. Microbiol. 2002. V. 68. P. 326–334.

Comparative Analysis of the Structure of Buried and Surface Soils by Analysis of Microbial DNA

T. I. Chernov^{1, *}, A. D. Zhelezova¹, O. V. Kutovaya¹, A. O. Makeev², A. K. Tkhakakhova¹,
N. A. Bgzhba¹, F. G. Kurbanova¹, A. V. Rusakov³, T. A. Puzanova², and O. S. Khokhlova⁴

¹*Dokuchaev Soil Science Institute, Moscow, Russia*

²*Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia*

³*St.-Petersburg State University, St.-Petersburg, Russia*

⁴*Institute of Physicochemical and Biological Problems of Soil Science, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia*

*e-mail: chern-off@mail.ru

Received April 4, 2018

Abstract—The microbiomes of the soils buried under earthwork structures of different age (burial mounds and defensive earth walls) and of surface soils were investigated. Microbial DNA was analyzed by quantitative PCR and sequencing of the 16S rRNA gene amplicons. Both microbial abundance and diversity in buried soils were found to be lower. The taxonomic structure of the buried soil microbiomes differed significantly from that of modern soils: the share of the bacterial phylum *Verrucomicrobia* was very low. The thickness of the earthwork structure should be sufficient to isolate soil from the effect of plant roots; otherwise, the microbiome may exhibit virtually no difference from that of surface soils. The degree of mineralization of stored organic matter (in the absence of inflow of fresh organic compounds) is probably the main factor affecting the structure of microbial communities in buried soils. The study did not reveal any properties of the microbiomes usable as markers of the type of buried soils.

Keywords: burial mounds, paleosoils, soil microbiome structure, DNA, 16S rRNA, *Verrucomicrobia*

АКАДЕМИК МИХАИЛ ВЛАДИМИРОВИЧ ИВАНОВ 06.12.1930–03.07.2018

DOI: 10.1134/S0026365618060113



3 июля 2018 г. ушел из жизни выдающийся микробиолог – академик РАН Михаил Владимирович Иванов.

В течение многих десятилетий Михаил Владимирович являлся признанным лидером важного направления в общей микробиологии – геохимической деятельности микроорганизмов.

После окончания МГУ М.В. Иванов поступил в аспирантуру Института микробиологии АН СССР, с которым связал большую часть своей жизни, пройдя путь от аспиранта до директора Института (1984–2003). С 1992 по 2002 гг. он был Президентом Российского микробиологического общества. С 1969 по 1984 гг. М.В. Иванов работал в Институте биохимии и физиологии микроорганизмов в Пущино, где он создал первую в СССР и вторую в мире лабораторию микробной биогеохимии.

В ИНМИ и в ИБФМ были выполнены исследования, позволившие сформировать направление “Микробная биогеохимия”. Полученные данные по распространению и геохимической активности метанобразующих, метанооксиляющих и сульфатредуцирующих микроорганизмов, а также экспериментальные доказательства воздействия этих организмов на изотопный состав соединений углерода и серы привели к пересмотру моделей круговорота этих элементов в океане. Большую известность по-

лучили работы по изучению роли микроорганизмов в образовании и разрушении месторождений самородной серы. М.В. Ивановым и его учениками обоснована концепция нового раздела биотехнологии – биогеотехнологии – и разработаны принципиально новые технологии использования микроорганизмов при добыче полезных ископаемых, которые прошли промышленную проверку на шахтах Донбасса и Кузбасса и на нефтепромыслах Татарстана и Китая.

За научные исследования в области микробной биогеохимии М.В. Иванов в 1985 г. был удостоен Премии им. С.Н. Виноградского Президиума АН СССР. За цикл исследований по разработке и промышленному внедрению биотехнологических методов увеличения нефтеотдачи пластов путем регуляции микробной деятельности на поздней стадии разработки нефтяных месторождений М.В. Иванов в составе творческого коллектива удостоен Премии Правительства РФ в области науки и техники 1995 г.

Более 15 лет М.В. Иванов возглавлял международную программу “Глобальный биогеохимический цикл серы и влияние на него деятельности человека”, организованную Научным комитетом по проблемам окружающей среды (СКОПЕ) и ЮНЕП.

Результаты исследований М.В. Иванова получили широкое признание: в 1981 г. он был избран членом-корреспондентом, а в 1987 г. действительным членом Академии наук. Академик М.В. Иванов являлся главным редактором журнала “Микробиология” (1984–2018), членом редколлегии журнала “Биотехнология”. М.В. Иванов – автор более 350 научных работ и изобретений, в т.ч. пяти монографий, под его руководством подготовлено и защищено более 20 кандидатских диссертаций; он являлся научным консультантом десятков докторских диссертаций, в течение длительного времени читал курс лекций студентам 5-го курса биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

М.В. Иванов награжден орденами “Знак Почета” (1975 г.), “Октябрьской революции” (1981 г.), “За заслуги перед Отечеством” IV (2000 г.) и III степени (2006 г.).

Коллеги, ученики, друзья и сотрудники ИНМИ РАН и ФИЦ Биотехнологии РАН глубоко скорбят и выражают искреннее соболезнование родным и близким Михаила Владимировича Иванова.

Редакция журнала “Микробиология”

**ОПЕЧАТКА В СТАТЬЕ: “ОКИСЛЕНИЕ МЕТАНА В АНАЭРОБНЫХ
УСЛОВИЯХ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ НАКОПИТЕЛЬНЫХ КУЛЬТУР
ИЗ ГЛУБИННЫХ ОСАДКОВ РАЙОНА ГРЯЗЕВОГО ВУЛКАНА ПЕСЧАНКА
(ЮЖНЫЙ БАЙКАЛ)”**

[МИКРОБИОЛОГИЯ, 2018, ТОМ 87, № 3, с. 242–251]

© 2018 г. А. В. Ломакина^а, Е. В. Мамаева^а, Т. В. Погодаева^а, Г. В. Калмычков^б,
И. А. Хальзов^а, Т. И. Земская^а

^аЛимнологический институт СО РАН, Иркутск, 664033 Россия

^бИнститут геохимии им А.П. Виноградова СО РАН, Иркутск, 664033 Россия

DOI: 10.1134/S0026365618060149

Вместо Fe(II) и Mn(II) должно быть Fe(III) и Mn(IV) по всему тексту.