

ISSN 0026-3656

Том 92, Номер 4

Июль - Август 2023



МИКРОБИОЛОГИЯ

www.sciencejournals.ru



СОДЕРЖАНИЕ

Том 92, номер 4, 2023

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- Paludisphaera mucosa* sp. nov., новый планктомицет семейства *Isosphaeraceae*
из бореального низинного болота
А. А. Иванова, Д. Г. Наумов, И. С. Куличевская, А. А. Мещерякова, С. Н. Дедыш 347
- Desulfobotulus pelophilus* sp. nov. — алкалифильная сульфатовосстанавливающая
бактерия из наземного грязевого вулкана
А. А. Фролова, А. Ю. Меркель, А. А. Кучиерская, А. И. Слободкин 358
- Роль структурных и регуляторных генов, кодирующих белки теплового шока,
в синтезе биосурфактантов бактериями *Rhodococcus pyridinivorans* 5Ap
А. А. Букляревич, М. А. Титок 366
- Влияние гормонов и биогенных аминов на рост и выживание *Enterococcus durans*
Г. И. Эль-Регистан, О. В. Земскова, О. А. Галуза, Р. В. Уланова,
Е. А. Ильичева, А. В. Ганнесен, Ю. А. Николаев 376
- Физиологические особенности *Saccharomyces cerevisiae* при сверхэкспрессии
полифосфатазы Ppx1
Л. В. Трилисенко, А. Я. Валиахметов, Т. В. Кулаковская 396
- Биоразнообразие и метаболические особенности бактериальных сообществ
пищеварительной системы двустворчатого моллюска *Crenomytilus grayanus*
Т. И. Дункай, Е. А. Богатыренко, А. В. Ким 404
- Анализ ключевых детерминант биодegradации нафталина в клетках бактерий
Rhodococcus pyridinivorans 5Ap
А. Ю. Ларченко, М. И. Мандрик 418

Contents

Vol. 92, No. 4, 2023

Experimental Articles

- Paludisphaera mucosa* sp. nov., a Novel Planctomycete of the Family *Isosphaeraceae* from a Boreal Fen
A. A. Ivanova, D. G. Naumoff, I. S. Kulichevskaya, A. A. Meshcheriakova, and S. N. Dedysh 347
- Desulfobotulus pelophilus* sp. nov., an Alkaliphilic Sulfate-Reducing Bacterium from a Terrestrial Mud Volcano
A. A. Frolova, A. Yu. Merkel, A. A. Kuchierskaya, and A. I. Slobodkin 358
- Role of the Structural and Functional Genes Encoding Heat Shock Proteins in Biosurfactant Synthesis by *Rhodococcus pyridinivorans* 5Ap
H. A. Bukliarevich and M. A. Titok 366
- Effect of Hormones and Biogenic Amines on Growth and Survival of *Enterococcus durans*
G. I. El'-Registan, O. V. Zemskova, O. A. Galuza, R. V. Ulanova, E. A. Il'icheva, A. V. Gannesen, and Yu. A. Nikolaev 376
- Physiological Characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* Strain Overexpressing Polyphosphatase Ppx1
L. V. Trilisenko, A. Ya. Valiakhmetov, and T. V. Kulakovskaya 396
- Biodiversity and Metabolic Properties of Bacterial Communities from the Digestive System of the Bivalve *Crenomytilus grayanus*
T. I. Dunkai, E. A. Bogatyrenko, and A. V. Kim 404
- Analysis of the Key Determinants of Naphthalene Degradation by *Rhodococcus pyridinivorans* 5Ap
A. Yu. Larchenka and M. I. Mandryk 418
-
-

PALUDISPHAERA MUCOSA SP. NOV., НОВЫЙ ПЛАНКТОМИЦЕТ СЕМЕЙСТВА ISOSPHERACEAE ИЗ БОРЕАЛЬНОГО НИЗИННОГО БОЛОТА¹

© 2023 г. А. А. Иванова^{a, *}, Д. Г. Наумов^a, И. С. Куличевская^a,
А. А. Мещерякова^{a, b}, С. Н. Дедыш^a

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

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

*e-mail: ivanovastasja@gmail.com

Поступила в редакцию 16.03.2023 г.

После доработки 28.03.2023 г.

Принята к публикации 29.03.2023 г.

Планктомицеты являются типичными обитателями северных болотных экосистем. В настоящей работе новый планктомицет рода *Paludisphaera*, штамм Pla2^T, был выделен из низинного болота бореальной зоны России. Изолят был представлен розово-пигментированными, одиночными или собранными в небольшие группы неподвижными сферическими клетками, размножающимися почкованием. Штамм Pla2^T являлся хемоорганотрофным психротолерантным мезофилом с оптимумом роста при pH 5.5–6 и температуре 15–20°C. Предпочтительными ростовыми субстратами нового планктомицета являлись полисахариды ксилан, ксантановая камедь и фитагель, а также некоторые сахара. Наиболее высокое сходство последовательности гена 16S рРНК штамма Pla2^T (97.9%) наблюдалось с последовательностью планктомицета “*Paludisphaera soli*” JC670^T, выделенного из почвы высокогорья Гималаев. С другими представителями рода *Paludisphaera*, “*P. rhizosphaerae*” JC665^T и *P. borealis* PX4^T, это сходство составляло 97.0 и 93.8% соответственно. Геном штамма Pla2^T, размером 8.21 млн п.о., содержал около 6.5 тыс. белок-кодирующих генов и 3 копии оперона рРНК. Содержание пар Г + Ц в ДНК составляло 67 мол. %. Сходство нуклеотидных последовательностей генома штамма Pla2^T и ранее описанных представителей рода *Paludisphaera* составило от 79.4 до 82.6%. Эти генотипические отличия, а также ряд фенотипических особенностей позволили отнести планктомицет из низинного болота к новому виду рода *Paludisphaera*, *Paludisphaera mucosa* sp. nov. с типовым штаммом Pla2^T (=KCTC92668^T = VKM В-3698^T).

Ключевые слова: планктомицеты, филум *Planctomycetota*, семейство *Isosphaeraceae*, род *Paludisphaera*, низинные болота, деструкция полисахаридов

DOI: 10.31857/S0026365623600104, **EDN:** RKYILM

Семейство *Isosphaeraceae* было сформировано в 2016 г. на основании данных сравнительного анализа последовательностей генов 16S рРНК культивируемых представителей филума *Planctomycetota* (Kulichevskaya et al., 2016). В настоящее время это единственное семейство порядка *Isosphaerales* (класс *Planctomycetia*). В состав семейства входят планктомицеты с клетками сферической формы, которые могут быть собраны в короткие цепочки, длинные нити или образовывать бесформенные агрегаты. Клетки этих планктомицетов покрыты кратериформными структурами, расположенными по всей поверхности. Деле-

ние клеток происходит путем почкования; дочерние клетки неподвижны. Представители семейства *Isosphaeraceae* являются хемоорганотрофными аэробами, хотя некоторые из них способны расти в микроаэробных условиях. Типовым родом данного семейства является род *Isosphaera* с единственным представителем *Isosphaera pallida* IS1B^T (Giovannoni et al., 1987), выделенным из горячего источника Северной Америки. Помимо *Isosphaera*, в состав семейства *Isosphaeraceae* входят роды *Singulisphaera* (Kulichevskaya et al., 2008), *Aquisphaera* (Bondoso et al., 2011), *Paludisphaera* (Kulichevskaya et al., 2016), *Tundrisphaera* (Kulichevskaya et al., 2017) и *Tautonia* (Kovaleva et al., 2019). Еще один род, *Candidatus Nostocoida*, представлен нитчатыми планктомицетами, которые

¹ Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi: 10.31857/S0026365623600104 для авторизованных пользователей.

пока не получены в чистых культурах (Liu et al., 2001; Kulichevskaya et al., 2012).

Размеры геномов представителей *Isosphaeraeae* варьируют от 5.53 млн п.о. у *Isosphaera pallida* IS1B^T до 9.74 млн п.о. у *Singulisphaera acidiphila* DSM 18658^T (Göker et al., 2011; Ivanova et al., 2017). Примечательно, что во всех полных геномах этих бактерий были выявлены плазмиды в количестве от 1 до 4 (Ivanova et al., 2017).

Одной из характерных особенностей планктомицетов семейства *Isosphaeraceae* является наличие гидролитического потенциала. Таксономически охарактеризованные представители этого семейства способны утилизировать широкий спектр полисахаридов растительного и микробного происхождения (Dedysh, Ivanova, 2019). Геномы этих бактерий содержат большое количество генов гликозил-гидролаз, многие из которых не принадлежат ни к одному из известных семейств классификации CAZy (Ivanova et al., 2017).

Планктомицеты семейства *Isosphaeraceae* населяют широкий спектр наземных и водных экосистем, богатых органическим веществом. По данным молекулярных исследований, *Isosphaeraeae* является одной из численно доминирующих групп планктомицетов в бореальных и субарктических торфяных болотах (Serkebaeva et al., 2013; Moore et al., 2015; Dedysh, Ivanova, 2019). Работы по выделению новых микроорганизмов из этих экосистем имели своим результатом описание трех новых родов семейства (Kulichevskaya et al., 2008, 2016, 2017).

Настоящая работа была посвящена изучению планктомицета, штамма Pla2^T, выделенного из низинного болота бореальной зоны России и идентифицированного по данным анализа гена 16S рРНК как представитель рода *Paludisphaera*. В настоящее время этот род включает 3 таксономически описанных представителя — *P. borealis* PX4^T (Kulichevskaya et al., 2016), выделенный из торфа верхового болота, “*P. soli*” JC670^T из почвы высокогорья Гималаев (Kaushik et al., 2020) и “*P. rhizosphaerae*” JC665^T из почвы ризосферы (Lhingjakim et al., 2022).

Целью настоящего исследования явилось изучение совокупности морфологических, экофизиологических и геномных характеристик нового штамма Pla2^T, отличающих его от ранее описанных представителей рода *Paludisphaera*, и установление его таксономического статуса.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Источник выделения и условия культивирования. Штамм Pla2^T был выделен из образца торфяной почвы (рН 7.1), отобранной в августе 2019 г. с глубины 5–10 см профиля низинного болота Ча-

розерское (Вологодская обл., 60°30'42" N, 38°38'59" E). Растительное сообщество места отбора образца было представлено ассоциацией *Carex lasiocarpa* и *Campyllum stellatum*. Электропроводность воды в этом низинном болоте варьировала в диапазоне 236–279 мкСм/см. Содержание общего органического углерода в отобранном образце торфа составляло 66.2%, общего азота — 2.4%. Более подробная характеристика места отбора образца приведена в ранее опубликованном исследовании (Dedysh et al., 2020).

Отобранный образец торфа был использован для получения накопительной культуры микроорганизмов, участвующих в гидролизе одного из ключевых биополимеров болотных экосистем — ксилана. Для этого в стеклянные флаконы объемом 160 мл, содержащие 2 г измельченного стерильными ножницами торфа и 0.1% березового ксилана (“Sigma-Aldrich”), было добавлено 30 мл нативной болотной воды. Инкубацию накопительной культуры проводили при комнатной температуре (20–22°C) в течение 8 нед. Изолят, штамм Pla2^T, был получен путем посева аликвоты (0.2 мл) накопительной культуры на среду M31 следующего состава (г/л дистиллированной воды): КН₂РО₄ — 0.1, N-ацетилглюкозамин — 0.5, пептон — 0.1, дрожжевой экстракт — 0.1, раствор солей Хатнера — 20 мл; раствор витаминов № 6 (Staley et al., 1992) — 1 мл; рН 7.0. В качестве желирующего агента использовали 1% раствор полисахарида микробного происхождения фитагеля (PhytaGel, “Fluka”). Очистку изолята проводили путем его рассева на аналогичную среду с добавлением ампициллина (200 мг/л). Посевы инкубировали при 22°C в течение трех недель.

Идентификация изолята. Выделение тотальной ДНК из клеток штамма Pla2^T производили с использованием набора FastDNA SPIN kit for soil (“Biol 101”, США) в соответствии с рекомендацией производителя. Полученную ДНК использовали в качестве матрицы в ПЦР-амплификации генов 16S рРНК со стандартными бактериальными праймерами 9F/1492R (Lane, 1991). Очистку ПЦР-продукта осуществляли с использованием набора Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (“Promega”, США). Секвенирование проводили на базе ЦКП “Биоинженерия” ФИЦ Биотехнологии РАН. Редактирование полученных нуклеотидных последовательностей проводили с помощью программы BioEdit. Построение филогенетических дендрограмм производили с использованием программного пакета MEGAX (Kumar et al., 2018) методом максимального правдоподобия. Статистическую достоверность дендрограмм рассчитывали с помощью “bootstrap”-анализа путем построения 100 альтернативных деревьев. Определенная в работе последовательность гена 16S рРНК

штамма Pla2^T депонирована в GenBank под номером OQ533426.

Геномное секвенирование и аннотирование. Выделение ДНК для геномного секвенирования осуществляли по стандартному протоколу СТАВ – фенол/хлороформ. Часть полученной геномной ДНК секвенировали на ячейке R9.4 прибора MinION (“Oxford Nanopore”, Великобритания), используя Ligation Sequencing kit 1D согласно рекомендациям производителя. Другая часть геномной ДНК была секвенирована на платформе Illumina MiSeq. Подготовка библиотеки и процедура секвенирования осуществлялись коммерчески, компанией “ReaGen” (Москва, Россия). Гибридная сборка прочтений Illumina и Nanopore была выполнена с использованием программы Unicycler (Wick et al., 2017). Последовательность генома штамма Pla2^T депонирована в GenBank под номером PRJNA940391.

Аннотацию генома проводили с помощью программного пакета PROKKA (Seemann, 2014) и BLASTKoala (Kanehisa et al., 2016). Поиск генов синтеза вторичных метаболитов осуществляли в программе AntiSmash (Medema et al., 2011). Построение геномного дерева производили в программе GTDB-Tk (Chaumeil et al., 2020), путем множественного выравнивания 120 маркерных генов. В анализ были также взяты геномы других охарактеризованных представителей семейства *Isoosphaeraceae*.

Поиск генов гликозил-гидролаз и их гомологов. В работе использовали основанную на гомологии аминокислотных последовательностей каталитических доменов классификацию гликозил-гидролаз CAZy (Drula et al., 2022). Поиск потенциальных гликозил-гидролаз среди белков, закодированных в геноме штамма Pla2^T, проводили с помощью сервера dbCAN3 (<https://bcb.unl.edu/dbCAN2/index.php>), используя три алгоритма: HMMER:dbCAN, DIAMOND:CAZy и HMMER:dbCAN-sub. Все найденные хотя бы одним из алгоритмов белки, распознанные как гликозил-гидролазы семейств GH1–GH173 или как неклассифицированные гликозил-гидролазы (условное семейство GH0 или GH_NC), проверяли вручную на предмет принадлежности семействам GH1–GH180. Список обсуждаемых в работе гликозил-гидролаз штамма Pla2^T приведен во вспомогательной таблице S1. По алгоритму blastp на сайте NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) проводили скрининг пула белков, закодированных в штамме Pla2^T, с помощью 37 планктомицетных белков из 24 семейств: GH1, GH3, GH9, GH17, GH23, GH25, GH26, GH35, GH55, GH62, GH65, GH73, GH76, GH79, GH88, GH92, GH104, GH108, GH125, GH133, GH135, GH136, GH137 и GH144.

Оценка фенотипических характеристик. Определение ростовых характеристик изолята Pla2^T

проводили при культивировании в жидкой среде, указанной выше, во флаконах на шейкере (120 об./мин) в диапазоне температур от 4 до 35°C (с шагом в 5°C), значений pH от 4 до 8 (шаг 0.5) и концентрации NaCl в среде 0–3.0% (шаг 1%). Окислительное и ферментативное использование углеводов определяли с использованием набора API 20NE kit (“bioMérieux”). Энзиматическую активность проверяли с помощью набора API ZYM (“bioMérieux”). Спектр используемых источников углерода определяли на минеральной среде MM следующего состава (г/л дистиллированной воды): KH₂PO₄ – 0.1; (NH₄)₂SO₄ – 0.1; MgSO₄ · 7H₂O – 0.1; CaCl₂ · 2H₂O – 0.02; 1 мл раствора “44” (Staley et al., 1992) и 1 мл витаминов № 6 (Staley et al., 1992). Культивирование проводили в 100 мл флаконах, содержащих 10 мл среды в 3-х повторностях. В качестве источников углерода проверяли сахара (глюкоза, сахароза, ксилоза, лактоза, манноза, раффиноза, мелибиоза) и полимерные соединения (фитагель, крахмал, пектин, ксилан, ксантановая камедь, хитин и микрокристаллическая целлюлоза). Тестируемые субстраты вносили в концентрации 0.5 г/л.

Эксперимент по проверке используемых источников азота проводили на жидкой среде MM, в которой (NH₄)₂SO₄ был заменен одним из следующих соединений в концентрации 0.01%: KNO₃, NaNO₂, мочевиной, дрожжевым экстрактом, N-ацетилглюкозамином, пептоном, хлоридом аммония или одной из аминокислот – изолейцином, аланином, треонином, триптофаном, пролином, валином, фенилаланином, глутамином, лизином, аспарагином, аргинином, глицином.

Рост штамма Pla2^T оценивали путем регулярных измерений оптической плотности культуры на спектрофотометре Eppendorf Biophotometer AG 22331 (“Eppendorf”, Германия) при длине волны 600 нм. Перед измерением культуру гомогенизировали путем активного встряхивания. Чувствительность штамма Pla2^T к антибиотикам проверяли на твердой среде путем наложения на газоны культуры тест-дисков с различными антибиотиками и последующим измерением зон подавления роста.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выделение, анализ морфологии и идентификация нового изолята. Полученный из торфа низинного болота изолят Pla2^T рос в жидкой среде M31 в виде слизевого агрегата розового цвета (рис. 1а). На твердой среде с фитагелем этот штамм формировал бледно-розовые колонии плотной консистенции, несколько погруженные в толщу среды (рис. 1б). Аналогичный эффект деградации фитагеля вокруг формирующихся колоний был ранее описан для *Paludisphaera borealis* PX4^T (Kuli-

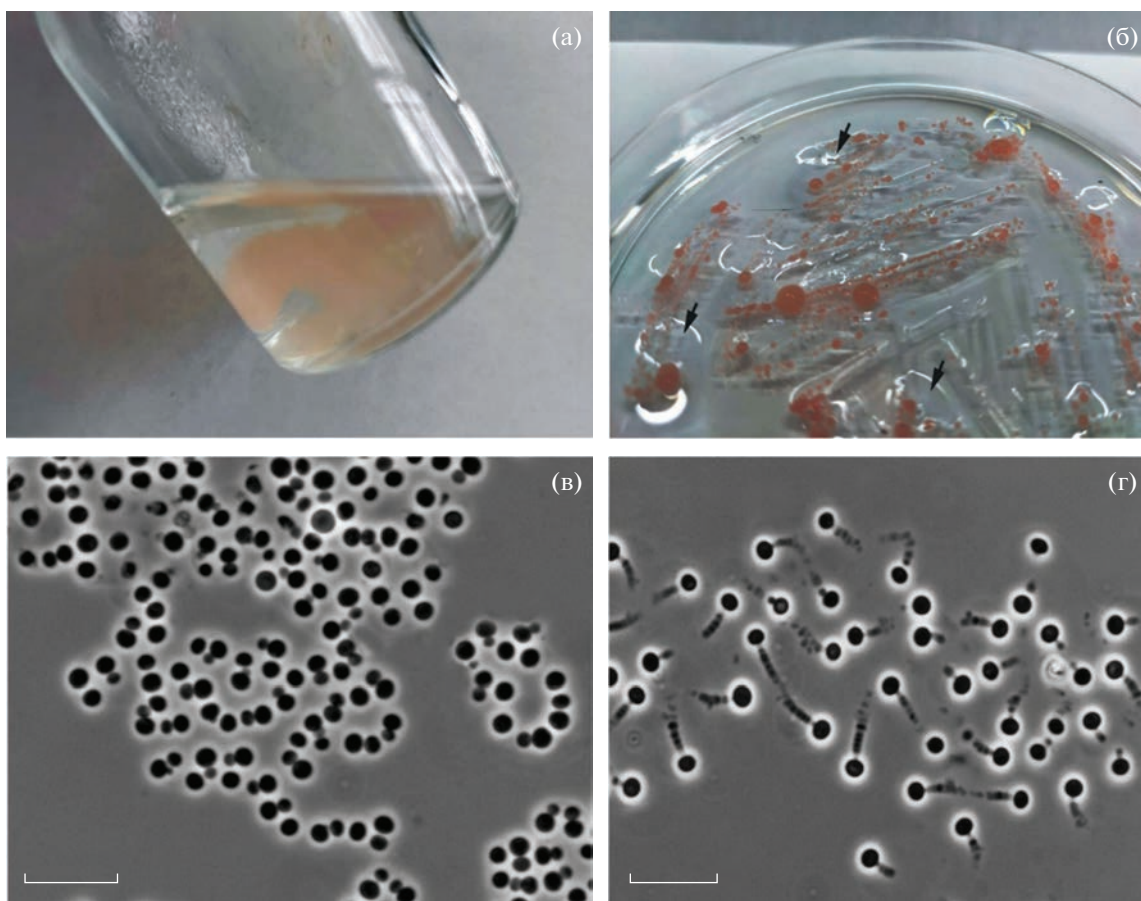


Рис. 1. Особенности роста и морфология клеток штамма *Pla2^T*: (а) – рост культуры в жидкой среде с формированием слизевого агрегата; (б) – рост планктомицета на твердой среде с фитагелем (колонии, погруженные в толщу среды, указаны стрелками); (в) – морфология клеток 10-суточной культуры штамма *Pla2^T* на твердой среде; (г) – клетки со структурами – “выростами” – в старой жидкой культуре планктомицета. Масштабные метки – 10 мкм.

chevskaya et al., 2016). Микроскопический анализ показал, что колонии образованы шаровидными неподвижными клетками размером 1.5–2.8 мкм, которые размножались почкованием (рис. 1в). В культуре редко встречались одиночные клетки, чаще они формировали плотные скопления в виде бесформенных агрегатов. В некоторых старых культурах (более 3-х нед. инкубации) можно было наблюдать образование внеклеточных аморфных структур типа “выростов”, которые, по всей видимости, служат для прикрепления клеток к различным поверхностям, однако условия их формирования определить не удалось (рис. 1г).

Определение и сравнительный анализ последовательности гена 16S рНК штамма *Pla2^T* позволили идентифицировать его в качестве представителя рода *Paludisphaera* (рис. 2). Ближайшим филогенетическим родственником штамма *Pla2^T* со сходством последовательностей гена 16S рНК в 97.9% оказался планктомицет “*Paludisphaera soli*” JC670^T, выделенный из почвы высокогорного участка западной цепи Гималаев (Kaushik et al.,

2020). С другими представителями рода *Paludisphaera* сходство составляло 97.0% в случае “*Paludisphaera rhizosphaera*” JC665^T из ризосферы растения *Erianthus ravennae* (Lhingjakim et al., 2022) и 93.8% с *Paludisphaera borealis* PX4^T, выделенной из торфа верхового болота (Kulichevskaya et al., 2016).

Физиологические характеристики. Штамм *Pla2^T* рос в интервале рН среды от 6 до 8 (оптимум рН 5.5–6.5) и солёности среды от 0 до 2%. Температурный диапазон роста этого планктомицета составил 4–28°C, с оптимумом при 15–20°C. Тесты на отношение к кислороду показали, что штамм *Pla2^T* является строго аэробным микроорганизмом. Попытки вырастить его в анаэробных условиях не увенчались успехом.

Анализ ферментативных свойств штамма *Pla2^T*, проведенный с использованием стандартного набора API ZYM (“bioMérieux”), показал наличие активности ряда ферментов, включая, эстеразу (С4), липазу (С8), лейцин-, валин-цистин-ариламидазы, трипсин, α-химотрипсин, кислую фосфатазу и нафтол-AS-VI-фосфогидролазу. Ак-

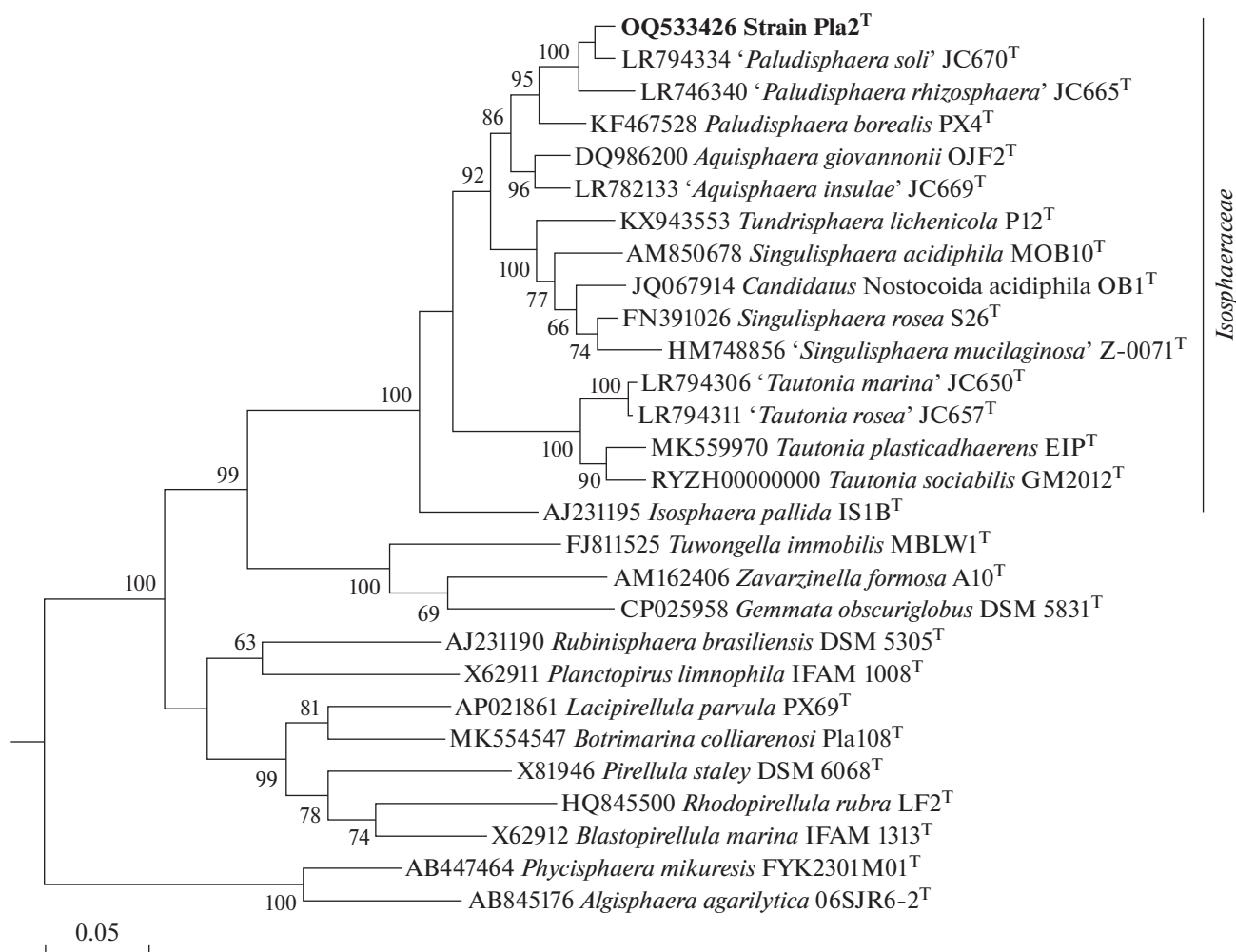


Рис. 2. Филогенетическая дендрогрaмма, построенная методом максимального подобия на основе сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК штамма Pla2^T и других представителей филума *Planctomycetota*. В качестве внешней группы использованы нуклеотидные последовательности генов 16S рРНК пяти апаммох-планктомицетов (AF375994, AF375995, AY254883, AY254882, AY257181). Показаны значения бутстрэп-анализа >60.

тивности щелочной фосфатазы, α - и β -глюкозидазы, α - и β -галактозидазы, β -глюкуронидазы, N-ацетил- β -глюкозаминидазы, α -маннозидазы и α -фукозидазы выявлены не были. По результатам тестов системы API NE новый планктомицет не способен к брожению и к восстановлению нитратов до нитритов и молекулярного азота.

Проверка спектра используемых субстратов показала, что предпочтительными источниками углерода и энергии штамма Pla2^T являются полисахариды ксилан, фитагель, ксантановая камедь. Из простых сахаров хороший рост нового изолята был зафиксирован на глюкозе, маннозе, ксилозе и мелибиозе. В качестве источников азота планктомицет мог использовать нитрат, пептон, дрожжевой экстракт, N-ацетилглюкозамин, лизин, глицин, аспарагин, аспартат, валин, пролин, триптофан, треонин, изолейцин, аргинин.

Проверка устойчивости штамма Pla2^T к ряду антибиотиков выявила устойчивость к хлорамфениколину, гентамицину, ампициллину, канамицину, имипенему, в то же время он оказался чувствительным к тетрациклину.

Геномные характеристики. По итогам секвенирования ДНК штамма Pla2^T на платформе Nanopore было получено 140874 прочтения с общей длиной 1.4 Гб. Дополнительный раунд секвенирования на платформе Illumina MiSeq сгенерировал в общей сложности 10517034 парных прочтений со средней длиной считывания 150 п.о. По итогам гибридной сборки генома удалось получить 9 контигов длиной от 15502 п.о. до 7626770 п.о. Содержание пар Г + Ц в геноме штамма Pla2^T составило 67 мол. % (табл. 1). Геномным аннотатором Prokka было предсказано около 6.5 тыс. потенциальных белок-кодирующих последовательно-

Таблица 1. Отличительные характеристики штамма Pla2^T от ранее описанных видов рода *Paludisphaera*

Характеристика	Штамм Pla2 ^T	“ <i>P. rhizosphaerae</i> ” JC665 ^T	“ <i>P. soli</i> ” JC670 ^T	<i>P. borealis</i> PX4 ^T
Размер клеток, мкм	1.5–2.8	1.8–1.7	1.6–1.7	1.5–2.5
Диапазон pH, (оптимум)	6–8 (5.5–6)	6–9 (7.0)	7.0–8.0 (7.0)	3.8–8.0 (5.0–5.5)
Диапазон T, °C, (оптимум)	4–28 (15–20)	4–34 (26–28)	4–30 (22–25)	4–37 (15–25)
Соленость, %	0–2 (0)	0–2 (0)	0–2 (0)	0–3 (0)
Источники углерода:				
сахароза	–	+	–	+
мелибиоза	+	ND	ND	–
лактоза	–	+	–	+
Источники азота:				
фенилаланин	–	+	+	–
лизин	+	+	+	–
треонин	+	+	+	–
глицин	+	+	+	–
изолейцин	+	+	+	–
глутамин	–	–	+	–
пролин	+	+	+	–
аспартат	+	–	–	–
валин	+	–	–	–
Ферментативная активность:				
щелочная фосфатаза	–	–	+	–
β-галактозидаза	–	–	–	+
N-ацетил-β-глюкозаминидаза	–	–	–	+
Размер генома, млн п.о.	8.21	8.05	7.97	7.65
Г + Ц, мол. %	67	66.4	70.4	66.3
Количество белок-кодирующих генов	6468	6364	6389	5785
Кластеры генов синтеза вторичных метаболитов, шт.	6	6	6	5
Источник выделения	Торф низинного болота	Почва ризосферы	Почва высокогорья	Торф верхового болота

стей, 3 копии оперона рРНК и 93 гена тРНК. Полученная геномная сборка не позволила точно определить количество плазмид. Однако нам удалось выявить сходство части контигов генома штамма Pla2^T с последовательностями плазмид других представителей семейства *Isosphaeraceae*. Наибольшее покрытие и сходство наблюдались с плазмидой PALBO1 из *Paludisphaera borealis* PX4^T (78.6%) и двумя плазмидами неохарактеризованного штамма SH-PL62 (84.5 и 86.9%).

ДНК–ДНК гибридизация *in silico* выявила следующие величины сходства штамма Pla2^T с тремя представителями рода *Paludisphaera*: 24.4 ± 2.3% с “*P. soli*” JC670^T, 22.0 ± 2.3% с “*P. rhizosphaerae*” JC665^T и 21.0 ± 2.3% с *P. borealis* PX4^T. Согласно калькулятору ANI (average nucleotide identity) сходство последовательности генома Pla2^T с такими у представителей рода *Paludisphaera* составило 82.6% (“*P. soli*” JC670^T), 80.8% (“*P. rhizosphaerae*” JC665^T) и 79.4% (*P. borealis* PX4^T). Согласно ныне принятым стандартам, такие величины

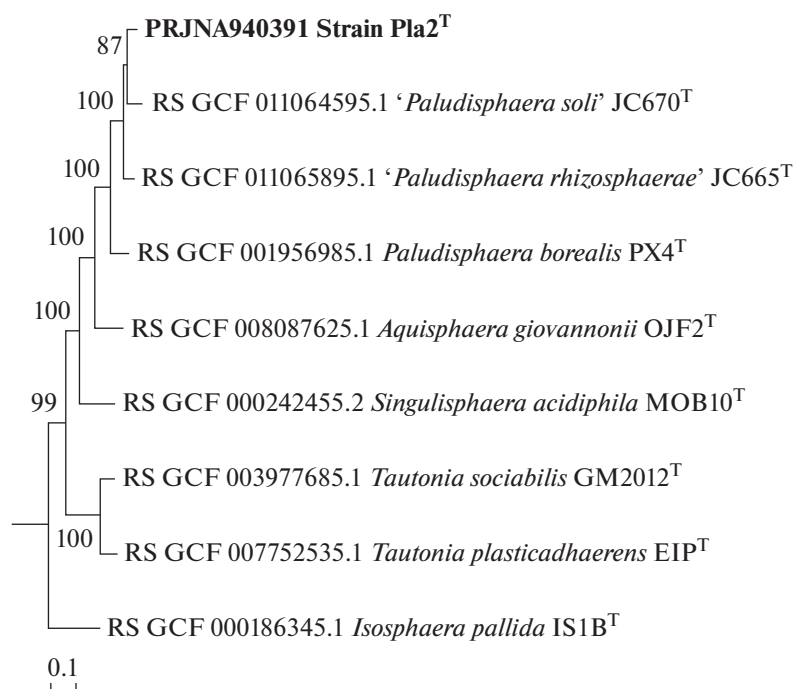


Рис. 3. Филогенетическая дендрограмма, построенная на основании результатов сравнительного анализа 120 конкатенированных последовательностей консервативных маркерных белков штамма Pla2^T и других представителей семейства *Isosphaeraceae*. В качестве внешней группы использованы геномы апамттох-планктомицетов, доступные в базе данных GTDB (Parks et al., 2022).

ANI свидетельствуют о принадлежности изолята к новому виду (Chun et al., 2018). Аналогичное заключение позволил сделать и филогенетический анализ, согласно которому штамм Pla2^T образует общий кластер с другими представителями рода *Paludisphaera* в семействе *Isosphaeraceae* (рис. 3).

Гены, кодирующие основные метаболические пути хемоорганотрофных бактерий, такие как гликолиз, ЦТК, пентозо-фосфатный путь и окислительное фосфорилирование, присутствуют в геноме штамма Pla2^T. У этого планктомицета имеется геномный потенциал для синтеза всех аминокислот. Большинство генов, ответственных за хемотаксис, включая *cheB*, *cheR* и *cheW*, присутствуют в геноме Pla2^T.

Анализ генов, кодирующих синтез вторичных метаболитов. Геномы планктомицетов кодируют большое количество генных кластеров, отвечающих за синтез вторичных метаболитов. Данное свойство делает эту группу микроорганизмов потенциально интересным объектом для биотехнологии (Wiegand et al., 2018). С помощью программы Antismash в геноме штамма Pla2^T был произведен поиск таких генных кластеров. По итогам анализа в геноме было выявлено 6 кластеров, содержащих гены, потенциально кодирующие синтез вторичных метаболитов. Из них три кластера отвечали за синтез поликетидсинтаз (PKS), один кластер отвечал за синтез индола и два за

синтез терпенов. Поликетидсинтазы – ключевые ферменты синтеза биологически-активных веществ поликетидов (Donadio et al., 2007). Ближайшими гомологами PKS штамма Pla2^T были таковые у планктомицетов *P. borealis* PX4^T (100% сходства) и *I. pallida* ATCC43644^T (16% сходства), а также цианобактерии *Scytonema hofmannii* (8% сходства).

Индол повсеместно распространен в природе и представляет собой азотсодержащее гетероциклическое ароматическое соединение. У бактерий индол влияет на образование спор, вирулентность и формирование биопленок. В промышленности используется как усилитель вкуса и отдушка (Ferrer et al., 2022). Ближайшим гомологом индольного генного кластера у Pla2^T был обнаруженный у планктомицета *Aquisphaera giovannonii* OF2^T. Терпены представляют собой структурно наиболее разнообразный класс природных соединений. Их структурное многообразие привело к широкому диапазону функциональных ролей, к которым относятся витамины, каротиноиды, гормоны, ароматические вещества и защитные метаболиты (Helfrich et al., 2019). Для двух терпеновых кластеров Pla2^T гомологичным был генный кластер неохарактеризованного планктомицета семейства *Isosphaeraceae* штамма SH-PL62 со сходством 50 и 100%.

Репертуар гликозил-гидролаз, закодированных в геноме штамма Pla2^T. Поиск потенциальных гликозил-гидролаз с помощью сервера dbCAN3 и дальнейшая их верификация позволили обнаружить 108 белков, принадлежащих 40 семействам: GH2 (2 белка), GH5 (11), GH10 (3), GH13 (11), GH15 (2), GH16 (3), GH18 (2), GH20 (1), GH27 (2), GH29 (3), GH32 (3), GH33 (4), GH36 (2), GH38 (2), GH39 (4), GH43 (5), GH50 (1), GH51 (2), GH57 (4), GH77 (1), GH78 (3), GH94 (2), GH95 (1), GH97 (1), GH99 (1), GH106 (1), GH116 (1), GH127 (5), GH130 (2), GH140 (2), GH141 (2), GH146 (1), GH148 (3), GH151 (1), GH163 (2), GH165 (1), GH171 (1), GH172 (3), GH176 (1) и GH177 (6). Сравнение этого списка семейств с размещенными на сайте CAZy списками семейств, представленных у шести планктомицетов семейства *Isosphaeraceae* (*A. giovannonii* OJF2^T, *I. pallida* ATCC 43644^T, *P. borealis* PX4^T, *S. acidiphila* DSM 18658^T, *T. plasticadhaerens* EIP^T и штамма SH-PL62), выявило 24 семейства гликозил-гидролаз, представители которых не были обнаружены алгоритмами dbCAN3 у штамма Pla2^T. 37 соответствующих планктомицетных белков были использованы нами в качестве запросов для скрининга пула белков штамма Pla2^T, его результаты не позволили обнаружить близких гомологов ни в одном из случаев.

Семейства GH27 и GH36 гликозил-гидролаз находятся в близком родстве (клан GH-D) и объединяют почти исключительно ферменты, обладающие α -D-галактозидазной (КФ 3.2.1.22) активностью (Наумов, 2004, 2011). Гены белков этих двух семейств крайне редко обнаруживаются в геномах планктомицетов. Среди 101 генома, представленных в базе данных CAZy, лишь в 11 закодированы белки семейства GH27 и в 16 — GH36. В семействе *Isosphaeraceae* только у штамма *A. giovannonii* OJF2^T закодирован белок семейства GH27 (GenPept, QEN34490.1). Он на 48% и 28% идентичен с белками Pla2_02372 и Pla2_03258 штамма Pla2^T (между собой они имеют 30% идентичности). Белки Pla2_03686 и Pla2_05159 семейства GH36 из штамма Pla2^T имеют 41% и 37% идентичности на N- и C-концевом фрагментах, которые у второго разделены длинной инсерцией. Оба белка принадлежат одному подсемейству GH36A. Низкий уровень сходства аминокислотных последовательностей позволяет сделать вывод, что все пять генов α -галактозидаз попали в планктомицеты семейства *Isosphaeraceae* в результате независимых горизонтальных переносов. Накопление четырех α -галактозидазных генов у штамма Pla2^T явно имеет адаптивное значение, природа которого пока остается неясной. Проведенные нами тесты позволили подтвердить способность Pla2^T к росту на мелибиозе, анало-

гичные данные имеются в литературе для штамма *A. giovannonii* OJF2^T (Bondoso et al., 2011).

Семейство GH10 гликозил-гидролаз представлено у планктомицетов двумя четко обособленными подсемействами (Наумов, 2016; Наумов и др., 2022). Гены представителей одного из них закодированы в каждом геноме в одной копии, на филогенетическом древе они образуют компактный кластер, а в аминокислотных последовательностях отсутствуют два каталитически важных остатка Glu, что указывает на отсутствие у них какой-либо ферментативной активности. К этому подсемейству относится белок Pla2_04228 из штамма Pla2^T. Гены второго подсемейства закодированы лишь в редких штаммах планктомицетов, но обычно представлены в нескольких копиях. Сюда относятся белки Pla2_03346 и Pla2_05951 из штамма Pla2^T, имеющие 71% идентичности аминокислотных последовательностей и сохранные каталитически значимые остатки. Они, вероятно, обладают эндо- β -ксилазной активностью и частично ответственны за способность штамма Pla2^T к росту на ксилане.

Семейство GH32 гликозил-гидролаз содержит разнообразные β -фруктозидазы. Гены его белков закодированы в 43 из 101 генома планктомицетов, представленного в базе данных CAZy. Ранее нами было предложено разбиение этого семейства на несколько подсемейств (Naumoff, 2001). Белки Pla2_05839 и Pla2_05968 имеют 38% идентичности, содержат оба каталитически важных остатка и относятся к подсемейству GH32b, для бактериальных представителей которого характерно наличие эндо- β -фруктозидазных активностей (расщепление полимеров фруктозы). Белок Pla2_05993 не относится ни к одному из ранее выделенных подсемейств, но находится в близком родстве (71% идентичности) с белком из *P. borealis* PX4^T (GenPept, APW62066.1), для которого нами (Ivanova et al., 2017) на основании необычного строения предполагаемого активного центра было сделано предположение о вероятном отсутствии каталитической активности. Низкий уровень сходства трех рассмотренных белков штамма Pla2^T указывает на независимую эволюционную историю, исключаящую недавнюю дубликацию их генов.

Проведенный нами сравнительный анализ морфологических, физиолого-биохимических и генетических характеристик нового изолята Pla2^T с описанными ранее у представителей рода *Paludisphaera* позволил выявить ряд различий, приведенных в табл. 1. Новый штамм филогенетически наиболее близок к выделенному из почвы планктомицету "*Paludisphaera soli*" JC670^T, но, в отличие от последнего, имеет оптимум роста при 15–20°C и предпочитает условия с более низкими значениями pH. Также имеется ряд разли-

чий в способности к росту на разных источниках углерода и азота. Отличия в температурном и pH-диапазонах роста, а также ростовых субстратах наблюдались и с “*P. rhizosphaerae*” JC665^T. Значения ДНК–ДНК гибридизации и калькулятора ANI соответствуют стандартам таксономической классификации (Chun et al., 2018) для отнесения штамма Pla2^T к новому виду рода *Paludisphaera*.

Диагноз нового вида – *Paludisphaera mucosa* sp. nov.

Paludisphaera mucosa sp. nov. (mu.co'sa. L. fem. adj. *mucosa* слизистый). Шаровидные неподвижные клетки диаметром 1.5–2.8 мкм, одиночные или объединенные в бесформенные скопления. Колонии розово-пигментированные. В жидкой культуре растут в виде слизевого агрегата. Обязательные аэробы. Психротолерантные мезофилы и нейтрофилы с оптимумом роста при 15–20°C и pH 5.5–6. Предпочтительные ростовые субстраты – полисахариды, в том числе ксилан, фитагель и ксантановая камедь. Хороший рост наблюдается на глюкозе, ксилозе, маннозе и мелибиозе. Обнаружены активности ряда ферментов: эстеразы (С4), липазы (С8), лейцин-, валин-цистин-арил-амидазы, трипсина, α-химотрипсина, кислой фосфатазы и нафтол-AS-VI-фосфогидролазы. Активности щелочной фосфатазы, α- и β-глюкозидазы, α- и β-галактозидазы, β-глюкуронидазы, N-ацетил-β-глюкозаминидазы, α-маннозидазы и α-фукозидазы не выявлены. Типовым штаммом вида является штамм Pla2^T (=KСТС92668^T = VKM В-3698^T). Местообитания представителей вида – низинные болота.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

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

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Наумов Д.Г. Филогенетический анализ α-галактозидаз семейства GH27 // Мол. биология. 2004. Т. 38. С. 463–476.

Naumoff D.G. Phylogenetic analysis of α-galactosidases of the GH27 family // Mol. Biol. (Moscow). 2004. V. 38.

P. 388–399.
<https://doi.org/10.1023/B:MBIL.0000032210.97006.de>

Наумов Д.Г. Иерархическая классификация гликозил-гидролаз // Биохимия. 2011. Т. 76. С. 764–780.

Naumoff D.G. Hierarchical classification of glycoside hydrolases // Biochemistry (Moscow). 2011. V. 76. P. 622–635.
<https://doi.org/10.1134/S0006297911060022>

Наумов Д.Г. Семейство GH10 гликозилгидролаз: структура и эволюционные связи // Мол. биология. 2016. Т. 50. С. 151–160.

Naumoff D.G. GH10 family of glycoside hydrolases: structure and evolutionary connections // Mol. Biol. (Moscow). 2016. V. 50. P. 132–140.
<https://doi.org/10.1134/S0026893315060205>

Наумов Д.Г., Куличевская И.С., Дедыш С.Н. Генетические детерминанты утилизации ксилана у планктомицета класса *Phycisphaerae*, *Humisphaera borealis* M1803^T // Микробиология. 2022. Т. 91. С. 300–311.

Naumoff D.G., Kulichevskaya I.S., Dedysh S.N. Genetic determinants of xylane utilization in *Humisphaera borealis* M1803^T, a planctomycete of the class *Phycisphaerae* // Microbiology (Moscow). 2022. V. 91. P. 249–258.
<https://doi.org/10.1134/S002626172230004X>

Bondoso J., Albuquerque L., Nobre M.F., Lobo-da-Cunha A., da Costa M.S., Lage O.M. *Aquisphaera giovannonii* gen. nov., sp. nov., a planctomycete isolated from a freshwater aquarium // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2011. V. 61. P. 2844–2850.
<https://doi.org/10.1099/ijms.0.027474-0>

Chaumeil P.-A., Mussig A.J., Hugenholtz P., Parks D.H. GTDB-Tk: a toolkit to classify genomes with the Genome Taxonomy Database // Bioinformatics. 2020. V. 36. P. 1925–1927.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz848>

Chun J., Oren A., Ventosa A., Christensen H., Arahal D.R., da Costa M.S. et al. Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2018. V. 68. P. 461–466.
<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002516>

Dedysh S.N., Beletsky A.V., Ivanova A.A., Kulichevskaya I.S., Suzina N.E., Philippov D.A. et al. Wide distribution of *Phycisphaera*-like planctomycetes from WD2101 soil group in peatlands and genome analysis of the first cultivated representative // Environ. Microbiol. 2020. V. 23. P. 1510–1526.
<https://doi.org/10.1111/1462-2920.15360>

Dedysh S.N., Ivanova A.A. Planctomycetes in boreal and subarctic wetlands: diversity patterns and potential ecological functions // FEMS Microbiol. Ecol. 2019. V. 95. Art. fyy227.
<https://doi.org/10.1093/femsec/fyy227>

Donadio S., Monciardini P., Sosio M. Polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases: the emerging view from bacterial genomics // Nat. Prod. Rep. 2007. V. 24. P. 1073–1109.
<https://doi.org/10.1039/b514050c>

Drula E., Garron M.-L., Dogan S., Lombard V., Henrissat B., Terrapon N. The carbohydrate-active enzyme database:

- functions and literature // Nucl. Acids Res. 2022. № Database issue (50). P. D571–D577.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkab1045>
- Ferrer L., Mindt M., Suarez-Diez M., Jilg T., Zagorščak M., Lee J.H. et al. Fermentative indole production via bacterial tryptophan synthase alpha subunit and plant indole-3-glycerol phosphate lyase enzymes // J. Agric. Food Chem. 2022. V. 70. P. 5634–5645.
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c01042>
- Giovannoni S.J., Schabtach E., Castenholz R.W. *Isosphaera pallida*, gen. and comb. nov., a gliding, budding eubacterium from hot springs // Arch. Microbiol. 1987. V. 147. P. 276–284.
<https://doi.org/10.1007/BF00463488>
- Göker M., Cleland D., Saunders E., Lapidus A., Nolan M., Lucas S. et al. Complete genome sequence of *Isosphaera pallida* type strain (IS1B) // Stand. Genom. Sci. 2011. V. 4. P. 63–71.
<https://doi.org/10.4056/sigs.1533840>
- Helfrich E.J.N., Lin G.M., Voigt C.A., Clardy J. Bacterial terpene biosynthesis: challenges and opportunities for pathway engineering // Beilstein J. Org. Chem. 2019. V. 15. P. 2889–2906.
<https://doi.org/10.3762/bjoc.15.283>
- 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. P. 412.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00412>
- Kanehisa M., Sato Y., Morishima K. BlastKOALA and GhostKOALA: KEGG tools for functional characterization of genome and metagenome sequences // J. Mol. Biol. 2016. V. 428. P. 726–731.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.11.006>
- Kaushik R., Sharma M., Gaurav K., Jagadeeshwari U., Shabbir A., Sasikala C. et al. *Paludisphaera soli* sp. nov., a new member of the family *Isosphaeraceae* isolated from high altitude soil in the Western Himalaya // Antonie van Leeuwenhoek. 2020. V. 113. P. 1663–1674.
<https://doi.org/10.1007/s10482-020-01471-w>
- Kovaleva O.L., Elcheninov A.G., Toshchakov S.V., Novikov A.A., Bonch-Osmolovskaya E.A., Kublanov I.V. *Tautonia sociabilis* gen. nov., sp. nov., a novel thermotolerant planctomycete, isolated from a 4000 m deep subterranean habitat // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2019. V. 69. P. 2299–2304.
<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003467>
- Kulichevskaya I.S., Ivanova A.A., Detkova E.N., Rijpstra W.I.C., Sinninghe Damsté J.S., Dedysh S.N. *Tundrisphaera lichenicola* gen. nov., sp. nov., a psychrotolerant representative of the family *Isosphaeraceae* from lichen-dominated tundra soils // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2017. V. 67. P. 3583–3589.
<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002172>
- Kulichevskaya I.S., Ivanova A.A., Suzina N.E., Rijpstra W.I.C., Damsté J.S.S., Dedysh S.N. *Paludisphaera borealis* gen. nov., sp. nov., a hydrolytic planctomycete from northern wetlands, and the proposal of *Isosphaeraceae* fam. nov. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2016. V. 66. P. 837–844.
<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000799>
- Kulichevskaya I.S., Ivanova A.O., Baulina O.I., Bodelier P.L.E., Damsté J.S.S., Dedysh S.N. *Singulisphaera acidiphila* gen. nov., sp. nov., a non-filamentous, *Isosphaera*-like planctomycete from acidic northern wetlands // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2008. V. 58. P. 1186–1193.
<https://doi.org/10.1099/ijms.0.65593-0>
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms // Mol. Biol. Evol. 2018. V. 35. P. 1547–1549.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- 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.
- Lhingjakim K.L., Smita N., Kumar G., Jagadeeshwari U., Ahamad S., Sasikala C. et al. *Paludisphaera rhizosphaerica* sp. nov., a new member of the family *Isosphaeraceae*, isolated from the rhizosphere soil of *Erianthus ravennae* // Antonie van Leeuwenhoek. 2022. V. 115. P. 1073–1084.
<https://doi.org/10.1007/s10482-022-01758-0>
- Medema M.H., Blin K., Cimermanic P., De Jager V., Zakrzewski P., Fischbach M.A. et al. AntiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences // Nucl. Acids Res. 2011. V. 39 (Web Server issue) P. W339–W346.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkr466>
- Moore E.K., Villanueva L., Hopmans E.C., Rijpstra W.I.C., Mets A., Dedysh S.N. et al. Abundant trimethylornithine lipids and specific gene sequences are indicative of planctomycete importance at the oxic/anoxic interface in *Sphagnum*-dominated northern wetlands // Appl. Environ. Microbiol. 2015. V. 81. P. 6333–6344.
<https://doi.org/10.1128/AEM.00324-15>
- Naumoff D.G. β -Fructosidase superfamily: homology with some α -L-arabinases and β -D-xylosidases // Proteins. 2001. V. 42. P. 66–67.
[https://doi.org/10.1002/1097-0134\(20010101\)42:1<66::AID-PROT70>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/1097-0134(20010101)42:1<66::AID-PROT70>3.0.CO;2-4)
- Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation // Bioinformatics. 2014. V. 30. P. 2068–2069.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153>
- Serkebaeva Y.M., Kim Y., Liesack W., Dedysh S.N. Pyrosequencing-based assessment of the bacteria diversity in surface and subsurface peat layers of a northern wetland, with focus on poorly studied phyla and candidate divisions // PLoS One. 2013. V. 8. P. e63994.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063994>
- Staley J.T., Fuerst J.A., Giovannoni S., Schlesner H. The order *Planctomycetales* and the genera *Planctomyces*, *Pirellula*, *Gemmata*, and *Isosphaera* // The Prokaryotes / Eds. Balows A. et al. New York, NY: Springer New York, 1992. P. 3710–3731.

Wick R.R., Judd L.M., Gorrie C.L., Holt K.E. Unicycler: resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads // PLoS Comput. Biol. 2017. V. 13. P. e1005595.
<https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005595>

Wiegand S., Jogler M., Jogler C. On the maverick Planctomycetes // FEMS Microbiol. Rev. 2018. V. 42. P. 739–760.
<https://doi.org/10.1002/adsc.201800020>

Paludisphaera mucosa sp. nov., a Novel Planctomycete of the Family *Isosphaeraceae* from a Boreal Fen

A. A. Ivanova^{1, *}, D. G. Naumoff¹, I. S. Kulichevskaya¹, A. A. Meshcheriakova^{1, 2}, and S. N. Dedysh¹

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

²Moscow State University, Faculty of Soil Science, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: ivanovastasja@gmail.com

Received March 16, 2023; revised March 28, 2023; accepted March 29, 2023

Abstract—Planctomycetes are common inhabitants of northern wetland ecosystems. In this study, a new planctomycete of the genus *Paludisphaera*, strain Pla2^T, was isolated from a boreal fen in Russia. The novel isolate was represented by nonmotile, pink-pigmented, spherical cells that multiplied by budding and occurred singly or were assembled in small aggregates. Strain Pla2^T was a chemoorganotrophic, psychrotolerant mesophile with a growth optimum at pH 5.5–6 and 15–20°C. The preferred growth substrates were polysaccharides, including xylan, xanthan gum, and phytigel, as well as some sugars. The 16S rRNA gene sequence of strain Pla2^T displayed the highest similarity (97.9%) to that of ‘*Paludisphaera soli*’ JC670^T isolated from highland soil of the western Himalayas. With other members of the genus *Paludisphaera*, “*P. rhizosphaerae*” JC665^T and *P. borealis* PX4^T, this similarity was 97.0 and 93.8%, respectively. The genome of strain Pla2^T was 8.21 Mb in size and contained about 6500 protein-coding genes and 3 copies of the rRNA operon. The DNA G + C content was 67 mol %. The average nucleotide identity between the genome sequence of strain Pla2^T and those of previously described members of the genus *Paludisphaera* was between 79.4 and 82.6%. This genotypic distance as well as several phenotypic differences allowed classifying the new planctomycete from a fen as representing a novel species of the genus *Paludisphaera*, *Paludisphaera mucosa* sp. nov. with the type strain Pla2^T (=KCTC92668^T = VKM B-3698^T).

Keywords: Planctomycetes, phylum Planctomycetota, family Isosphaeraceae, genus Paludisphaera, fens, polysaccharide degradation

DESULFOBOTULUS PELOPHILUS SP. NOV. – АЛКАЛИФИЛЬНАЯ СУЛЬФАТВОССТАНАВЛИВАЮЩАЯ БАКТЕРИЯ ИЗ НАЗЕМНОГО ГРЯЗЕВОГО ВУЛКАНА

© 2023 г. А. А. Фролова^{а, *}, А. Ю. Меркель^а, А. А. Кучиерская^а, А. И. Слободкин^а

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

*e-mail: romana2804@gmail.com

Поступила в редакцию 03.03.2023 г.

После доработки 24.03.2023 г.

Принята к публикации 25.03.2023 г.

Алкалифильная сульфатвосстанавливающая анаэробная бактерия (штамм H1^T) была выделена из наземного грязевого вулкана Таманского полуострова. Клетки изолята представляют собой грамотрицательные подвижные вибрионы толщиной 1 мкм и длиной 2.0–2.5 мкм. Штамм H1^T растет при температуре 14–42°C (оптимум 37°C), pH 8.5–10.5 (оптимум 9.5) и концентрации NaCl 0.5–6% (вес/об.) (оптимум 0.5–1.5%); использует пируват, лактат, бутират, капроат, каприлат и пеларгонат в качестве донора электронов и элементную серу, сульфит и сульфат в качестве акцептора электронов. Сбраживает пируват и лактат. Не способен к росту в присутствии кислорода. Штамм H1^T не использует тиосульфат, ДМСО, фумарат, нитрат, нитрит, арсенат, селенит и Fe(III) в качестве акцептора электронов, не диспропорционирует элементную серу, тиосульфат и сульфит и не сбраживает глюкозу, фруктозу, сахарозу, трегалозу, галактозу, ксилозу, фумарат, цитрат, дрожжевой экстракт и пептон. В жирнокислотном составе клеток преобладают C_{20:0} (54.2%), C_{22:0} (24.6%) и C_{18:0} (11.1%). Геном штамма H1^T имеет размер 3.66 Мп и содержание G + Ц 51.1%. В геноме содержатся гены, кодирующие ферменты диссимиляционной сульфатредукции и β-окисления жирных кислот. По результатам анализа гена 16S рРНК ближайшим родственным микроорганизмом штамма H1^T является *Desulfobotulus mexicanus* (98.3% сходства). На основании фенотипических характеристик и данных филогенетического анализа предлагается отнести данный изолят к новому виду рода *Desulfobotulus*, как *Desulfobotulus pelophilus* sp. nov. с типовым штаммом H1^T (=DSM 112796^T = VKM B-3697^T = UQM 41590^T).

Ключевые слова: алкалифил, сульфатредукция, анаэробные бактерии, грязевой вулкан, *Desulfobacterales*

DOI: 10.31857/S0026365623600074, **EDN:** RJZOJS

Грязевой вулканизм – широко распространенное геологическое явление, играющее значительную роль в балансе метана в атмосфере (Mazzini, Etiope, 2017). Наземные грязевые вулканы (НГВ) образуются за счет выброса частиц глины и ила, брекчий, жидкостей и газов из глубоких осадочных слоев. Полуостров Тамань является одним из регионов с наиболее интенсивным грязевым вулканизмом. В Керченско-Таманской грязевулканической провинции находятся более 100 действующих НГВ (Гнатенко и соавт., 1986; Холодов и соавт., 2012). Щелочные условия флюидов этих местообитаний (значения pH выше 8.5) объясняют развитие в них алкалифильных микроорганизмов (Khotmyakova et al., 2020, 2022; Frolova et al., 2021a; Фролова и соавт., 2023). В НГВ анаэробные прокариоты участвуют в биогеохимических круговоротах углерода, серы и других элементов. Сульфатвосстанавливающие бактерии могут принимать участие в анаэробном окислении метана как синтрофные партнеры метано-

трофных архей (Knittel, Voetius, 2009). Данные о культивировании сульфатредуцирующих бактерий из НГВ немногочисленны (Alain et al., 2006; Frolova et al., 2021b), однако использование молекулярных подходов показывает, что в этих микробных сообществах постоянно присутствуют микроорганизмы, филогенетически родственные известным сульфатредукторам (Tu et al., 2017; Ren et al., 2018; Merkel et al., 2021). Одной из крупнейших и старейших таксономических групп сульфатредукторов является порядок *Desulfobacterales*, характерной особенностью которого является использование жирных кислот в качестве источника углерода и энергии (Kuever et al., 2015). Представители *Desulfobacterales* обитают в анаэробных осадках пресноводных, морских и содовых водоемов и включают бактерии различных физиологических групп (алкалифильные, психрофильные, галофильные магнитотактические, углеводородоразлагающие). Согласно List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature, этот поря-

док включает 37 родов с официально опубликованными названиями (Parte et al., 2020).

В настоящей работе приводится описание штамма анаэробной солетолерантной облигатно-алкалофильной сульфатовосстанавливающей бактерии, выделенной из наземного грязевого вулкана полуострова Тамань и отнесенной нами к новому виду рода *Desulfobotulus*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Источник выделения. Образец грязевулканического флюида, содержащего твердую и жидкую фракции, был отобран в мае 2017 г. из активного грифона наземного грязевого вулкана Гнилая Гора, Таманский полуостров, Краснодарский край, РФ. GPS координаты – 45.251° N, 37.436° E. Температура в месте отбора проб составляла 21°C, pH 8.5, концентрация Cl⁻ – 15.7 мМ, концентрация SO₄²⁻ – 5.3 мМ. Образец был отобран анаэробно в пластиковую пробирку с плотно закручивающийся крышкой и в таком виде перевезен в лабораторию для дальнейших экспериментов.

Среды и культивирование. Для выделения и рутинного культивирования штамма H1^T использовали анаэробную восстановленную солоноватую среду следующего состава (на 1 л дистиллированной воды): 0.33 г KН₂РO₄, 0.33 г NH₄Cl, 0.33 г KCl, 0.33 г CaCl₂ · 6H₂O, 2.00 г NaHCO₃, 0.33 г MgCl₂ · 6H₂O, 20.00 г NaCl, 0.001 г резазурина, 1 мл витаминов (Wolin et al., 1963) и 1 мл микроэлементов (Slobodkin et al., 2012). Среду готовили кипячением и охлаждением под непрерывным током N₂, после чего добавляли восстанавливающий агент (Na₂S · 9H₂O). Приготовленную среду разливали по 10 мл в пробирки Хангейта объемом 17 мл и автоклавировали при 121°C в течение 60 мин. После стерилизации pH среды был 9.0. Пируват натрия (10 мМ) и сульфат натрия (14 мМ) добавляли из стерильных концентрированных растворов перед инокуляцией образца.

Фенотипические характеристики. Изучение морфологии и подвижности клеток проводили в жидкой среде после 48 ч инкубации, используя микроскоп Zeiss Primo Star с фазово-контрастным устройством. Ростовые эксперименты проводили в трехкратной повторности. Для морфологической, физиологической и метаболической характеристики штамм H1^T культивировали на среде, применявшейся для выделения, если не указано иное. Определение диапазонов температуры, pH и солёности проводились на восстановленной среде с пируватом и сульфатом. Диапазоны солёности измеряли при концентрации NaCl 0–10% (вес/об.). Различные значения pH задавали с помощью следующих буферов (Good's buffers, "Sigma-Aldrich", 30 г/л): MES (pH 6 и 6.5),

HEPES (pH 7 и 7.5), Tricine (pH 8.0 и 8.5), CAPSO (pH 9.0 и 9.5) и CAPS (pH 10 и 11). Эксперименты с серосодержащими соединениями и кислородом проводили на невозобновленной среде.

Аналитические процедуры. Определение газообразных продуктов метаболизма проводили методом газовой хроматографии на колонке HayeSep N 80/100 mesh при 40°C и скорости потока 20 мл/мин. В качестве газа-носителя использовали аргон. Сульфид определяли колориметрически с диметил-*n*-фенилендиамином (Tüper, Schlegel, 1964).

Состав клеточных жирных кислот. Состав жирных кислот определяли, как указано ранее (Slobodkina et al., 2020), используя прямое метилирование лиофильно высушенной биомассы бактерий и хромато-масс-спектрометрический анализ; содержание определяли по методу внутренней нормализации по площади пиков полного ионного тока метиловых эфиров жирных кислот.

Выделение ДНК, секвенирование и анализ полного генома. Выделение ДНК для определения нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК и полногеномного секвенирования проводили с помощью FastDNA Spin Kit ("MP Bio"), следуя протоколу производителя. Ген 16S рРНК амплифицировали, используя универсальные бактериальные праймеры 27F, 357F, 530F, 1114F, 342R, 519R и 1492R (Weisburg et al., 1991). Секвенирование продуктов ПЦР проводили методом Сэнгера. Предварительный филогенетический скрининг сходства последовательностей генов 16S рРНК проводили по базе данных GenBank (Benson et al., 1999) с помощью программы BLAST (Altschul et al., 1990). Для более точного определения филогенетического положения изолята нуклеотидную последовательность гена 16S рРНК выравнивали с последовательностями референтных штаммов ближайших родственных микроорганизмов с помощью программы Clustal W (Thompson, 1997). Филогенетический анализ выполняли при помощи программы MEGA 7.0 (Kumar et al., 2016). Статистическую достоверность ветвления оценивали с помощью "bootstrap-анализа" 1000 альтернативных филограмм (Felsenstein, 1985), построенных методами, входящими в пакет программ для филогенетического анализа MEGA 7.

Геном штамма H1^T секвенировали, используя систему MiSeq ("Illumina", San Diego, California, США). Поиск генов и аннотацию проводили с использованием сервера RAST (Brettin et al., 2015). Средство просмотра SEED использовалось для распределения предсказанных генов по категориям подсистем (Overbeek et al., 2014). Таксономическое положение штамма H1^T уточняли двумя методами: средней идентичностью нуклеотидов (ANI), предоставленной калькулятором EzBioCloud ANI calculator (<https://www.ezbiocloud.net/tools/ani>)

(Yoon et al., 2017) и *in silico* ДНК–ДНК гибридизацией, предоставленной калькулятором Genome-to-Genome Distance Calculator (<http://ggdc.dsmz.de>) (Meier-Kolthoff et al., 2013).

Нуклеотидная последовательность гена 16S рРНК штамма Н1^Т депонирована в GenBank/EMBL под номером MW872673.

Полногеномная последовательность штамма Н1^Т депонирована в GenBank/EMBL под номером JARFPW010000000.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Получение чистой культуры. Накопительные культуры были получены путем внесения природного образца (около 10% об.) в стерильную анаэробную среду, содержащую пируват и сульфат. После инкубации накопительных культур при 30°C в течение 2 сут наблюдался значительный микробный рост. После трех последовательных пересевов (5% об.) культуру рассеивали методом 10-кратных серийных разведений на жидкой среде того же состава. В последнем разведении, показавшем рост (10^{-8}), наблюдался только один морфологический тип клеток. Десятикратные разведения были повторены еще дважды, и культура, выросшая в последнем разведении, получила обозначение штамм Н1^Т. Результаты секвенирования гена 16S рРНК подтвердили чистоту культуры. Попытки получить рост колоний в анаэробных условиях на твердой среде методом roll-tube или в толще 1% Gelrite gellan gum или 1% агара, не привели к положительным результатам.

Клетки штамма Н1^Т представляют собой вибрионы толщиной 1 мкм и длиной 2.0–2.5 мкм, растущие одиночно и подвижные за счет одиночного полярного жгутика. Образования эндоспор не наблюдалось на протяжении 30 сут культивирования.

Физиология роста. Штамм Н1^Т способен расти при температурах от 14 до 42°C, с оптимумом при 37°C. Рост не наблюдался при 50°C и выше и при 10°C и ниже, при инкубации в течение 20 сут. Диапазон рН для роста составляет 8.5–10.5 (оптимум 9.5), роста не отмечалось при рН 8.0 и ниже или 11.0 и выше. Штамм Н1^Т способен расти при концентрации NaCl в среде от 0.5 до 6.0% (вес/об.); при 7% NaCl и выше роста не наблюдалось.

Доноры и акцепторы электронов. Штамм Н1^Т способен использовать для роста органические кислоты в качестве доноров и соединения серы в качестве акцепторов электронов. Добавление дрожжевого экстракта (0.2 г/л) незначительно стимулировало рост, однако не являлось необходимым. Максимальная концентрация клеток (около 5×10^7 кл./мл) наблюдалась как при росте с пируватом и сульфатом, так и при культивировании с

пируватом в отсутствие акцептора. Пируват, лактат (10 мМ), бутират (10 мМ), капроат (5 мМ), каприлат (1 мМ) и пеларгонат (1 мМ) использовались штаммом Н1^Т в качестве доноров электронов в присутствии сульфата в качестве акцептора электронов. Продуктами реакции в этом случае являлись сульфид и ацетат. Следующие соединения не использовались в качестве доноров электронов (10 мМ, если не указана иная концентрация) с сульфатом в качестве акцептора: ацетат, формиат, формиат в присутствии ацетата (2 мМ) в качестве источника углерода, пропионат, сукцинат, фумарат, малат, метанол, этанол, бутанол, изобутанол, глицерин, рибоза, глюкоза, фруктоза, трибутират, валерат, пальмитат (1 мМ), стеарат (1 мМ), олеат (1 мМ), триолеат (1 мМ), дрожжевой экстракт (2 г/л), молекулярный водород ($H_2 : CO_2, 80 : 20\%$ в газовой фазе). Элементарная сера (5 г/л), сульфит (10 мМ) и сульфат (14 мМ) использовались штаммом Н1^Т в качестве акцепторов электронов в присутствии бутирата в качестве донора электронов. Тиосульфат, диметилсульфоксид (ДМСО), фумарат, нитрат, нитрит, арсенат, селенит (все в концентрации 10 мМ) и ферригидрит (слабокристаллический оксид Fe(III), 90 мМ) не использовались штаммом Н1^Т в качестве акцепторов электронов в присутствии бутирата как донора электронов. Штамм Н1^Т не способен к росту в аэробных и микроаэробных (до 3% кислорода) условиях.

Пируват и лактат (10 мМ каждый) сбраживались штаммом Н1^Т с образованием ацетата и водорода в качестве конечных продуктов. Штамм Н1^Т не сбраживал формиат, фумарат, цитрат, сукцинат, фруктозу, сахарозу, трегалозу, галактозу, ксилозу, пептон и дрожжевой экстракт в течение 3 нед. инкубации. Штамм Н1^Т не способен к диспропорционированию элементарной серы, тиосульфата и сульфита как в присутствии ферригидрита, служащего химической ловушкой для сульфида, так и в его отсутствие при культивировании в бутылки с большой газовой фазой.

Состав клеточных жирных кислот. Клеточные жирные кислоты штамма Н1^Т были представлены смесью неразветвленных насыщенных и ненасыщенных кислот: C_{20:0} (54.2%), C_{22:0} (24.6%) и C_{18:0} (11.1%). Также были обнаружены C_{16:0} (3.8%), C_{24:0} (2.4%), C_{18:1} ω7c (2.2%) и C_{18:1} ω9c (1.8%).

Филогения. Нуклеотидные последовательности гена 16S рРНК штамма Н1^Т, полученные путем амплификации с универсальными бактериальными праймерами и в ходе полногеномного секвенирования, были идентичны. Сравнение 1539 нуклеотидов последовательности гена 16S рРНК штамма Н1^Т с нуклеотидными последовательностями, размещенными в базе данных GenBank (Benson et al., 1999), показали, что изолят

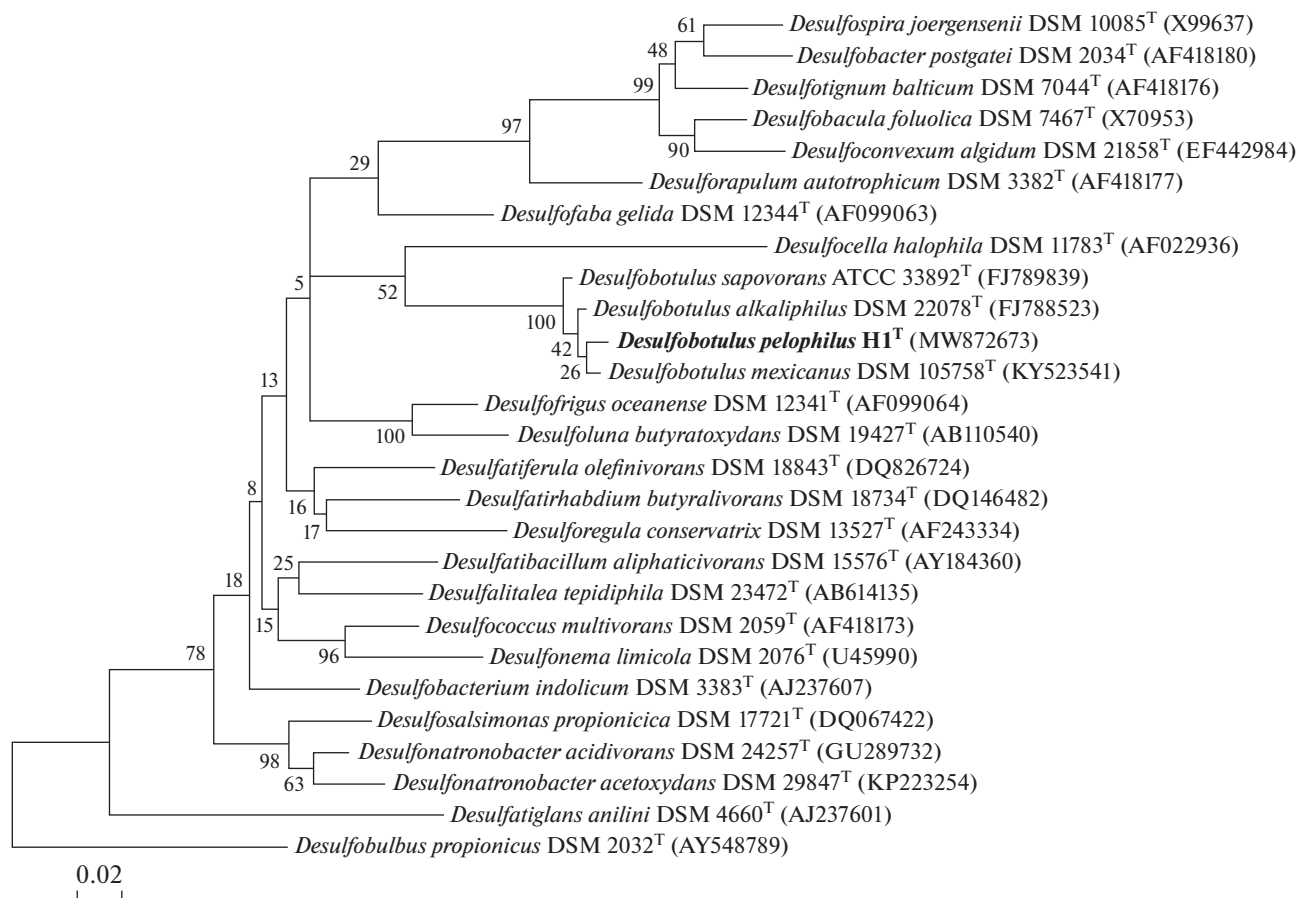


Рис. 1. Филогенетическое дерево, основанное на последовательностях гена 16S рНК, показывающее положение штамма H1^T и родственных ему микроорганизмов. Дерево было реконструировано методом maximum-likelihood. Деревья, построенные с помощью алгоритмов neighbor-joining и minimum-evolution, отображали одинаковую топологию. Каждое число указывает значение начальной загрузки из 1000 повторностей. Масштабная метка – 0.020 замен на нуклеотидное положение. Идентификационные номера GenBank указаны в скобках.

принадлежит к роду *Desulfobotulus* класса *Deltaproteobacteria* с 98.31% сходства с геном 16S рНК с *Desulfobotulus mexicanus* (Pérez-Bernal et al., 2020). Реконструкция филогенетического дерева гена 16S рНК показала, что штамм H1^T представляет собой монофилетическую ветвь, четко отделенную от наиболее близких видов (рис. 1).

Попарное сравнение средней нуклеотидной идентичности (ANI) генома штамма H1^T и ближайшего родственного ему микроорганизма, *D. mexicanus* (DSM 105758^T), составляло 88.7%. Значение *in silico* ДНК–ДНК гибридизации H1^T и *D. mexicanus* (DSM 105758^T) по рекомендованной формуле 2 составляло 26.10%. Оба этих значения существенно ниже предлагаемого для прокариот порогового значения для разграничения на уровне видов, составляющего 95–96% (для ANI) и 70% (для ДНК–ДНК гибридизации) (Meier-Kolthoff et al., 2013, Rodriguez, Konstantinidis, 2016).

Общие характеристики генома. Геном штамма H1^T, собранный из 86 контигов, имеет общую

длину 3656775 нт и значение N50 160366 нт. Содержание Г + Ц геномной ДНК составляет 51.1%. Геном содержит 3783 нуклеотидных последовательностей, кодирующих белки, и 55 генов РНК. Большинство аннотированных генов отвечает за синтез аминокислот и производных (151), метаболизм белков (147), метаболизм углеводов (101), дыхание (83), кофакторы, витамины, простетические группы и образование пигментов (55).

Геном штамма H1^T содержит гены пути Эмбдена–Мейерхофа–Парнаса, включая NAD-зависимую глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназу (WP_265423680), триозофосфат изомеразу (WP_265423679), глюкозо-6-фосфат изомеразу (WP_265426043), фосфоглицерат киназу (WP_265423283), енолазу (WP_265423752), пируваткиназу (WP_265423750), 6-фосфофруктокиназу (WP_265423438), фруктозо-бифосфаталядолазу (WP_265423362) и фосфоглицерат мутазу (WP_265426113). Однако ген, кодирующий гексокиназу, катализирующую фосфорилирование

глюкозы на самой первой стадии гликолиза, отсутствует. Цикл трикарбоновых кислот в геноме штамма H1^T закодирован не полностью, отсутствуют гены малатдегидрогеназы, сукцинатдегидрогеназы и сукцинил-КоА синтетазы.

Геном штамма H1^T содержит полный набор генов, необходимых для осуществления процесса диссимиляционной сульфатредукции (Pereira et al., 2011), включая сульфат аденилилтрансферазу Sat (WP_26542348), неорганическую пирофосфатазу (WP_265426333), AprA (WP_265426087) и AprB (WP_265426088) субъединицы APS редуктазы, компоненты диссимиляторной сульфитредуктазы DsrABCD (WP_26542589–WP_265425892) и электрон-переносящие комплексы DsrMKJOP и QmoABC (WP_265425905–WP_265425909).

В геноме штамма H1^T были найдены два гена, кодирующие молибдоптериновую оксидоредуктазу (WP_265423973 и WP_265426274). Биохимическая функция этих ферментов не ясна. Вероятнее всего, они не являются каталитической субъединицей полисульфидредуктазы *psrA*, т.к. характерное для полисульфидредуктазы генное окружение для данных молибдоптериновых оксидоредуктаз в геноме штамма H1^T отсутствует. Геном штамма H1^T кодирует ферменты роданазу (WP_265423671) и *hdr*-подобный комплекс с субъединицами *hdrA* (WP_265423457), *hdrB* (WP_265425454) и *hdrC* (WP_265425453), которые участвуют в окислительно-восстановительных реакциях серных соединений, однако их биохимический механизм в настоящее время изучен недостаточно (Zhang et al., 2021).

В геноме штамма H1^T содержатся все гены, необходимые для β-окисления жирных кислот, включая ацил-КоА дегидрогеназу (WP_265423377, WP_265423535, WP_265424553, WP_265424646, WP_265425157, WP_265425230, WP_265425661, WP_265425744, WP_265426163), эноил-КоА гидратазу (WP_265423968, WP_265425159, WP_265425648, WP_265425692), 3-гидроксиацил-КоА дегидрогеназу (WP_265423389, WP_265425692) и 3-кетоацил-КоА тиолазу (WP_265423278, WP_265424057, WP_265423533, WP_265425693).

В геноме штамма H1^T закодированы все компоненты нитрогеназного комплекса для фиксации молекулярного азота, включая Mo-Fe- и Fe-белки нитрогеназы *nifHDK* (WP_265425310–WP_265425314), а также белки, необходимые для ее сборки и регуляции: *nifENB* (WP_265425306–WP_265425309), *nifU* (WP_26542406), *nifS* (WP_265424064), *NifA* (WP_265424773) и *NtrXY* (WP_265425703–WP_265425704).

Геном штамма H1^T содержит гены каталазы (WP_265425612), супероксиддисмутазы (WP_265425250), хинолоксидазы *CydAB* (WP_265424027–WP_265424028), а также не-

сколько копий генов белков, участвующих в защите от окислительного стресса, таких как рубредоксин *Rbo* (WP_265424029, WP_265425910) и рубреритрин *Rbr* (WP_265425583), которые, предположительно, выполняют эту функцию у *Desulfovibrio vulgaris* (Lumppio et al., 2001).

ОБСУЖДЕНИЕ

Штамм H1^T выделен из наземного грязевого вулкана Таманского полуострова. Он представляет собой анаэробную алкалофильную мезофильную сульфатвосстанавливающую бактерию.

Филогенетический анализ на основе гена 16S рРНК показал, что штамм H1^T образует отдельную линию в пределах рода *Desulfobotulus* (Kuever et al., 2005), относящегося к семейству *Desulfobacteraceae* отряда *Desulfobacterales* филума *Pseudomonadota*. На момент публикации род *Desulfobotulus* представлен тремя видами с валидно опубликованными именами: *D. sapovorans* (Kuever et al., 2005), *D. alkaliphilus* (Sorokin et al., 2010) и *D. mexicanus* (Pérez-Bernal et al., 2020). Идентичность нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК между штаммом H1^T и *D. mexicanus* (DSM 105758^T) составляет 98.31%. Попарные сравнения средней нуклеотидной идентичности (ANI) и *in silico* ДНК–ДНК гибридизации между штаммом H1^T и *D. mexicanus* (DSM 105758^T) также позволяют отнести изолят к новому виду рода *Desulfobotulus*.

Представители рода *Desulfobotulus* широко географически распространены. Они были обнаружены в разнообразных экосистемах, включая пресноводные местообитания и щелочные содовые или кратерные озера (GBIF Secretariat (2021); GBIF Backbone Taxonomy. Checklist dataset <https://doi.org/10.15468/39omei>). Штамм H1^T является первым представителем этого рода, выделенным из наземного грязевого вулкана. Новый изолят имеет диапазоны pH, температуры и солености для роста, близкие к параметрам в его среде обитания.

Метаболический потенциал, кодируемый в геноме штамма H1^T, соответствует фенотипическим данным. Для всех видов рода *Desulfobotulus* характерно использование алифатических жирных кислот в процессе диссимиляционной сульфатредукции. Дифференцирующие характеристики штамма H1^T и членов рода *Desulfobotulus* представлены в табл. 1. Наиболее заметными отличиями являются более высокий температурный оптимум и способность сбрасывать лактат. Таким образом, на основании проведенных исследований мы предлагаем отнести штамм H1^T к новому виду рода *Desulfobotulus* – *Desulfobotulus pelophilus* sp. nov.

Таблица 1. Дифференцирующие характеристики штамма H1^T и других видов рода *Desulfobotulus*. Все штаммы используют пируват в качестве донора электронов и сульфат и сульфит в качестве акцептора электронов. Н.д. – данные в литературных источниках отсутствуют

Характеристика	H1 ^T (настоящее исследование)	<i>D. mexicanus</i> (Pérez-Bernal et al., 2020)	<i>D. alkaliphilus</i> (Sorokin et al., 2010)	<i>D. sapovorans</i> (Kuever et al., 2005)
$T_{\text{опт}}$, °C	37	32	32	34
pH опт.	9.5	9.0–9.6	9.9–10.1	7.7
NaCl, % (вес/объем)	0.5–6	0.4–6.75	Н.д.	<1.875
Доноры электронов				
Жирные кислоты	C ₄ , C ₆ , C ₈ , C ₉	C ₄ , C ₆ , C ₈ , C ₁₀ , C ₁₄ , C ₁₆ , C ₁₈	C ₄ , C ₆ , C ₈ , C ₉	C ₄ –C ₁₆₍₁₈₎
2-Метилбутират	–	+	–	+
Лактат	+	–	–	+
Акцепторы электронов				
Тиосульфат	+	–	+	–
Элементная сера	+	+	+	–
Брожение				
Лактат	+	Н.д.	Н.д.	–
Пируват	+	–	+	+
Содержание Г + Ц (мол. %)	51.1	49.0	51.3	53
Источник выделения	Наземный грязевой вулкан	Содовое озеро	Содовое озеро	Пресный водоем

Описание *Desulfobotulus pelophilus* sp. nov.

Desulfobotulus pelophilus (pe.lo'phi.us. Гр. муж. суш. *pêlos*, грязь, Н.лат. прил. *philus -a -um*, любящий; от Гр. прил. *philos -ê -on*, любящий; Н.лат. муж. прил. *pelophilus*, любящий грязь, так как этот вид был выделен из грязевого вулкана).

Клетки представляют собой подвижные вибрионы, 1 мкм толщиной и 2.0–2.5 мкм длиной. Рост при температуре 14–42°C (оптимум – 37°C), pH 8.5–10.5 (оптимум – 9.5), концентрации NaCl 0.5–6% (вес/об.). Использует пируват, лактат, бутират, капроат, каприлат и пеларгонат в качестве донора электронов и элементную серу, сульфит и сульфат в качестве акцептора электронов. Сбраживает пируват и лактат. Не способен к росту в присутствии кислорода. Не использует тиосульфат, ДМСО, фумарат, нитрат, нитрит, арсенат, селенит и Fe(III) в качестве акцептора электронов. Не диспропорционирует элементную серу, тиосульфат и сульфит. Не сбраживает глюкозу, фруктозу, сахарозу, трегалозу, галактозу, ксилозу, фумарат, цитрат, дрожжевой экстракт и пептон. В жирнокислотном составе клеток преобладают C_{20:0}, C_{22:0} и C_{18:0}.

Типовой штамм H1^T (=DSM 112796^T = VKM B-3697^T = UQM 41590^T) выделен из наземного грязевого вулкана полуострова Тамань. Размер генома – 3.66 Мп. Содержание Г + Ц в геномной ДНК 51.1% (полногеномное секвенирование).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФ 22-14-00011 (выделение, определение физиологических характеристик и таксономического положения изолята). Секвенирование полного генома и биоинформатический анализ проведены при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ. Состав жирных кислот определен в Губкинском университете при поддержке стипендии Президента РФ (СП-4709.2022.1).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Гнатенко Г.И., Кутний В.А., Науменко П.И., Соболевский Ю.В., Шнюков Е.Ф. Грязевые вулканы Керченско-Таманской области (атлас). Киев: Наукова Думка, 1986. 149 с.
- Холодов В.И. Грязевые вулканы: распространение и генезис // Геология и полезные ископаемые мирового океана. 2012. Т. 4. С. 5–27.

- Alain K., Holler T., Musat F., Elvert M., Treude T., Krüger M. Microbiological investigation of methane- and hydrocarbon-discharging mud volcanoes in the Carpathian Mountains, Romania // *Environ. Microbiol.* 2006. V. 8. P. 574–590.
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. Basic local alignment search tool // *J. Mol. Biol.* 1990. V. 215. P. 403–410.
- Benson D.A., Boguski M.S., Lipman D.J., Ouellette B.F.F., Rapp B.A., Wheeler D.L. GenBank // *Nucleic Acids Res.* 1999. V. 27. P. 12–17.
- Brettin T., Davis J.J., Disz T., Edwards R.A., Gerdes S., Olsen G.J., Olson R., Overbeek R., Parrello B., Pusch G.D., Shukla M., Thomason J.A., Stevens R., Vonstein V., Wattam A.R., Xia F. RASTtk: A modular and extensible implementation of the RAST algorithm for building custom annotation pipelines and annotating batches of genomes // *Sci. Rep.* 2015. V. 5. P. 8365.
- Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap // *Evolution.* 1985. V. 39. P. 783–791.
- Frolova A.A., Merkel A.Y., Novikov A.A., Bonch-Osmolovskaya E.A., Slobodkin A.I. *Anaerotelea alkaliphila* gen. nov., sp. nov., an alkaliphilic, anaerobic, fermentative bacterium isolated from a terrestrial mud volcano // *Extremophiles.* 2021a. V. 25. P. 301–309.
- Frolova A.A., Merkel A.Y., Kuchierskaya A.A., Bonch-Osmolovskaya E.A., Slobodkin A.I. *Pseudodesulfovibrio alkaliphilus*, sp. nov., an alkaliphilic sulfate-reducing bacterium isolated from a terrestrial mud volcano // *Antonie van Leeuwenhoek.* 2021b. V. 114. P. 1387–1397.
- GBIF Secretariat (2021). GBIF Backbone Taxonomy. Checklist dataset. <https://doi.org/10.15468/39ome1>
- Khomyakova M.A., Merkel A.Y., Petrova D.A., Bonch-Osmolovskaya E.A., Slobodkin A.I. *Alkalibaculum sporogenes* sp. nov., isolated from a terrestrial mud volcano and emended description of the genus *Alkalibaculum* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2020. V. 70. P. 4914–4919.
- Khomyakova M.A., Merkel A.Y., Kopitsyn D.S., Slobodkin A.I. *Pelovirga terrestris* gen. nov., sp. nov., anaerobic, alkaliphilic, fumarate-, arsenate-, Fe(III)- and sulfur-reducing bacterium isolated from a terrestrial mud volcano // *Syst. Appl. Microbiol.* 2022. V. 45. Art. 126304.
- Knittel K., Boetius A. Anaerobic oxidation of methane: progress with an unknown process // *Annu. Rev. Microbiol.* 2009. V. 63. P. 311–334. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.61.080706.093130>
- Kuever J., Rainey F.A., Widdel F. Class IV. *Deltaproteobacteria* class nov. // *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* / Eds. Brenner D.J., Krieg N.R., Staley J.T. Boston, MA: Springer, 2005. P. 970–971.
- Kuever J., Rainey F.A., Widdel F. *Desulfobacterales* ord. nov. // *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* / Eds. Trujillo M.E., Dedysh S., DeVos P., Hedlund B., Kämpfer P., Rainey F.A. and Whitman W.B. 2015. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.obm00084>
- Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets // *Mol. Biol. Evol.* 2016. V. 33. P. 1870–1874.
- Lumppio H.L., Shenvi N.V., Summers A.O., Voordouw G., Kurtz D.M., Jr. Rubrerythrin and rubredoxin oxidoreductase in *Desulfovibrio vulgaris*: a novel oxidative stress protection system // *J. Bacteriol.* 2001. V. 183. P. 101–108. Erratum in: *J. Bacteriol.* 2001 May; 183 (9): PMID: 11114906; PMID: PMC94855. <https://doi.org/10.1128/JB.183.1.101-108.2001>
- Mazzini A., Etiopie G. Mud volcanism: an updated review // *Earth-Science Rev.* 2017. V. 168. P. 81–112.
- Meier-Kolthoff J.P., Auch A.F., Klenk H.P., Göker M. Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions // *BMC Bioinform.* 2013. V. 14. Art. 60.
- Merkel A.Y., Chernykh N.A., Pimenov N.V., Bonch-Osmolovskaya E.A., Slobodkin A.I. Metabolic potential of the terrestrial mud volcano microbial community with a high abundance of archaea mediating the anaerobic oxidation of methane // *Life.* 2021. V. 11. Art. 953.
- Overbeek R., Olson R., Push G.D., Olsen G.J., Davis J.J., Disz T., Edwards R.A., Gerdes S., Parrello B., Shukla M., Vonstein V., Wattam A.R., Xia F., Stevens R. The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST) // *Nucleic Acids Res.* 2014. V. 42. I. D1. P. D206–D214.
- Parte A.C., Sardà Carbasse J., Meier-Kolthoff J.P., Reimer L.C., Göker M. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2020. V. 70. P. 5607–5612. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004332>
- Pereira I.A.C., Ramos A.R., Grein F., Marques M.C., da Silva S.M., Venceslau S.S. A comparative genomic analysis of energy metabolism in sulfate reducing bacteria and archaea // *Front. Microbiol.* 2011. V. 2. P. 69. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00069>
- Pérez-Bernal M.F., Brito E.M.S., Bartoli M., Aubé J., Ollivier B., Guyoneaud R., Hirschler-Réa A. *Desulfobotulus mexicanus* sp. nov., a novel sulfate-reducing bacterium isolated from the sediment of an alkaline crater lake in Mexico // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2020. V. 70. P. 3219–3225. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004159>
- Ren G., Ma A., Zhang Y., Deng Y., Zheng G., Zhuang X., Zhuang G., Fortin D. Electron acceptors for anaerobic oxidation of methane drive microbial community structure and diversity in mud volcanoes // *Environ. Microbiol.* 2018. V. 20. P. 2370–2385.
- Rodriguez-R L.M., Konstantinidis K.T. The enveomics collection: a toolbox for specialized analyses of microbial genomes and metagenomes // *PeerJ Preprints.* 2016. 4:e1900v1.
- Slobodkin A.I., Reysenbach A.-L., Slobodkina G.B., Baslerov R.V., Kostrikina N.A., Wagner I.D., Bonch-Osmolovskaya E.A. *Thermosulfurimonas dismutans* gen. nov., sp. nov., a novel extremely thermophilic sulfur-disproportionating bacterium from a deep-sea hydrothermal vent // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2012. V. 62. P. 2565–2571.
- Slobodkina G.B., Merkel A.Y., Novikov A.A., Bonch-Osmolovskaya E.A., Slobodkin A.I. *Pelomicrobium methylotrophicum* gen. nov., sp. nov., a moderately thermophilic, facultatively anaerobic, lithoautotrophic and methylotrophic bacterium isolated from a terrestrial mud volcano // *Extremophiles.* 2020. V. 24. P. 177–185. <https://doi.org/10.1007/s00792-019-01145-0>
- Sorokin D.Y., Detkova E.N., Muyzer G. Propionate and butyrate dependent bacterial sulfate reduction at extremely

haloalkaline conditions and description of *Desulfobotulus alkaliphilus* sp. nov. // *Extremophiles*. 2010. V. 14. P. 71–77.

Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D.G. The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools // *Nucleic Acids Res.* 1997. V. 25. P. 4876–4882.

Trüper H.G., Schlegel H.G. Sulphur metabolism in *Thiorhodaceae* I. Quantitative measurements on growing cells of *Chromatium okenii* // *Antonie van Leeuwenhoek*. 1964. V. 30. P. 225–238.

<https://doi.org/10.1007/BF02046728>

Tu T.-H., Wu L.-W., Lin Y.-S., Imachi H., Lin L.-H., Wang P.-L. Microbial community composition and functional capacity in a terrestrial ferruginous, sulfate-depleted mud volcano // *Front. Microbiol.* 2017. V. 8. Art. 2137.

Weisburg W.G., Barns S.M., Pelletier D.A., Lane D.J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study // *J. Bacteriol.* 1991. V. 173. P. 697–703.

Wolin E.A., Wolin M.J., Wolfe R.S. Formation of methane // *J. Franklin Inst.* 1963. V. 176. P. 737.

Yoon S.H., Ha S.-M., Lim J., Kwon S., Chun J. A large-scale evaluation of algorithms to calculate average nucleotide identity // *Antonie van Leeuwenhoek*. 2017. V. 110. P. 1281–1286.

Zhang L., Qiu Y.Y., Zhou Y., Chen G.H., van Loosdrecht M.C.M., Jiang F. Elemental sulfur as electron donor and/or acceptor: mechanisms, applications and perspectives for biological water and wastewater treatment // *Water Research*. 2021. V. 202. Art. 117373.

<https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117373>

Desulfobotulus pelophilus sp. nov., an Alkaliphilic Sulfate-Reducing Bacterium from a Terrestrial Mud Volcano

A. A. Frolova¹, *, A. Yu. Merkel¹, A. A. Kuchierskaya¹, and A. I. Slobodkin¹

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

*e-mail: romana2804@gmail.com

Received March 3, 2023; revised March 24, 2023; accepted March 25, 2023

Abstract—An alkaliphilic, sulfate-reducing, anaerobic bacterium (strain H1^T) was isolated from a terrestrial mud volcano at the Taman Peninsula, Russia. The cells of the isolate were gram-negative motile vibrios, 1 μm in diameter and 2.0–2.5 μm in length. Strain H1^T grew at 14–42°C (optimum at 37°C), pH 8.5–10.5 (optimum at pH 9.5), and NaCl concentrations of 0.5–6% (wt/vol) (optimum at 0.5–1.5%); pyruvate, lactate, butyrate, caproate, or pelargonate were used as electron donors, and elemental sulfur, sulfite, or sulfate were used as electron acceptors. Pyruvate and lactate were fermented. No growth occurred in the presence of oxygen. Thiosulfate, DMSO, fumarate, nitrate, nitrite, arsenate, selenite, and Fe(III) were not used as electron acceptors. Elemental sulfur, thiosulfate, and sulfite were not disproportionated. Glucose, fructose, sucrose, trehalose, galactose, xylose, fumarate, citrate, yeast extract, and peptone were not fermented. Predominant fatty acids were C_{20:0} (54.2%), C_{22:0} (24.6%), and C_{18:0} (11.1%). The genome of strain H1^T was 3.66 Mb in size and had G + C DNA content of 51.1%. The genome contained the genes encoding the enzymes of dissimilatory sulfate reduction and β-oxidation of fatty acids. According to the results of analysis of the 16S rRNA gene sequence, *Desulfobotulus mexicanus* was the organism most closely related to strain H1^T (98.3% similarity). Based on its phenotypic characteristics and the data of phylogenetic analysis, affiliation of the isolate as member of a novel *Desulfobotulus* species, *Desulfobotulus pelophilus* sp. nov., is proposed, with the type strain H1^T (=DSM 112796^T = VKM B-3697^T = UQM 41590^T).

Keywords: alkaliphile, sulfate reduction, anaerobic bacteria, mud volcano, *Desulfobacterales*

РОЛЬ СТРУКТУРНЫХ И РЕГУЛЯТОРНЫХ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ БЕЛКИ ТЕПЛООВОГО ШОКА, В СИНТЕЗЕ БИОСУРФАКТАНТОВ БАКТЕРИЯМИ *RHODOCOCCLUS PYRIDINIVORANS* 5Ap

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

^аБелорусский государственный университет, Минск, 220030 Беларусь

*e-mail: ma_titok@bsu.by

Поступила в редакцию 18.01.2023 г.

После доработки 20.02.2023 г.

Принята к публикации 01.03.2023 г.

В результате проведенного исследования впервые установлена роль структурных *groESL*, *dnaJ* и регуляторного генов *hrcA*, кодирующих синтез белков теплового шока, в синтезе биосурфактантов бактериями *R. pyridinivorans* 5Ap. Для регуляторного белка, кодируемого геном *hrcA*, сайты связывания CIRCE выявлены в промоторных участках генов *groESL*, *groEL2* и *fmdB*. Установлено, что по сравнению с температурой 28°C в поздней логарифмической фазе роста в среде с гексадеканом при 42°C экспрессия генов *groESL* и *groEL2* возрастала в 4.4 и в 5.3 раза соответственно. В то же время при разных температурных режимах (28 и 42°C) изменение экспрессии генов *hrcA* и *fmdB* не регистрировали. В отсутствие негативного регулятора HrcA увеличивалась экспрессия генов *groESL* в 14.4 и 3.5 раза, гена *groEL2* – в 9.6 и 2.7 раза и гена *fmdB* – в 1.82 и 2.52 раза при температуре 28 и 42°C соответственно. Продукты генов *dnaJ* и *hrcA* необходимы для синтеза трегалолипидов при разных температурных режимах, причем их роль возрастала при повышенной температуре (у мутанта с нарушенным геном *dnaJ* синтез трегалолипидов при температуре 28 и 42°C снижался в 1.8 и в 2.5 раз соответственно, а у мутанта с нарушенным геном *hrcA* – в 1.5 и в 6.6 раз соответственно). В то же время эмульгирующая активность не изменялась у всех мутантных вариантов при 28°C и уменьшалась при температуре 42°C в 1.4 и 1.9 раз, соответственно, у мутантов с нарушенным геном *groESL* и *hrcA*. Полученные результаты свидетельствуют о сложной химической природе биоПАВ, продуцируемых бактериями *R. pyridinivorans* 5Ap (эмульгаторы, включающие трегалолипиды и соединения иного химического состава). В синтезе этих соединений при разных температурных режимах ключевую роль играют шапероны Gro и регуляторный белок HrcA, тогда как продукт гена *dnaJ* необходим только для синтеза трегалолипидов.

Ключевые слова: *Rhodococcus*, *groESL*, *dnaJ*, *hrcA*, HrcA-репрессор, биоПАВ

DOI: 10.31857/S0026365623600049, **EDN:** RIYXOI

Бактерии рода *Rhodococcus* способны утилизировать широкий круг ксенобиотиков природного и антропогенного происхождения при высокой осмолярности, низкой влажности, повышенных и пониженных значениях pH среды и температуры (Larkin et al., 2005; Pátek et al., 2021). Практически неограниченные адаптивные свойства данных микроорганизмов, безусловно, связаны с особенностями их генетической организации, в частности, с присутствием в хромосоме и внехромосомных генетических элементах большого числа генов биодegradации, с уникальной организацией клеточной поверхности, а также генетическими системами, поддерживающими функциональную активность ферментов в стрессовых условиях внешней среды. Использование углеродородных субстратов в качестве источников углерода требует активации и взаимодействия генети-

ческих систем, определяющих модификацию клеточной стенки, деградацию и нейтрализацию активных форм кислорода, образующихся в результате процессов их окисления, и сохранение шаперонами функционально активной конформации ферментов. При этом роль белков-шаперонов в поддержании клеточного гомеостаза возрастает при действии дополнительных стрессовых факторов (температура, pH, осмолярность и др.) (Bukliarevich et al., 2019).

Родокочки имеют уникальные поверхностные структуры. Кроме внутренней цитоплазматической мембраны и клеточной стенки, они содержат поверхностно-активные соединения, представленные производными миколовых кислот (например, трегалозомиколаты, связанные с клеточной стенкой посредством арабиногалактана) и другими веществами разной химической при-

роды (липиды, липопротеины, гликопротеины, полисахариды и др.) (Sutcliffe et al., 2010). Данные соединения, изменяя клеточную поверхность, способствуют адгезии клеток к загрязняющим веществам, повышают их растворимость и доступность для деградации, тем самым обеспечивая устойчивость бактерий к гидрофобным субстратам (Iwabuchi et al., 2000; Kaczorek et al., 2018). Как правило, индукторами синтеза поверхностно-активных соединений у бактерий рода *Rhodococcus* являются алканы (например, *n*-гексадекан), в ходе окисления которых образуется ацетил-КоА, необходимый для синтеза биоПАВ (Kuyukina, Ivshina, 2010). Следует отметить, что алканы природного и антропогенного происхождения широко распространены в окружающей среде (продуцируются микроорганизмами, содержатся в местах, загрязненных углеводородами). У всех без исключения представителей рода *Rhodococcus* в хромосомах и внехромосомных генетических элементах присутствуют большое число генов, кодирующих синтез гидролаз (монооксигеназы, цитохромы P450), определяющих утилизацию алканов (Nie et al., 2014). Представляется, что роль данных систем не ограничивается только использованием алканов в качестве источников углерода. Например, алкан-1-монооксигеназы, обеспечивающие окисление *n*-гексадекана, влияют на синтез поверхностно-активных соединений (Bukliarevich et al., 2023).

В силу практической значимости бактерий рода *Rhodococcus*, наиболее активно изучаются системы деградации и поверхностно-активные соединения (ПАВ) данных микроорганизмов. В то же время роль белков-шаперонов в этих процессах практически не изучена. Ранее было установлено, что для утилизации ряда ароматических, полициклических и алифатических углеводородов бактериями *R. pyridinivorans* 5Ap при температуре 42°C необходимы функционально активные гены, кодирующие структурные (GroESL) и регуляторные (HrcA) белки теплового шока. Показано, что у мутантов с нарушенными генами *groESL* и *hrcA* эффективность деградации *n*-гексадекана снижалась, соответственно, в 1.7 и 2.7 раза при температуре 42°C (Bukliarevich et al., 2019). Полученные результаты обосновали изучение роли структурных и регуляторных генов, кодирующих белки теплового шока, в синтезе биоПАВ бактериями *R. pyridinivorans* 5Ap.

Целью настоящей работы являлся анализ экспрессии генов, кодирующих белки теплового шока, при разных температурах культивирования и определение эффективности синтеза биоПАВ (количество трегалолипидов, эмульгирующая активность) бактериями *R. pyridinivorans* 5Ap с нарушенными генами *groESL*, *dnaJ* и *hrcA*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Штаммы, плазмиды и условия культивирования бактерий. В работе использовали штамм *R. pyridinivorans* 5Ap (депонирован в Белорусскую коллекцию непатогенных микроорганизмов Института микробиологии НАН Беларуси под номером БИМ В-939 Г) и плазмиду pK18mob (Schäfer et al., 1994). Бактерии культивировали в полноценной пептонно-дрожжевой среде (пептон ферментативный – 10 г, дрожжевой экстракт – 5 г, NaCl – 8 г) и минеральной модифицированной среде Мюнца (Pirog et al., 2010), содержащей 2% гексадекана в качестве источников углерода. Агаризованные среды содержали 1.5% агара.

Выделение ДНК. Тотальную ДНК выделяли саркозильным методом (te Riele et al., 1986). Плазмидную ДНК выделяли с использованием набора реактивов Fast-n-Easy Plasmid Mini-Prep Kit (“Jena Bioscience”, Германия).

Аmplификация и клонирование генов. Для амплификации фрагмента гена *dnaJ* использовали Phusion® High-Fidelity ДНК полимеразу (“NEB”, США) и праймеры производства ОДО “Прайм-тех” (Беларусь). Для амплификации фрагмента гена *dnaJ* размером 770 п.н. использовали праймеры F-*dnaJ* (5'-gga tgt gaa ccc cga cga gtc-3') и R-*dnaJ* (5'-tgg tctc gat cgt cac ctt gg-3'). Продукты амплификации очищали с помощью набора Agarose Gel Extraction Kit (“Jena Bioscience”, Германия) и лигировали с суицидальным вектором pK18mob, предварительно обработанным рестриктазой *SmaI* (“Thermo Fisher Scientific”, США).

Введение плазмид в клетки бактерий. Трансформацию бактерий *E. coli* осуществляли согласно методу, приведенному в работе Sambrook et al. (1989).

Плазмиду pK18mob с клонированными фрагментами генов *hrcA*, *groESL* (Bukliarevich et al., 2019) и гена *dnaJ* в клетки *R. pyridinivorans* 5Ap вводили методом электропорации. Для электропорации использовали прибор Gene Pulser Xcell Microbial System (“Bio-Rad”, США), кюветы с просветом 1 мм и напряжение 1.8 кВ. Трансформанты отбирали на полноценной пептонно-дрожжевой среде с канамицином в концентрации 50 мкг/мл.

Анализ инсерционных мутантов. Интеграцию гибридных плазмид в хромосому бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap устанавливали с помощью полимеразной цепной реакции. В результате с использованием праймера M13F (5'-act ggc cgt cgt ttt aca-3'), отжигающегося на последовательности вектора pK18mob и праймера R-rt-*dnaJ* (5'-gca cca cga cct cga gat gc-3'), отжигающегося вне области встраивания гибридного вектора в ген *dnaJ*, были получены фрагменты искомого размера 966 п.н. С использованием праймера M13F и праймера *hrcRT-R* (5'-atg cga tgg ttc ccg gat agt c-3'), отжигающегося

вне области встраивания гибридного вектора в ген *hrcA*, были получены фрагменты искомого размера 999 п.н. С использованием праймера M13F и праймера groELSR (5'-ccg gaa ttc tca gtg cgc gtg acc gtg-3'), отжигающегося вне области встраивания гибридного вектора в гены *groESL*, были получены фрагменты искомого размера 2076 п.н.

Анализ синтеза биоПАВ. Для определения содержания гликолипидов бактерии *R. pyridinivorans* 5Ap культивировали в минеральной минимальной среде с добавлением 2% гексадекана в течение 96 ч с аэрацией (140 об./мин). Экстракцию сурфактанта осуществляли с использованием метилтретбутилового эфира (Kuyukina et al., 2001) с последующим разведением полученного препарата в 10 раз. С использованием фенол-сернокислого метода (DuBois et al., 1956) определяли содержание трегалозы, являющейся частью гликолипида, на спектрофотометре Metertech SP-8001 (Тайвань).

Индекс эмульгирования определяли по методике, описанной в работе (Cooper, Goldenberg, 1987), и рассчитывали как отношение объема эмульсии, образуемой при перемешивании культуральной жидкости с гексадеканом, к общему объему раствора.

ПЦР в реальном времени. Для определения экспрессии генов использовали культуру бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap в поздней логарифмической фазе роста при культивировании в минеральной модифицированной среде Мюнца, содержащей в качестве единственного источника углерода 2% гексадекана. Для получения препаратов тотальной РНК использовали набор Aurum™ Total RNA Mini Kit ("Bio-Rad", США), концентрацию РНК определяли спектрофотометрически; качество препаратов оценивали с помощью электрофореза в агарозном геле. Для удаления примесей геномной ДНК выделенную РНК (1 мкг) обрабатывали ДНКазой ("Thermo Fisher Scientific", США). Для синтеза кДНК использовали набор RevertAid RT Reverse Transcription Kit ("Thermo Fisher Scientific", США). Реакцию амплификации проводили с использованием набора реагентов для проведения ПЦР в реальном времени в присутствии красителя SYBR Green I ("Синтол", Россия) при режиме: 95°C – 3 мин; 95°C – 20 с, 60°C – 20 с, 72°C – 5 с (40 циклов). Контаминация геномной ДНК во всех исследуемых образцах не превышала 3%. В качестве референсного использовали ген 16S рРНК (SD – 0.82; CV – 8.5%). Относительное количество мРНК определяли по формуле Пфаффа (Pfaffl, 2001). Для статистического анализа данных использовали непарный критерий Стьюдента для сравнения данных с помощью программы RStudio версии 4.0.0. Результаты получены в пяти независимых повторах.

Для амплификации фрагмента гена *groEL* в режиме реального времени использовали праймеры gro2R-F (5'-cct gct cgt cag ctc caa ga-3') и gro2R-R (5'-gtg ccg cgg atc ttg ttg ag-3'), для генов *groESL* – gro1R-F (5'-ggc ttc ctg tgc ccc tac tt-3') и gro1R-R (5'-gcc gga ctc tgc gat ctt ct-3'), для гена *hrcA* – hrcRT-F (5'-cat cgg tga gga cca gtt c-3') и hrcRT-R (5'-atg cga tgg ttc ccg gat agt c-3'), для амплификации гена *fmdB* – fmdB-F (5'-cac ctac tca tat gcc tgc ac-3') и fmdB-R (5'-gat gcc gac cga gtt gaa gag-3'), для референсного гена 16S – 5Ap_835f (5'-gcc gta gcc aac gca tta ag-3') и 5Ap_1163r (5'-cac ctt cct ccg agt tga cc-3'). Для каждой пары праймеров эффективность амплификации определяли по значению угла наклона калибровочной кривой. Специфичность реакции подтверждали анализом кривой плавления и электрофорезом в агарозном геле.

Поиск сайтов связывания регуляторных белков. Для поиска сайтов связывания CIRCE белка HrcA использовали данные сайта <https://regprecise.lbl.gov/index.jsp>. Для анализа нуклеотидных последовательностей бактерий рода *Rhodococcus* использовали нуклеотидные последовательности геномов из базы данных GenBank: *R. equi* 103S (FN563149), *R. aetherivorans* Ic-dP1 (CP011341), *R. ruber* R1 (CP038030.2), *R. hoagii* ATCC 33701 (AP025268.1), *R. coprophilus* NCTC10994 (LS483468.1), *R. pyridinivorans* 5Ap (CP063450.1), *R. rhodochrous* EP4 (CP032221.1), *R. opacus* B4 (AP011115.1), *R. opacus* R7 (CP008947.1), *R. jostii* RHA1 (CP000431.1), *R. ko-reensis* R85 (CP070609.1), *R. quinshengii* 7B (CP003761.1), *R. erythropolis* CCM2595 (CP003761.1), *R. fascians* D188 (CP015235.1), *R. triatomae* DSM 44892 (CP048814.1). Нуклеотидные последовательности сайтов связывания белка HrcA выравнивали с помощью программы SnapGene (www.snap-gene.com).

Для поиска сайтов связывания сигма-фактора σ^{70} использовали программы BPROM (Solovyev, Salamov, 2011) и Sapphire (Coppens, Lavigne, 2020). Для поиска сайтов связывания сигма-фактора σ^H использовали программу Unipro UGENE (Okonechnikov et al., 2012). В качестве типового сайта связывания использовали последовательность GGAAC-(N₁₇₋₁₈)-GTT (Blumenstein et al., 2022).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Система белков теплового шока является генерализованной, и их экспрессия может подвергаться негативной регуляции на стадии транскрипции специфическими белками-репрессорами (Roncarati, Scarlato, 2017). Одним из ключевых негативных регуляторов является белок HrcA. Данный репрессор в форме димеров связывается в области промоторов с определен-

ной нуклеотидной последовательностью CIRCE, представленной инвертированными повторами (TTGGCACTC-9N-GAGTGGCCCCAG), препятствуя инициации транскрипции. При этом функционально активная форма белка HrcA образуется в клетке в отсутствие стресса и обеспечивается белками GroE (Schumann, 2016). При воздействии стрессовых факторов в клетке накапливаются денатурированные белки, с которыми связываются шапероны GroE, возвращая их к нативной конформации. В этих условиях белок HrcA превращается в мономерную форму и теряет свойство репрессора, в результате чего усиливается транскрипция генов, кодирующих синтез белков теплового шока (Roncarati et al., 2014).

Сайты связывания белка HrcA у всех без исключения изученных в этом отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий обнаруживались перед опероном *groESL* (*groES-groEL*) (данные сайта <https://regprecise.lbl.gov/index.jsp>). Данный факт может свидетельствовать о сложившейся в процессе эволюции системе, регулирующей взаимоотношения между белком репрессором HrcA и белками теплового шока GroESL. Единственное исключение составляли некоторые представители гаммапротеобактерий, у которых участки связывания белка HrcA находились только перед геном *rpoH*, детерминирующим альтернативный сигма-фактор σ^H , обеспечивающий транскрипцию генетических детерминант, продукты которых необходимы для выживания в стрессовых условиях среды. Это психрофильные морские бактерии *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125 и бактерии *Pseudoalteromonas tunicata* D2, колонизирующие морские водоросли и беспозвоночные. Наибольшим разнообразием локализации сайтов CIRCE характеризовались грамположительные бактерии. Они выявлялись не только перед опероном *groESL*, но и перед отдельно локализованными генами *groEL*, по-разному организованными оперонами, кодирующими шаперон DnaK, белки HrcA и DnaJ, перед детерминантами, определяющими синтез белков теплового шока Hsp90, ClpB, Hsp20 и транспозаз (данные сайта <https://regprecise.lbl.gov/index.jsp>). При этом расположение сайтов связывания HrcA могло варьировать у представителей одной таксономической группы. Например, для отдельных видов микобактерий они присутствовали перед геном *hrcA* и *groEL2*. У патогенных бактерий *Mycobacterium tuberculosis* сайты CIRCE локализовались перед опероном *groELS* и генами *groEL2* и *fmdB*.

Следует отметить, что роль HrcA в бактериальной клетке не ограничивается только функцией репрессора. Например, для бактерий *Listeria monocytogenes* и *M. tuberculosis* установлено, что данный белок позитивно регулировал экспрессию генов, продукты которых необходимы для трансляции и репликации, а также вовлеченные в

реакции на стресс и метаболизм (Hu et al., 2007). Помимо этого, активация транскрипции могла осуществляться белком HrcA совместно с сигма-факторами σ^H или σ^B , которые являются ключевыми регуляторами транскрипции большого количества генетических детерминант, продукты которых необходимы для выживания бактерий в стрессовых условиях, включая тепловой, кислотный и окислительный стрессы, а также во время углеродного и азотного голодания (Ferreira et al., 2001). Таким образом, белок HrcA является частью регуляторной системы, определяющей экспрессию генов, продукты которых необходимы для выживания бактерий в изменяющихся условиях внешней и внутренней среды.

Анализ локализации сайтов CIRCE у бактерий рода *Rhodococcus* показал, что они достаточно консервативные и, аналогично бактериям *M. tuberculosis*, локализируются перед опероном *groESL* (один сайт), генами *groEL* (два сайта) и *fmdB* (один сайт) (рис. 1, 2).

Исключение составили отдельные представители вида *R. jostii* (штамм RHA1) и *R. erythropolis* (штаммы PR4, R138), в хромосоме которых дополнительно присутствовали сайты CIRCE перед генами, кодирующими белки теплового шока семейства Hsp20 (данные сайта https://regprecise.lbl.gov/sites.jsp?regulog_id=6007).

Анализ транскрипционной активности генов в поздней логарифмической фазе роста бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap в среде с гексадеканом показал, что экспрессия генов *groESL*, *groEL* возрастала при повышенной температуре культивирования (42°C) в 4.4 и в 5.3 раза соответственно (рис. 3). Данный результат является закономерным, поскольку известно, что при увеличении температуры белок HrcA, превращаясь в мономерную форму, утрачивает свойство репрессора, подавляющего транскрипцию этих детерминант (Roncarati et al., 2014). В то же время вне зависимости от температуры культивирования (28 и 42°C) количество матричной РНК, кодируемой геном *hrcA*, не изменялось. Такая же картина наблюдалась для гена *fmdB*, содержащего в промоторной области сайты связывания с HrcA (последовательность CIRCE) (рис. 3). При этом в регуляторной области гена *hrcA* обнаруживался промотор, узнаваемый базовым сигма-фактором (σ^{70}), что свидетельствовало о его конститутивной экспрессии при разных температурных режимах (рис. 1). В то же время в регуляторной области гена *fmdB* выявлялось два промоторных участка, один из которых узнавался базовым сигма-фактором (σ^{70}) и перекрывался с последовательностью CIRCE, а второй промотор мог активировать транскрипцию данной детерминанты в присутствии альтернативного сигма-фактора (σ^H) (рис. 1). Следует отметить, что транскрипционный фактор σ^H по-

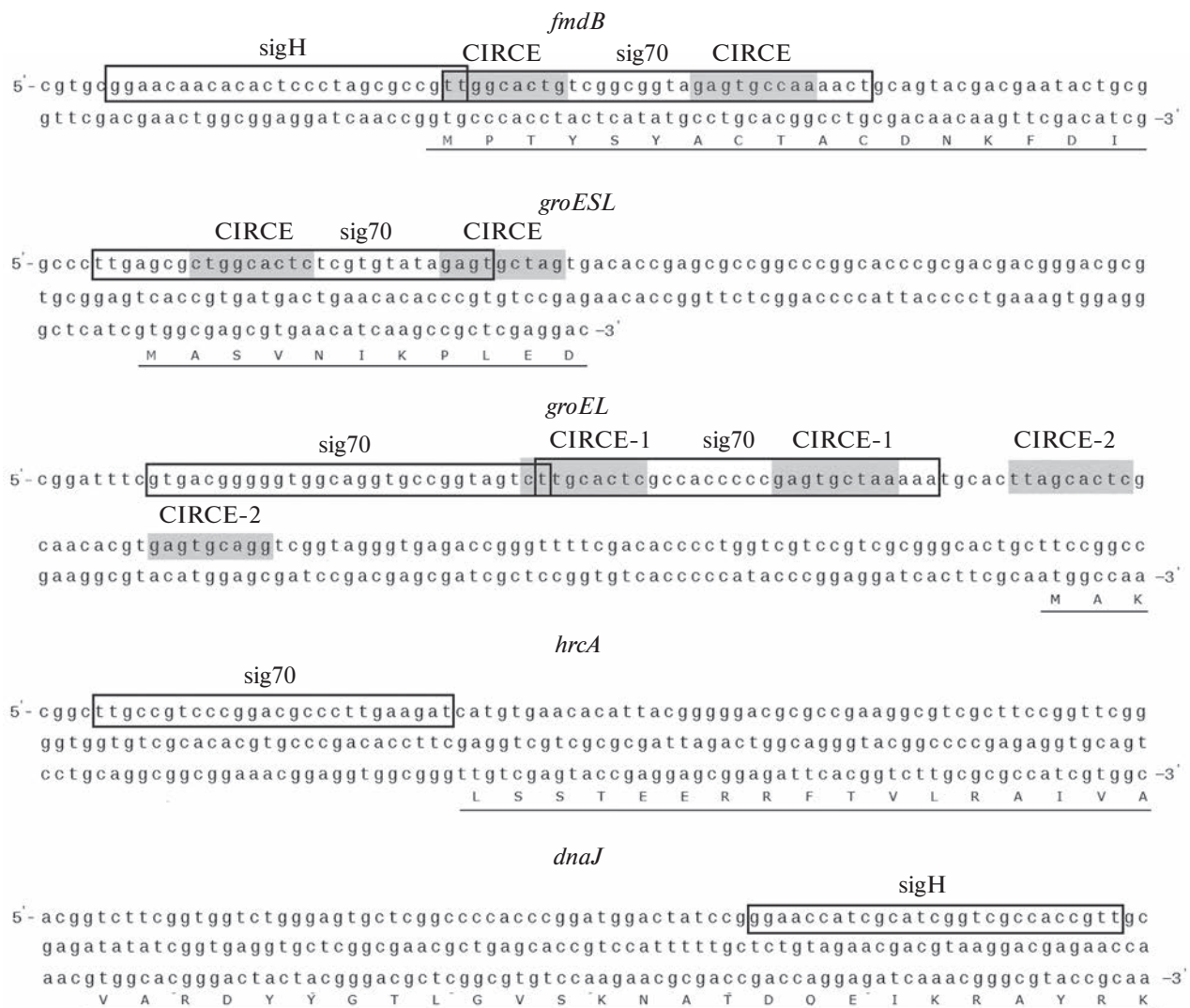


Рис. 1. Организация регуляторных последовательностей генов *hrcA*, *groESL*, *groEL*, *fmdB* и *dnaJ* в хромосоме бактерий *R. pyridinivorans* 5Ar. Сайты связывания с базовым (σ^{70}) и альтернативными сигма (σ^H) факторами выделены прямоугольниками, сайты CIRCE выделены серым цветом. Старт-кодены и начало открытых рамок считывания подчеркнуты.

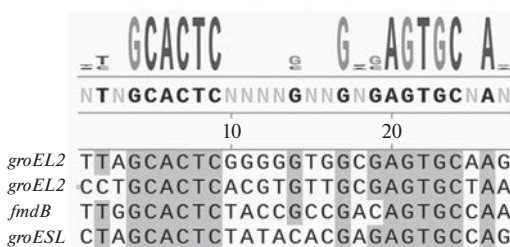
является в клетке в присутствии активных форм кислорода, образующихся, в том числе, при утилизации алифатических углеводов в качестве единственных источников углерода на этапе β -окисления жирных кислот (Kato et al., 2009; Jung et al., 2011). Подобная организация регуляторной последовательности гена *fmdB* характерна и для бактерий *M. tuberculosis*. Установлено, что ген *fmdB* (обозначенный как *ruc*), присутствуя в геноме прокариот, в том числе в составе оперонов *dnaK*, определяет синтез белков, содержащих консервативные функциональные домены, представленные цистеиновыми аминокислотами (CxxC-N₁₇-CxxC), связанными с ионами цинка и крайне чувствительными к окислительному стрессу (Ortiz de Oru e Lucana et al., 2012). В при-

сутствии активных форм кислорода данные белки активируются и совместно шаперонами DnaK и DnaJ способны предотвращать необратимую денатурацию более 70 ферментов, в частности, необходимых для процессов окисления и синтеза жирных кислот (Becker et al., 2020).

При нарушении гена *hrcA* увеличение экспрессии в 14.4 и 9.6 раза регистрировали, соответственно, для генов *groESL* и *groEL2* при 28°C, в то время как их транскрипция при повышенной температуре увеличивалась только в 3.5 и 2.7 раза. Для гена *fmdB* увеличение экспрессии регистрировали при 28 и 42°C (соответственно, в 1.82 и 2.52 раза) (рис. 4).

Этот результат весьма закономерен для генов *groESL* и *groEL2*, поскольку белок HrcA репресси-

Обобщенная нуклеотидная последовательность CIRCE



CIRCE перед геном *fmdB*

CIRCE перед опероном *groESL*

	TTGGCACTGTCGCTGTAGAGTGCTAA
	CTGGCACTGTCGCTGTAGAGTGCTAA
	10 20
<i>R. hoagii</i> ATCC 33701	TTGGCACTGTCGACTGTAGAGTGCCAA
<i>R. equi</i> 103S	TTGGCACTGTCGACTGTAGAGTGCCAA
<i>R. aetherivorans</i> lcdP1	TTGGCACTGTCGGCTGTAGAGTGCTAA
<i>R. ruber</i> R1	TTGGCACTGTCGGCTGTAGAGTGCTAA
<i>R. coprophilus</i> NCTC10994	TTGGCACTGTCGGCGATAGAGTGCCAA
<i>R. pyridinivorans</i> 5Ap	TTGGCACTGTCGGCGGTAGAGTGCCAA
<i>R. rhodochrous</i> EP4	TTGGCACTGTCGGCGGTAGAGTGCCAA
<i>R. opacus</i> R7	TTGGCACTGTCGACTGTAGAGTGCTAA
<i>R. jostii</i> RHA1	TTGGCACTGTCGACTGTAGAGTGCTAA
<i>R. koreensis</i> R85	TTGGCACTGTCGACTGTAGAGTGCTAA
<i>R. quinshengii</i> 7B	TTGGCACTGTCACCTGTAGAGTGCTAA
<i>R. erythropolis</i> CCM2595	TTGGCACTGTCACCTGTAGAGTGCTAA
<i>R. fascians</i> D188	TTGGCACTCCTGACTGTAGAGTGCTAA
<i>R. triatomae</i> DSM 44892	TTGGCACTGTCGACTGTAGAGTGCTAA

	CTGGCACTCTCATACGTAGAGTGCTAG
	CTGGCACTCTCATACGTAGAGTGCTAG
	10 20
<i>R. hoagii</i> ATCC 33701	CTGGCACTCGCATGTATAGAGTGCTAG
<i>R. equi</i> 103S	CTGGCACTCGCATGTATAGAGTGCTAG
<i>R. aetherivorans</i> lcdP1	CTGGCACTCGCGTGTATAGAGTGCTAG
<i>R. ruber</i> R1	CTGGCACTCGCGTGTATAGAGTGCTAG
<i>R. coprophilus</i> NCTC10994	CTGGCACTCTCATGTATAGAGTGCTAG
<i>R. pyridinivorans</i> 5Ap	CTGGCACTCTCGTGTATAGAGTGCTAG
<i>R. rhodochrous</i> EP4	CTGGCACTCGCGTGTATAGAGTGCTAG
<i>R. opacus</i> R7	TTGGCACTCTATACGTGAGAGTGCCAA
<i>R. jostii</i> RHA1	TTGGCACTCTATACGTGAGAGTGCCAA
<i>R. koreensis</i> R85	TTGGCACTCTATACGTGAGAGTGCCAA
<i>R. quinshengii</i> 7B	TTGGCACTCTATACGTGAGAGTGCCAA
<i>R. erythropolis</i> CCM2595	TTGGCACTCTATACGTGAGAGTGCCAA
<i>R. fascians</i> D188	CTGGCACTCTCGTGTATAGAGTGCTAG
<i>R. triatomae</i> DSM 44892	TTGGCACTCTATACGTGAGAGTGCCAA

CIRCE-1 перед геном *groEL2*

CIRCE-2 перед геном *groEL2*

	CTGGCACTCACGCTGTGCGAGTGCCAA
	CTGGCACTCACGTGTGCGAGTGCCAA
	10 20
<i>R. hoagii</i> ATCC 33701	CTGGCACTCACGTGTGCGAGTGCCAA
<i>R. equi</i> 103S	CTGGCACTCACGTGTGCGAGTGCCAA
<i>R. aetherivorans</i> lcdP1	CTGGCACTCACGTGTGCGAGTGCCAA
<i>R. ruber</i> R1	CTGGCACTCACGTGTGCGAGTGCCAA
<i>R. coprophilus</i> NCTC10994	CTGGCACTCACGTGTGCGAGTGCTAA
<i>R. pyridinivorans</i> 5Ap	CTGGCACTCACGTGTGCGAGTGCTAA
<i>R. rhodochrous</i> EP4	CTGGCACTCACGTGTGCGAGTGCTAA
<i>R. opacus</i> R7	CTGGCACTCACGCGTGTGAGTGCCAA
<i>R. jostii</i> RHA1	CTGGCACTCACGCGTGTGAGTGCCAA
<i>R. koreensis</i> R85	CTGGCACTCACGCGTGTGAGTGCCAA
<i>R. quinshengii</i> 7B	CTGGCACTCACGGTGTGCGAGTGCCAA
<i>R. erythropolis</i> CCM2595	CTGGCACTCACGGTGTGCGAGTGCCAA
<i>R. fascians</i> D188	CTGGCACTCACGTGTGCGAGTGCCAA
<i>R. triatomae</i> DSM 44892	CTGGCACTCACGTGTGCGAGTGCCAA

	TTAGCACTCGNNGTGGCGAGTGCAAG
	TTAGCACTCGNNGTGGCGAGTGCAAG
	10 20
<i>R. hoagii</i> ATCC 33701	TTAGCACTCGTAGGGGTGAGTGCAAC
<i>R. equi</i> 103S	TTAGCACTCGTAGGGGTGAGTGCAAC
<i>R. aetherivorans</i> lcdP1	TTAGCACTCGAGGGTGGCGAGTGCAAG
<i>R. ruber</i> R1	TTAGCACTCGAGGGTGGCGAGTGCAAG
<i>R. coprophilus</i> NCTC10994	TTAGCACTCGGGGGTGGTGGAGTGCAAG
<i>R. pyridinivorans</i> 5Ap	TTAGCACTCGGGGGTGGCGAGTGCAAG
<i>R. rhodochrous</i> EP4	TTAGCACTCGGGGGTGGCGAGTGCAAG
<i>R. opacus</i> R7	TTAGCACTCGGACAGGGTGGAGTGCAAG
<i>R. jostii</i> RHA1	TTAGCACTCGGACAGGGTGGAGTGCAAG
<i>R. koreensis</i> R85	TTAGCACTCGAACAGGGTGGAGTGCAAG
<i>R. quinshengii</i> 7B	TTAGCACTCGAGCGTGGCGAGTGCAAG
<i>R. erythropolis</i> CCM2595	TTAGCACTCGAGCGTGGCGAGTGCAAG
<i>R. fascians</i> D188	CTAGCACTCGACCATGGCGAGTGCAAG
<i>R. triatomae</i> DSM 44892	TTAGCACTCGAACAGGGCGAGTGCAAG

Рис. 2. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей CIRCE перед геном *fmdB*, опероном *groESL* и отдельно локализованным геном *groEL2* у бактерий рода *Rhodococcus*.

рует транскрипцию данных детерминант только в отсутствии температурного стресса. При увеличении температуры культивирования до 42°C увеличение экспрессии данных генов можно объяснить тем, что примененный температурный режим не является абсолютно стрессовым для бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap, и белок HrcA, хотя и в меньшей степени, но обладает функцией репрессора. Увеличение экспрессии *fmdB* при разных температурных режимах свидетельствует о регуляции транскрипции данного гена белком HrcA путем

связывания с сайтом CIRCE. В то же время его транскрипция, как указывалось выше, дополнительно активируется РНК-полимеразой, связанной с фактором σ^H .

Таким образом, полученные результаты могут свидетельствовать в пользу того, что гены *groESL*, *groEL2* и *fmdB*, содержащие в регуляторных участках сайты связывания CIRCE, подвергаются негативной регуляции белком HrcA, поскольку его инактивация приводит к увеличению транскрипции данных детерминант при разных температурах

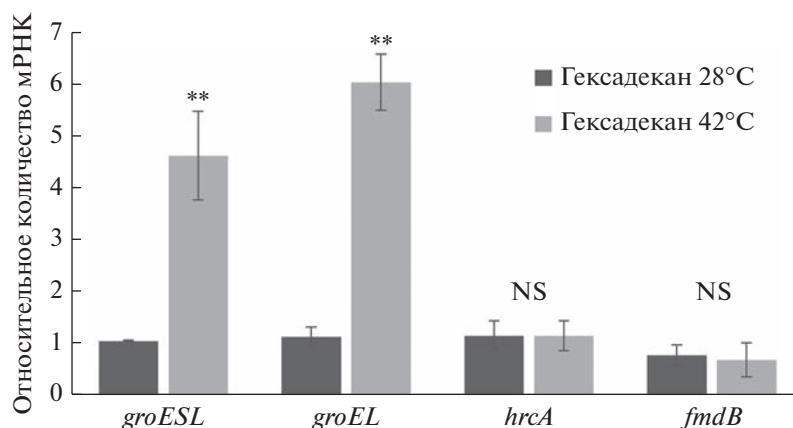


Рис. 3. Относительное количество мРНК, кодируемое генами *groESL*, *groEL2*, *hrcA* и *fmdB* при разных температурах культивирования бактерий *R. pyridinivorans* 5Ar в минимальной среде, содержащей в качестве источника углерода 2% гексадекана. Обозначения: NS – $P > 0.05$; ** – $P \leq 0.01$.

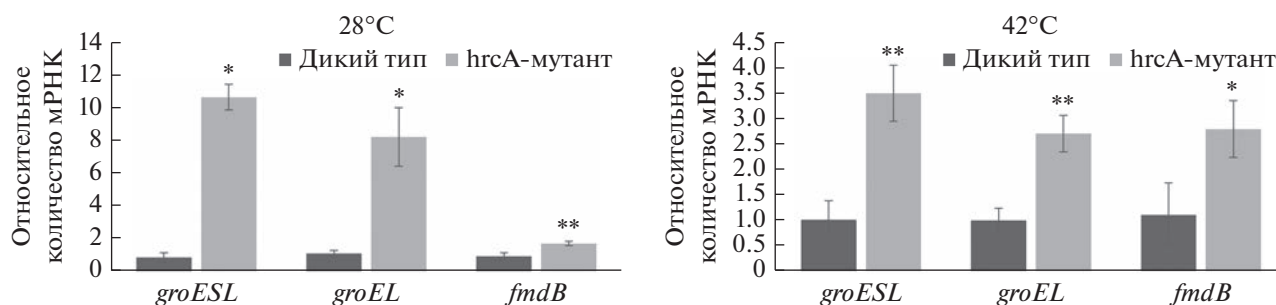


Рис. 4. Относительное количество мРНК, кодируемое генами *groESL*, *groEL2* и *fmdB* при разных температурах культивирования бактерий *R. pyridinivorans* 5Ar дикого типа и с нарушенным геном *hrcA* в минимальной среде, содержащей в качестве источника углерода 2% гексадекана. Обозначения: * – $P \leq 0.1$; ** – $P \leq 0.01$.

культивирования. Бактерии дикого типа, используя гексадекан в качестве единственного источника углерода, вне зависимости от температуры выращивания испытывают окислительный стресс, что приводит к появлению в клетке альтернативного сигма-фактора (σ^H), обеспечивающего транскрипцию гена *fmdB*. В то же время повышение температуры до 42°C приводит к активации системы белков теплового шока, в результате чего увеличивается транскрипция генов *groESL* и *groEL2*. Одинаковая экспрессия гена *hrcA* при разных условиях культивирования свидетельствует в пользу того, что он синтезируется конститутивно, и его роль не ограничивается функцией репрессора генов *groESL*, *groEL2* и *fmdB*, содержащих в промоторных участках сайты его связывания CIRCE, а играет более значимую роль в клетках исследуемых бактерий.

Исходя из предположения, что бактерии *R. pyridinivorans* 5Ar при культивировании в среде с гексадеканом испытывают окислительный стресс и дополнительный тепловой стресс при увеличении температуры, была изучена роль му-

таций в генах *groESL*, *hrcA* и *dnaJ* в синтезе биоПАВ бактериями *R. pyridinivorans* 5Ar при разных температурных режимах. Обоснованием этому служили следующие соображения. Во-первых, гексадекан в концентрации 2% является обязательным индуктором синтеза биоПАВ данными бактериями. Во-вторых, ключевую роль в синтезе биоПАВ играют гены, кодирующие синтез алкан-1-монооксигеназ (Bukliarevich et al., 2023). В-третьих, установлено, что при температуре 42°C у мутантов с нарушенными генами *groESL*, *hrcA* снижалась эффективность деградации гексадекана (в 1.7 и 2.7 раза соответственно) (Bukliarevich et al., 2019). И, наконец, предполагали, что в случае окислительного стресса, вызванного гексадеканом, должны активироваться белки шапероны, обеспечивающие функциональную активность ферментов, в том числе, участвующих в синтезе биоПАВ. В этом плане определенный интерес представлял ген, кодирующий белок DnaJ, который совместно с шапероном DnaK способен восстанавливать конформацию нарушенных под действием стресса белков. Данная детерминанта

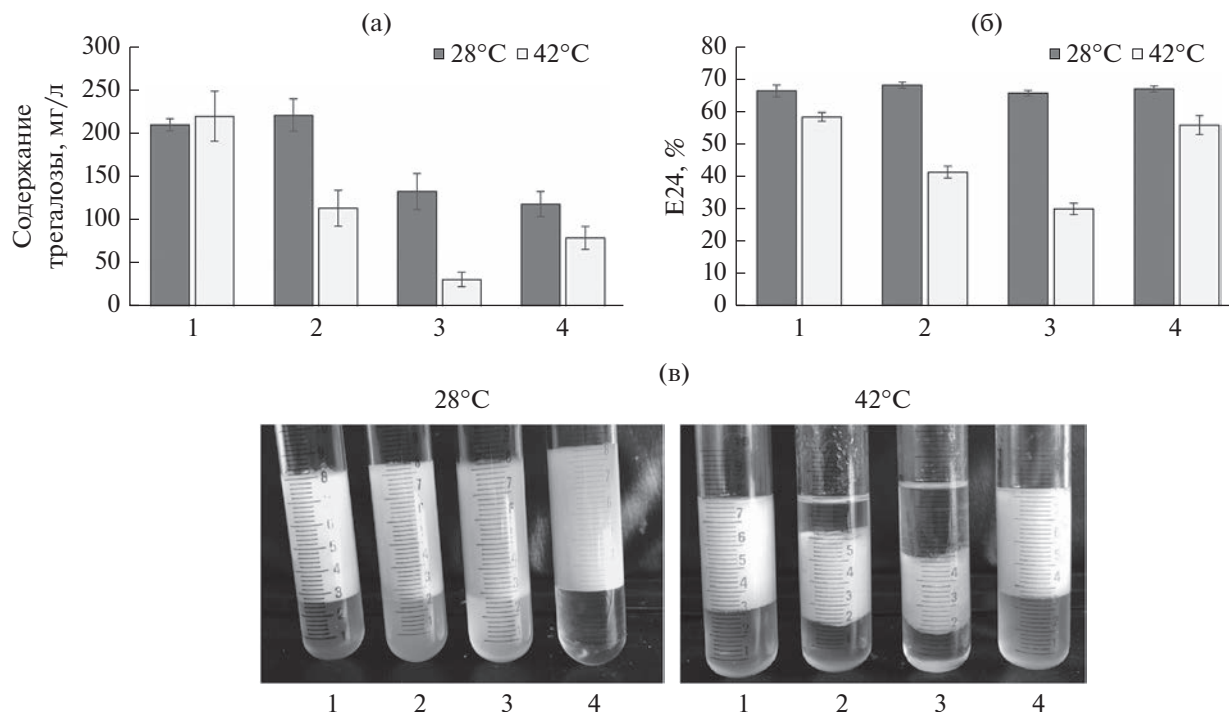


Рис. 5. Эффективность синтеза биоПАВ при разных температурах через 96 ч культивирования в минимальной среде с гексадеканом бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap: 1 – исходный штамм; 2 – мутант с инактивированными генами *groESL*; 3 – мутант с инактивированным геном *hrcA*; 4 – мутант с инактивированным геном *dnaJ*; (а) – содержание трегалозы в сыром сурфактанте; (б) – индекс эмульгирования; (в) – эмульгирующая активность.

локализовалась за геном *hrcA*, в 3'-концевой последовательности которого располагается регуляторный участок, способный обеспечивать ее считывание РНК-полимеразой, связанной с альтернативным фактором σ^H (рис. 1).

На основании ранее полученных результатов предполагали, что продуцируемые бактериями *R. pyridinivorans* 5Ap биоПАВ имеют сложную химическую природу, и их эмульгирующая активность обеспечивается содержащими трегалозу сурфактантами и соединениями другого химического состава (Bukliarevich et al., 2023). В связи с этим у мутантов с нарушенными генами *hrcA*, *dnaJ* и *groESL* определяли количество синтезируемых трегалолипидов и индекс эмульгирования. В результате было установлено, что при температуре 28°C в среде с гексадеканом все мутантные бактерии сохраняли эмульгирующую активность, тогда как синтез трегалолипидов снижался у вариантов с нарушенными генами *hrcA* и *dnaJ* в 1.5 и 1.8 раза соответственно (рис. 5). При повышенном температурном режиме (42°C) снижение синтеза трегалолипидов регистрировали для всех исследованных мутантных вариантов. Для мутантов с нарушенными генами *groESL* и *dnaJ*, соответственно, в 1.7 и в 2.5 раза, а у мутанта с нарушенным геном *hrcA* – в 6.6 раза. В то же время эмульгирующая активность не снижалась у му-

танта с нарушенным геном *dnaJ* и достоверно уменьшалась у вариантов с нарушенными генами *groESL* и *hrcA* в 1.4 и 1.9 раза соответственно (рис. 5). Снижение синтеза трегалолипидов в отсутствие влияния на эмульгирующую активность при разных температурных режимах у мутанта с нарушенным геном *dnaJ* может свидетельствовать в пользу того, что данные соединения не являются ключевыми в составе биоПАВ. Действительно, при оптимизации условий культивирования наблюдали увеличение индекса эмульгирования, тогда как количество трегалолипидов практически не менялось (не более 200–300 мг/л, что более чем в 100 раз меньше известных продуцентов) (Bukliarevich et al., 2023). В то же время структурные Gro и регуляторный HrcA белки играют важную роль в синтезе трегалолипидов и эмульгаторов вне зависимости от температурных условий. Отсутствие влияния мутации *groESL* на синтез биоПАВ при 28°C объясняется тем, что при этой температуре шапероны GroESL в норме (без мутации) синтезируются в небольшом количестве, и их функция заключается в придании белку HrcA свойства репрессора. В отсутствие функциональной активности гена *hrcA* при температуре 28°C возрастала экспрессия генов *groESL* и *groEL2* (рис. 4), что могло влиять на увеличение образования эмульгаторов. Следует отметить, что подобное увеличение эмульгирующей активности наблюдали для бактерий *R. eryth-*

ropolis PR4 в присутствии дополнительных копий гена *groEL2* (Takahara et al., 2014). Снижение синтеза трегалолипидов и эмульгаторов при 42°C у мутантов с нарушенными генами *groESL* и *hrcA* свидетельствует об их значимости в синтезе биоПАВ. При этом отсутствие функционально активного белка GroESL частично компенсируется присутствием ненарушенного шаперона GroEL2. В то же время отсутствие регуляторного белка HrcA, утратившего функцию репрессора при 42°C, в большей степени снижало продукцию биоПАВ.

Таким образом, полученные результаты свидетельствовали о влиянии продуктов генов *hrcA*, *dnaJ* и *groESL* на синтез биоПАВ бактериями *R. pyridinivorans* 5Ap. Продукты генов *dnaJ* и *hrcA* необходимы для синтеза трегалолипидов при разных температурных режимах, причем их роль возрастала при повышенной температуре (у мутанта с нарушенным геном *dnaJ* синтез трегалолипидов при температуре 28 и 42°C снижался в 1.8 и в 2.5 раза соответственно, а у мутанта с нарушенным геном *hrcA* — в 1.5 и в 6.6 раза соответственно). В то же время эмульгирующая активность не изменялась у всех мутантных вариантов при 28°C и уменьшалась при температуре 42°C в 1.4 и 1.9 раза соответственно у мутантов с нарушенным геном *groESL* и *hrcA*.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнялась при финансовой поддержке Государственной программы научных исследований (НИР № 3.6.2), грантов Министерства Образования Республики Беларусь (НИР № 752/57 и НИР № 757/57).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Букляревич А.А., Чернявская М.И., Охремчук А.Э., Валентович Л.Н., Титок М.А. Влияние структурных и регуляторных белков теплового шока на деградацию углеводов бактериями *Rhodococcus pyridinivorans* 5Ap // Микробиология. 2019. Т. 88. С. 553–561.

Bukliarevich H.A., Charniauskaya M.I., Akhremchuk A.E., Valentovich L.N., Titok M.A. Effect of the structural and regulatory heat shock proteins on hydrocarbon degradation by *Rhodococcus pyridinivorans* 5Ap // Microbiology (Moscow). 2019. V. 88. P. 573–579.

Букляревич А.А., Гуринович А.С., Филонов А.Е., Титок М.А. Молекулярно-генетический и функциональный анализ генов бактерий рода *Rhodococcus*, кодирующих синтез алкан-1-монооксигеназ // Микробиология. 2023. Т. 92. С. 1–15.

Bukliarevich H.A., Gurinovich A.S., Filonov A.E., Titok M.A. Molecular-genetic and functional analysis of genes of *Rhodococcus* bacteria encoding synthesis alkan-1-monoxygenase // Microbiology. 2023. V. 92. № 2. P. 1–15.

Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Клименко Ю.А. Интенсификация синтеза поверхностно-активных веществ при культивировании *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1 на гексадекане // Прикл. биохимия и микробиология. 2010. Т. 46. С. 651–658.

Pirog T.P., Shevchuk T.A., Klimenko I.A. Intensification of surfactant synthesis in *Rhodococcus erythropolis* EK-1 cultivated on hexadecane // Appl. Biochem. Microbiol. 2010. V. 46. P. 599–606.

Becker S.H., Ulrich K., Dhabaria A., Ueberheide B., Beavers W., Skaar E.P., Iyer L.M., Aravind L., Jakob U., Darwin K.H. Mycobacterium tuberculosis Rv0991c is a redox-regulated molecular chaperone // mBio. 2020. V. 11. e01545-20.

Blumenstein J., Rädisch R., Štěpánek V., Grulich M., Dostálová H., Pátek M. Identification of *Rhodococcus erythropolis* promoters controlled by alternative sigma factors using *in vivo* and *in vitro* systems and heterologous RNA polymerase // Curr. Microbiol. 2022. V. 79. Art. 55.

Cooper D.G., Goldenberg B.G. Surface-active agents from two *Bacillus* species // Appl. Environ. Microbiol. 1987. V. 53. P. 224–229.

Coppens L., Lavigne R. SAPPHERE: a neural network-based classifier for $\sigma 70$ promoter prediction in *Pseudomonas* // BMC Bioinform. 2020. V. 21. Art. 415.

DuBois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith Fred. Colorimetric method for determination of sugars and related substances // Anal. Chem. 1956. V. 28. P. 350–356.

Ferreira A., O'Byrne C.P., Boor K.J. Role of σB in heat, ethanol, acid, and oxidative stress resistance and during carbon starvation in *Listeria monocytogenes* // Appl. Environ. Microbiol. 2001. V. 67. P. 4454–4457.

Hu Y., Oliver H.F., Raengpradub S., Palmer M.E., Orsi R.H., Wiedmann M., Boor K.J. Transcriptomic and phenotypic analyses suggest a network between the transcriptional regulators HrcA and σB in *Listeria monocytogenes* // Appl. Environ. Microbiol. 2007. V. 73. P. 7981–7991.

Iwabuchi N., Sunairi M., Anzai H., Nakajima M., Harayama S. Relationships between colony morphotypes and oil tolerance in *Rhodococcus rhodochrous* // Appl. Environ. Microbiol. 2000. V. 66. P. 5073–5077.

Jung J., Noh J., Park W. Physiological and metabolic responses for hexadecane degradation in *Acinetobacter oleivorans* DR1 // J. Microbiol. 2011. V. 49. P. 208–215.

Kaczorek E., Pacholak A., Zdarta A., Smulek W. The impact of biosurfactants on microbial cell properties leading to hydrocarbon bioavailability increase // Colloids and Interfacial. 2018. V. 2. Art. 35.

Kato T., Miyanaga A., Kanaya S., Morikawa M. Alkane inducible proteins in *Geobacillus thermoleovorans* B23 // BMC Microbiol. 2009. V. 9. Art. 60.

Kuyukina M.S., Ivshina I.B. *Rhodococcus* Biosurfactants: biosynthesis, properties, and potential applications // Biol-

- ogy of *Rhodococcus*, Microbiology Monographs / Ed. Alvarez H.M. Berlin, Heidelberg: Springer, 2010. P. 291–313.
- Kuyukina M.S., Ivshina I.B., Philp J.C., Christofi N., Dunbar S.A., Ritchkova M.I. Recovery of *Rhodococcus* biosurfactants using methyl tertiary-butyl ether extraction // J. Microbiol. Methods. 2001. V. 46. P. 149–156.
- Larkin M.J., Kulakov L.A., Allen C.C.R. Biodegradation and *Rhodococcus*-masters of catabolic versatility // Curr. Opin. Biotechnol. 2005. V. 16. P. 282–290.
- Nie Y., Chi C.-Q., Fang H., Liang J.-L., Lu S.-L., Lai G.-L., Tang Y.-Q., Wu X.-L. Diverse alkane hydroxylase genes in microorganisms and environments // Sci. Rep. 2014. V. 4. Art. 4968.
- Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M. The UGENE team. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit // Bioinformatics. 2012. V. 28. P. 1166–1167.
- Ortiz de Orué Lucana D., Wedderhoff I., Groves M.R. ROS-mediated signalling in bacteria: zinc-containing Cys-X-X-Cys redox centres and iron-based oxidative stress // J. Signal Transduct. 2012. V. 2012. Art. 605905.
- Pátek M., Grulich M., Nešvera J. Stress response in *Rhodococcus* strains // Biotechnol. Adv. 2021. V. 53. Art. 107698.
- Pfaffl M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR // Nucl. Acids Res. 2001. V. 29. Art. e45.
- Riele H. te, Michel B., Ehrlich S.D. Single-stranded plasmid DNA in *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. P. 2541–2545.
- Roncarati D., Danielli A., Scarlato V. The HrcA repressor is the thermosensor of the heat-shock regulatory circuit in the human pathogen *Helicobacter pylori* // Mol. Microbiol. 2014. V. 92. P. 910–920.
- Roncarati D., Scarlato V. Regulation of heat-shock genes in bacteria: from signal sensing to gene expression output // FEMS Microbiol. Rev. 2017. V. 41. P. 549–574.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- Schäfer A., Tauch A., Jäger W., Kalinowski J., Thierbach G., Pühler A. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum* // Gene. 1994. V. 145. P. 69–73.
- Schumann W. Regulation of bacterial heat shock stimulons // Cell Stress Chaperones. 2016. V. 21. P. 959–968.
- Solovyev V., Salamov A. Automatic annotation of microbial genomes and metagenomic sequences // Metagenomics and Its Applications in Agriculture, Biomedicine and Environmental Studies / Ed. Li R.W. Nova Science Publishers, 2011. P. 61–78.
- Sutcliffe I., Brown A., Dover L. The rhodococcal cell envelope: composition, organisation and biosynthesis // Biology of *Rhodococcus*. Microbiology Monographs / Ed. Alvarez H.M. Berlin, Heidelberg: Springer, 2010. P. 29–71.
- Takahara H., Ogiwara J., Yoshida T., Okuda S., Nakajima M., Iwabuchi N., Sunairi M. Enhanced translocation and growth of *Rhodococcus erythropolis* PR4 in the alkane phase of aqueous-alkane two phase cultures were mediated by GroEL2 overexpression // Microbes Environ. 2014. V. 29. P. 346–352.

Role of the Structural and Functional Genes Encoding Heat Shock Proteins in Biosurfactant Synthesis by *Rhodococcus pyridinivorans* 5Ap

H. A. Bukliarevich¹ and M. A. Titok^{1, *}

¹Belarusian State University, Minsk, 220030 Belarus

*e-mail: ma_titok@bsu.by

Received January 18, 2023; revised February 20, 2023; accepted March 1, 2023

Abstract—The role of *groESL* and *dnaJ* structural genes and *hrcA* regulatory gene, encoding the synthesis of heat shock proteins, in biosurfactant synthesis by *R. pyridinivorans* 5Ap was determined. The CIRCE binding sites for the regulatory protein coded by *hrcA* gene were revealed in the promoter regions of *groESL*, *groEL2*, and *fmdB* genes. *GroESL* and *groEL2* genes expression during the late exponential phase in the medium with hexadecane at 42°C was higher than at 28°C (4.4 and 5.3 times, respectively). At the same time, no changes in expression of *hrcA* and *fmdB* genes were observed at two different temperature modes (28 and 42°C). In the absence of the negative regulator HrcA, *groESL* expression increased 14.4 and 3.5 times, that of *groEL2*, 9.6 and 2.7 times, and that of *fmdB*, 1.82 and 2.52 times at 28 and 42°C, respectively. Products of *dnaJ* and *hrcA* genes were required for trehalolipid synthesis at different temperature modes, with their role increasing at higher temperature (synthesis of trehalolipids by the mutant with impaired *dnaJ* gene decreased 1.8 and 2.5 times compared to 1.5 and 6.6 times, for the mutant with impaired *hrcA* at 28 and 42°C, respectively). At the same time, emulsifying activity of all mutant variants did not change at 28°C and decreased 1.4 and 1.9 times 42°C for the mutants with impaired *groESL* and *hrcA* genes, respectively. Our results indicated the complex chemical nature of the biosurfactants produce by *R. pyridinivorans* 5Ap (emulsifiers, including trehalolipids and compounds of other chemical composition). The Gro chaperones and the HrcA regulatory protein play the key roles in synthesis of these compounds at different temperature modes, while the *dnaJ* is required only for trehalolipid synthesis.

Keywords: *Rhodococcus*, *groESL*, *dnaJ*, *hrcA*, hrcA repressor, biosurfactants

ВЛИЯНИЕ ГОРМОНОВ И БИОГЕННЫХ АМИНОВ НА РОСТ И ВЫЖИВАНИЕ *ENTEROCOCCUS DURANS*

© 2023 г. Г. И. Эль-Регистан^а, О. В. Земскова^а, О. А. Галуза^а, Р. В. Уланова^а, Е. А. Ильичева^а, А. В. Ганнесен^а, Ю. А. Николаев^а, *

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

*e-mail: nikolaevya@mail.ru

Поступила в редакцию 23.03.2023 г.

После доработки 25.03.2023 г.

Принята к публикации 26.03.2023 г.

Молочнокислые бактерии (МКБ) являются важной составляющей микробиома человека. Они могут синтезировать и реагировать на сигналы гуморальной системы регуляции человека (гормоны, нейромедиаторы), однако феноменология и механизмы отклика МКБ на эти медиаторы исследованы недостаточно. В работе показано, что эстроген замедляет рост и развитие *E. durans*, норадреналин, эстроген, мозговой натрийуретический пептид дозозависимо продлевают стационарную фазу роста культуры. Сердечный натрийуретический пептид и эстроген стимулируют развитие биопленок культуры *E. durans*, что отмечено впервые. Частота образования персистеров зависит от типа роста бактерий – планктонного или биопленочного, и более выражена при биопленочном росте. Адреналин и норадреналин дозозависимо стимулировали, а остальные гормоны ингибировали образование персистеров в жидких культурах МКБ. В биопленках действие на образование персистеров имело иной характер: натрийуретические пептиды дозозависимо стимулировали образование персистеров, существенного ингибирования не оказывал ни один из гормонов. Клетки-персистеры *E. durans* через несколько месяцев инкубации созревали в термотолерантные анабиотические формы покоя, характеризующиеся типичными ультраструктурными особенностями. Впервые показано, что популяция покоящихся форм *E. durans* включает формы, различающиеся глубиной покоя, в том числе жизнеспособные, но некультивируемые формы.

Ключевые слова: молочнокислые бактерии, *Enterococcus durans*, биогенные амины, натрийуретические пептиды, эстроген, рост, формы выживания

DOI: 10.31857/S0026365623600116, EDN: RLAEIM

Молочнокислые бактерии (МКБ) являются одной из наиболее широко изучаемых групп микроорганизмов в связи с их доминирующим положением среди бактерий – симбионтов растений, животных и человека. Постоянный интерес к МКБ, обусловленный их практической значимостью в медицине, нутрициологии, биотехнологии, является причиной поиска их новых физиологических характеристик. Обнаружение способности МКБ микробиома человека синтезировать биогенные амины, структурно идентичные нейромедиаторам человека, послужило основанием для развития нового научного направления – микробной эндокринологии, изучающей роль нейромедиаторов в контроле развития функционирования и двунаправленной коммуникации МКБ микробиома человека и организма хозяина (Lyte, 2010, 2013). Функции микробных биогенных аминов у свободноживущих МКБ неясны, в основном изучается их влияние на рост бактери-

альных культур *in vitro* (Олескин и соавт., 1998, 2016, 2020).

Следует отметить, что в природных экосистемах периоды роста микробных популяций (культур) всегда сменяются периодами выживания в неростовых условиях, существенно более длительными, чем периоды роста. В смене этих стратегий развития микробных популяций ключевую роль играет изменение окружающих условий с благоприятствующих росту на неблагоприятные. На популяционном уровне смену стратегий развития контролируют внеклеточные, плотностные регуляторы, представленные аутоиндукторами QS-систем, алкилрезорцинами т.д. (Fuqua et al., 1994; Эль-Регистан и соавт., 2006; Олескин и соавт., 2020). О влиянии биогенных аминов на развитие популяций МКБ в наступающих неростовых условиях информации нет, хотя сам тип действия биогенных аминов, как коммуникативных сигнальных метаболитов, предполагает их возможное участие в процессах выживания микро-

организмов. Отметим также, что гормональные метаболиты иной химической природы потенциально также могут участвовать в регуляции развития микробной компоненты организма хозяина.

Стратегия выживания микробной популяции, как своеобразного многоклеточного организма (*Bacteria as Multicellular Organisms*, 1997), реализуется как генетическая программа стационарной фазы, где происходит экспрессия новых регулонов, изменяется тип метаболизма клеток, они переходят в состояние пролиферативного покоя. В этом состоянии клетки приобретают свойства стрессоустойчивости, что сопряжено, в том числе, с изменениями качественного состава липидов и структурного состояния мембран (Strahi et al., 2017), а также образованием биокристаллического нуклеоида (Dadinova et al., 2019). Если неростовые условия окружающей среды сохраняются, цикл развития бактериальной популяции завершается образованием анабиотических метаболически покоящихся форм (ПФ), длительно (месяцы–годы–миллионы лет) сохраняющих жизнеспособность, т.е. способных при наступлении благоприятных условий прорасти и воспроизвести родительскую популяцию (Эль-Регистан и соавт., 2006).

У спорообразующих бактерий покоящиеся формы представлены эндоспорами, экзоспорами, конидиями и др., а у неспорообразующих бактерий, к которым относится подавляющее большинство патогенных бактерий, а также МКБ – цитостоподобными покоящимися клетками (ЦПК) (Мулюкин и соавт., 2009, 2014; Погорелова и соавт., 2009; Голод и соавт., 2009). Другой формой покоя являются жизнеспособные некультивируемые клетки (ЖНК) (Colwell et al., 1985; Kell et al., 1998; Ayrapetyan et al., 2015, 2018), требующие для реверсии к росту специальных процедур (Karpelyants et al., 1994).

Открытие в середине XX века феномена персистенции патогенных бактерий в организме хозяина и клеток-персистеров (П), выживающих при летальных воздействиях антибиотиков (Bigger, 1944), а также последующее широкое изучение этого феномена (Balaban et al., 2004; Lewis, 2010) позволили существенно пересмотреть представление об адаптивных механизмах выживания микроорганизмов. Персистеры – это клетки малочисленной (~1%) субпопуляции, образующиеся в результате цитодифференцировки, не- или крайне медленно делящиеся, выживающие в присутствии биоцидных доз антибиотиков, при наступлении благоприятных условий восстанавливающие способность к делению и воспроизводящие родительскую популяцию (Balaban et al., 2004; Lewis, 2010; van der Bergh, 2017; Chebotar et al., 2021). Биологической функцией П является сохранение популяции в случае внезапно наступивших не-

благоприятных условий окружения. На частоту образования П влияют стрессовые условия: дефицит питания, окислительный стресс, гипоксия, повышение концентрации плотностных регуляторов и др. (van der Bergh, 2017; Kaldalu et al., 2020).

Исследование образования П и ПФ у бактерий *Pseudomonas aeruginosa* PA01 и *Escherichia coli* K12 позволили сформулировать гипотезу о персистерах как предшественниках ПФ, в которых завершены молекулярно-генетические процессы цитодифференцировки, но не завершены процессы приобретения анабиотического состояния (Мулюкин и соавт., 2015; Лойко и соавт., 2015).

Подавляющее большинство исследований П выполнено на (условно)патогенных бактериях, персистирующих в организме человека (хозяина), однако формы выживания молочнокислых бактерий, как самой обширной группы симбионтов, не изучались, равно как и влияние на их образование биогенных аминов и гормонов человека. Вместе с тем вопросы периодичности развития и выживания МКБ-симбионтов человека в условиях нормы и при стрессорных воздействиях, в том числе антибиотиков, являются базовыми для “регуляции функционирования микробиоты, участвующей прямо или опосредованно во всех физиологических функциях, метаболических, поведенческих и сигнальных реакциях организма-хозяина, человека” (Олескин и соавт., 2020).

Исходя из изложенного, целью настоящего исследования было изучить влияние биогенных аминов и гормонов неаминной природы на развитие популяций молочнокислых бактерий *Enterococcus durans*, образование форм их выживания: клеток-персистеров и анабиотических покоящихся форм.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования – молочнокислая бактерия *Enterococcus durans* из коллекции культур UNIQEM Института микробиологии им. С.Н. Виноградского ФИЦ Биотехнологии РАН.

Способы культивирования. Бактерии культивировали в жидких и на плотных средах MRS (“Conda Pronadisa”, Испания) и LB (бульон Луриа-Бертани, США). Для получения инокулята 1 петлю бактерий, поверхностно растущих на агаризованной среде (1.5% агара) перенесли в пенициллиновые флаконы (30 мл) с 5 мл среды и культивировали в течение ночи на шейкере Biosan PSU-20i (“Biosan”, Латвия), (150 об./мин) при температуре 27°C.

Поверхностные культуры выращивали на плотной питательной среде LB (22 г агара/л) в чашках Петри (92 × 16 мм). Чашки засеивали 5 мкл инокулята – ночной жидкой микробной культу-

ры и инкубировали в термостате суховоздушном ТС 1/80 СПУ (Россия) при 34°C в течение 24 ч.

Планктонные культуры выращивали двумя способами: традиционным в колбах, а также в планшетном культиваторе. Инокулят в количестве 2–5% вносили в жидкую среду MRS (50 мл в конической колбе объемом 250 мл). Засеянные культуры инкубировали в течение 1 сут при температуре 28°C на роторной качалке (100 об./мин) (“Проинтех-Био”, Россия). В динамике периодического роста определяли оптическую плотность (ОП) культур (спектрофотометр Jenway 7315; $\lambda = 540$ нм; $l = 1$ см).

При культивировании бактерий в 96-луночных полистироловых плоскодонных иммунологических планшетах (“NUNC”) в лунки планшета вносили по 200 мкл питательной среды MRS и инокулят (0.1–1% об./об.), инкубировали при 34°C в культиваторе-спектрофотометре “BioRad xMark” (США) в течение 24–72 ч, измеряя ОП культур при $\lambda = 540$ нм. По полученным данным определяли параметры периодического роста жидких культур, удельную скорость роста, скорость отмирания, время генерации, урожай. В последнем варианте также определяли наличие биопленки (БП) и ее количество после перехода культур в стационарную фазу роста. Количество БП определяли как разницу суммарной ОП жидкой фазы БП после удаления жидкости, представляли в процентном соотношении (O’Toole, 2011).

Получение биопленок на стекловолоконных фильтрах. Для получения биопленок на фильтровальную бумагу из стекловолокна (GF/F Whatman) нарезали на квадраты размером 2 × 2 см, стерилизовали при 1 атм. и стерильно накладывали на поверхность плотной питательной среды LB в чашках Петри (5 мл среды). На каждый фильтр наносили по 20 мкл (9.6×10^6 КОЕ/мл) стационарной планктонной культуры бактерий. Чашки Петри инкубировали в термостате при 34°C в течение 24 ч. После завершения инкубации фильтры переносили в пробирки типа Фалькон (50 мл) с 10 мл физиологического раствора и стерильными стеклянными шариками и обрабатывали на гомогенизаторе (Bio Vortex V-1 plus; “Biosan”, Латвия) в импульсном режиме. Из полученной суспензии (10 мл) готовили 10-кратные разведения в физиологическом растворе и высевали по 25 мкл на чашках Петри с плотной питательной средой LB. Чашки с посевами инкубировали 48 ч при 34°C, после чего определяли число КОЕ, рассчитывая на 1 мл суспензии.

Полученные после разрушения фильтров суспензии клеток использовали для определения в них количества персистеров.

Численность жизнеспособных клеток (колониеобразующих единиц, КОЕ) определяли микроме-

тодом, высевая аликвоты десятичных разведений культур объемом 5 мкл на плотную среду LB.

Микроскопические исследования. Морфологию клеток бактерий изучали в световом микроскопе (“Leitz Wetzlar Orthoplan”, Германия) с фазовым конденсором в светлом поле, используя препараты “раздавленной капли”.

Электронная просвечивающая микроскопия. Для изучения ультраструктурной организации клеток использовали электронный просвечивающий микроскоп (Jeol Jem-1400, “Jeol”, Япония, ускоряющее напряжение 120 кВ, инструментальное увеличение от 10000 до 35000 раз). Осажденные клетки культур разного возраста фиксировали в 1.5% растворе глутарового альдегида в 0.05 М какодиалатном буфере (pH 7.2) при 4°C в течение 1 ч, трижды отмывали в том же буфере и дополнительно фиксировали в 1% растворе OsO₄ в 0.05 М какодиалатном буфере (pH 7.2) в течение 3 ч при 20°C. После обезвоживания материал заключали в эпоксидную смолу Epon 812. Ультратонкие срезы контрастировали в течение 30 мин в 3% растворе уранилацетата в 70% этаноле и докрашивали цитратом свинца по Рейнольдсу при 20°C в течение 4–5 мин.

Терморезистентность покоящихся и вегетативных клеток бактерий определяли как долю выживших клеток (КОЕ/мл) после прогревания аликвоты (500 мкл) бактериальной культуры при температуре 60°C в течение 30 мин (условия подбирали в предварительных опытах) в пластиковых пробирках типа Эппендорф на термошейкере (TS-100 Biosan).

Получение покоящихся форм (ПФ) бактерий. ПФ получали в культурах, развивающихся в: (а) жидкой среде MRS; (б) MRS, разбавленный в 6 раз; (в) MRS с уменьшенным в 6 раз содержанием фосфора; (г) молоке; (д) молоке, разбавленном в 3 и 10 раз, в колбах объемом 250 мл с 50 мл среды при температуре 33°C на шейкере до стационарной фазы роста. Выросшие культуры хранили в статическом режиме при температуре 20–25°C в течение 3–8 мес. в условиях, различающихся по доступу кислорода и плотности образующегося клеточного осадка: (а) в колбах объемом 250 мл (50 мл культуры) с ватной пробкой в условиях доступа кислорода; (б) в пробирках Хангейта (16 мл) с ватной пробкой при доступе кислорода; (в) в пробирках Хангейта (16 мл) с крышечкой и септой без свободного доступа кислорода.

Определение численности персистеров. Численность П в стационарных культурах энтерококков определяли как долю (%) клеток, выживающих после обработки культуры антибиотиками (Balaban et al., 2019) или лизирующим раствором на основе лизоцима и детергента SDS (Canas-Duarte et al., 2014). Предварительно определили чувствительность энтерококков к антибиотикам и выбрали

наиболее эффективный – ампициллин в концентрации 10 мг/мл.

Определение численности персистеров в стационарных планктонных культурах бактерий при их селекции лизирующим раствором. Аликвоту стационарной (21–22 ч) планктонной культуры (предварительно разведенной средой LB (1 : 100) объемом 1 мл переносили в пробирку типа Эппендорф (объемом 2 мл), добавляли 10 мкл додецилсульфата натрия (0.01% в конечном объеме) и раствор лизоцима (2000 ед./г, “Applichem”). В контрольные варианты лизирующую смесь не добавляли. Пробирки с опытными и контрольными вариантами инкубировали в течение 24 ч на термостатной установке TS-100 (“Biosan”, Латвия) при 34°C 800 об./мин. Аликвоты отбирали периодически в течение 24 ч, определяли в них число жизнеспособных клеток (КОЕ/мл) и строили кривые отмирания клеток.

Определение численности персистеров в стационарных планктонных культурах бактерий при их селекции антибиотиком. Аликвоту культуры стационарной фазы роста, предварительно разведенной средой LB (1 : 100) объемом 1 мл, переносили в пробирку типа Эппендорф (объемом 2 мл), добавляли 100 мкл раствора ампициллина в дозе 10 МИК (10 мг/мл). В контрольные варианты антибиотик не вносили. Флаконы инкубировали в течение 3 ч в термостате при 34°C, после чего из всех флаконов отбирали аликвоты, отмывали однократно от антибиотика физраствором при центрифугировании (3000 g, 5 мин), удаляли надосадочную жидкость и добавляли свежую среду до исходного объема. Затем в течение 6 ч отбирали аликвоты, делали десятичные разведения, высевали на чашки Петри с агаризированной средой LB микрометодом для определения титра КОЕ, как описано выше, и строили кривые отмирания клеток.

Определение численности персистеров в биопленках при их селекции антибиотиком. Биопленочные культуры (24 ч) на стекловолоконных фильтрах разрушали, как описано выше, и получали 10 мл суспензии. Отбирали 10 мкл суспензии, разбавляли 1 : 100 стерильной средой LB в пробирке типа Эппендорф объемом 2 мл. Далее в опытные варианты добавляли антибиотик ампициллин в дозе 10 мг/мл и инкубировали пробирки в течение 3 ч при 34°C на термостатной установке. В контрольные варианты антибиотик не добавляли. После инкубации микробные культуры в пробирках центрифугировали (5000 g, 5 мин), надосадочную жидкость удаляли, осадок промывали 3 раза стерильной средой LB, ресуспендировали в ней до исходного объема (1 мл). Из полученной суспензии готовили 10-кратные разведения в физиологическом растворе, высевали на чашки Петри для определения КОЕ/мл, как описано выше, и строили кривые отмирания клеток.

Кривые отмирания ординарных клеток для определения частоты образования П строили по показателям численности КОЕ/мл в отбираемых пробах при 5 повторностях в каждой пробе и отборе проб из 3-х параллельных пробирок. Частоту образования П определяли на “плато” – постоянной численности КОЕ/мл в течение не менее 3 ч на кривых отмирания культур (Kaldalu et al., 2016). Долю (%) персистеров рассчитывали, как отношение КОЕ/мл на плато к числу КОЕ/мл в исходной культуре до внесения антибиотика (100%).

Определение влияния гормонов на частоту образования персистеров в планктонной культуре бактерий. В пенициллиновые флаконы объемом 40 мл с 5 мл среды MRS вносили инокулят – стационарную культуру *E. durans*, (2% об./об.), затем вносили гормоны: адреналин, норадреналин, предсердный натрийуретический пептид (ANP), мозговые натрийуретические пептиды типов В (BNP) и С (CNP), а также женский половой гормон эстроген, в физиологических концентрациях (25 мкл) и в десятикратных (250 мкл) концентрациях (на 5 мл среды), мг/мл: адреналин – 9.0×10^{-7} ; норадреналин – 6.0×10^{-7} ; ANP – 2.0×10^{-8} ; BNP – 2.5×10^{-8} ; CNP – 6.0×10^{-9} ; эстроген – 6.0×10^{-8} . В контрольные варианты гормоны не вносили. Через 21–22 ч инкубации в стандартных условиях из всех вариантов отбирали две аликвоты: одну разбавляли в пропорции 1 : 100 в пенициллиновом флаконе стерильной средой MRS и определяли численность персистеров, как описано выше; из второй делали десятичные разведения и определяли численность КОЕ/мл микрометодом. Для определения численности персистеров в культуре опытных вариантов, разбавленные средой MRS в 100 раз, вносили антибиотик – ампициллин в количестве 10 МИК (10 мг/мл).

Определение влияния гормонов на частоту образования персистеров в биопленочных культурах бактерий. Стекловолоконные фильтры, полученные как описано выше, стерильно накладывали на поверхность плотной питательной среды LB в чашках Петри (5 мл среды). В опытных вариантах в незастывшую среду LB вносили испытуемые гормоны в физиологической (25 мкл) и десятикратной (250 мкл) концентрациях (на 5 мл среды). В контрольных вариантах в среду вносили соответствующее количество растворителя испытуемых веществ. На каждый фильтр наносили по 20 мкл стационарной (21–22 ч) планктонной культуры исследуемого микроорганизма. Чашки инкубировали в термостате при 34°C в течение 24 ч. После завершения инкубации фильтры с выросшей биопленкой гомогенизировали в 10 мл физиологического раствора, как описано выше. Из полученных суспензий готовили 10-кратные разведения в физиологическом растворе для: (а) опреде-

ления численности жизнеспособных клеток в контрольных (без гормонов) и опытных (с гормонами) вариантах, как описано выше; (б) определения численности П в опытных (с гормонами) и контрольных (без гормонов) вариантах, как описано выше.

Определение метаболической активности вегетативных клеток и покоящихся форм бактерий. Метаболическую активность бактериальных культур оценивали по интенсивности выделения CO_2 в герметично закрытых флаконах ($V = 30$ мл), содержащих 4 мл солевой среды MRS (буфер) и 400 мкл культуры до (эндогенное дыхание) и после (экзогенно стимулированное дыхание) внесения глюкозы (10% раствор, 400 мкл). Концентрацию CO_2 определяли на газовом хроматографе Кристалл-5000 (“Хроматэк”, Россия) и выражали в % $\text{CO}_2/\text{ч}$. Отбор воздушной пробы производили медицинским шприцем объемом 0.6 мл с герметичной насадкой для устранения улетучивания воздушной пробы.

Статистическая обработка экспериментальных данных. Все исследования были выполнены в 2–5 биологических повторах при 3 параллельных опытах. Данные экспериментов обрабатывали с помощью программы Microsoft Excel-2007 и дополнительных надстроек. При расчете титра КОЕ определяли среднее арифметическое и стандартное отклонение для $p < 0.05$. Различия между вариантами считали значимыми, если они превышали стандартное отклонение, рассчитываемое для каждой пары контроль–опыт, и обычно не превышающее 30%. На рисунках представлены данные типичных экспериментов, в таблицах – средние значения.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние гормонов на развитие планктонных периодических культур E. durans

При глубинном периодическом культивировании *E. durans* в колбах в жидкой среде MRS на роторной качалке (120 об./мин) цикл развития культуры включал: экспоненциальную фазу (до 5 ч роста), фазу линейного роста (5–20 ч роста), стационарную фазу, которая наступала через 21–22 ч роста. Показатели роста: удельная скорость роста – 0.32 ч^{-1} ; в экспоненциальной фазе роста максимальная удельная скорость роста – 0.68 ч^{-1} , время удвоения – 0.7 ч (около 42 мин); урожай – 9×10^8 КОЕ/мл.

При глубинном росте *E. durans* в 96-луночном планшете в жидкой среде MRS, температуре 30–33°C в течение 72 ч экспоненциальная фаза длилась около 5.5 ч при скорости роста 0.2 ч^{-1} и времени удвоения около 3 ч; фаза линейного роста – 5.5 ч, стационарная фаза – 49 ч, далее следовала

фаза отмирания. Максимальная оптическая плотность ОП = 2.3 ($\lambda = 540$ нм; $l = 1$ см). При этом около 30% ОП составила ОП биопленки, образующейся на дне лунок планшета.

При сравнении этих способов глубинного культивирования можно заключить, что при росте в планшете при меньшем массообмене и большем количестве инокулята культуры в два раза быстрее переходят в стационарную фазу. При планшетном культивировании энтерококков было зафиксировано наличие хорошо развитой биопленки, что свидетельствует о способности молочнокислых бактерий переходить от планктонного роста к биопленочному.

Влияние гормонов на рост и развитие E. durans при планшетном культивировании

При внесении гормонов вместе с инокулятом *лаг-фаза* не была зафиксирована ни в одном из вариантов. Экспоненциальная фаза роста (рис. 1а) дольше всего длилась в вариантах с десятикратной дозой эстрогена (10ф) (7 ч), что в 1.5 раза больше контрольного варианта и варианта с физиологической концентрацией адреналина (6 ч), а меньше всего – в вариантах с добавлением физиологической концентрации BNP (3.5 ч), что на 1.5 ч меньше, чем в контроле.

Удельная скорость роста *E. durans* в контрольных вариантах составляла 0.22 ч^{-1} (рис. 1б). Наименьшая удельная скорость роста была отмечена в вариантах с 10ф CNP и эстрогена (соответственно 0.12 и 0.14 ч^{-1}), что в 2 и 1.5 раза меньше, чем в контрольных вариантах. Во всех остальных вариантах достоверно стимулирующего или подавляющего рост действия гормонов не обнаружено.

Время генерации (рис. 1в) (удвоения) клеток в контрольном варианте составило 3 ч, максимальным этот показатель был в варианте с 10ф эстрогена – 7 ч, а также (5 ч) физиологической концентрацией норадреналина и (4.5 ч) CNP.

Урожай культуры (рис. 1г) *E. durans* в контроле, без добавления гормонов, соответствовал ОП = 2.3. Ингибирующее действие было зафиксировано в вариантах с физиологической концентрацией эстрогена – ОП = 2.098 (90% от контроля), а также с 10ф эстрогена – ОП = 1.880, и CNP – ОП = 1.989 (81 и 86% от контроля соответственно).

Таким образом, снижение удельной скорости роста (μ) прямо коррелировало с увеличением времени генерации и снижением урожая в вариантах действия: физиологических концентраций эстрогена, CNP и ANP и 10ф эстрогена и CNP.

Как было отмечено выше, в условиях роста в планшетном культиваторе-спектрофотометре контрольные культуры *E. durans* переходят в стационарную фазу через 10 ч роста. Большинство опытных

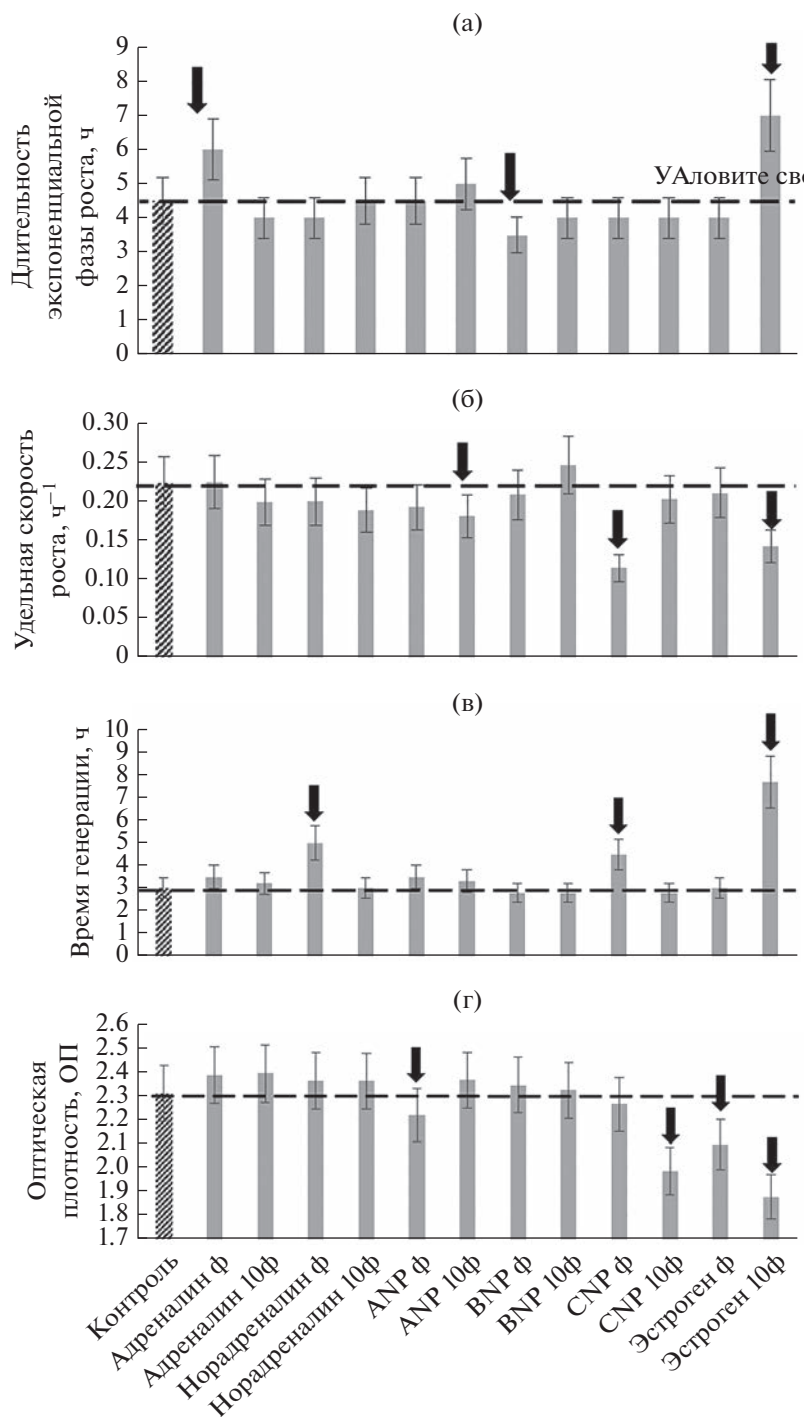


Рис. 1. Влияние гормонов на развитие планктонных периодических культур *E. durans* в планшетном культивирователе-спектрофотометре: (а) продолжительность фазы экспоненциальной фазы роста (ч); (б) удельная скорость роста (ч⁻¹); (в) время генерации (ч); (г) урожай (ОП); (д) время выхода на стационарную фазу (ч роста); (е) начало автолиза (ч роста); (ж) доля образовавшейся биопленки через 72 ч роста (% ОП). Стрелками отмечены достоверные результаты влияния гормонов, внесенных вместе с инокулятом, на показатели роста и развития культур. Обозначения: ф – физиологическая концентрация гормона; 10ф – десятикратная. * Варианты на рис. 1е, где фаза автолиза наступает позже 72 ч роста.

вариантов (рис. 1а) показали такие же результаты, кроме пролонгирования роста при физиологических концентрациях ANP (17 ч) и норадреналина

(16 ч), а также его десятикратной концентрации (15.5 ч). Пролонгирование времени роста было отмечено также в вариантах с десятикратной до-

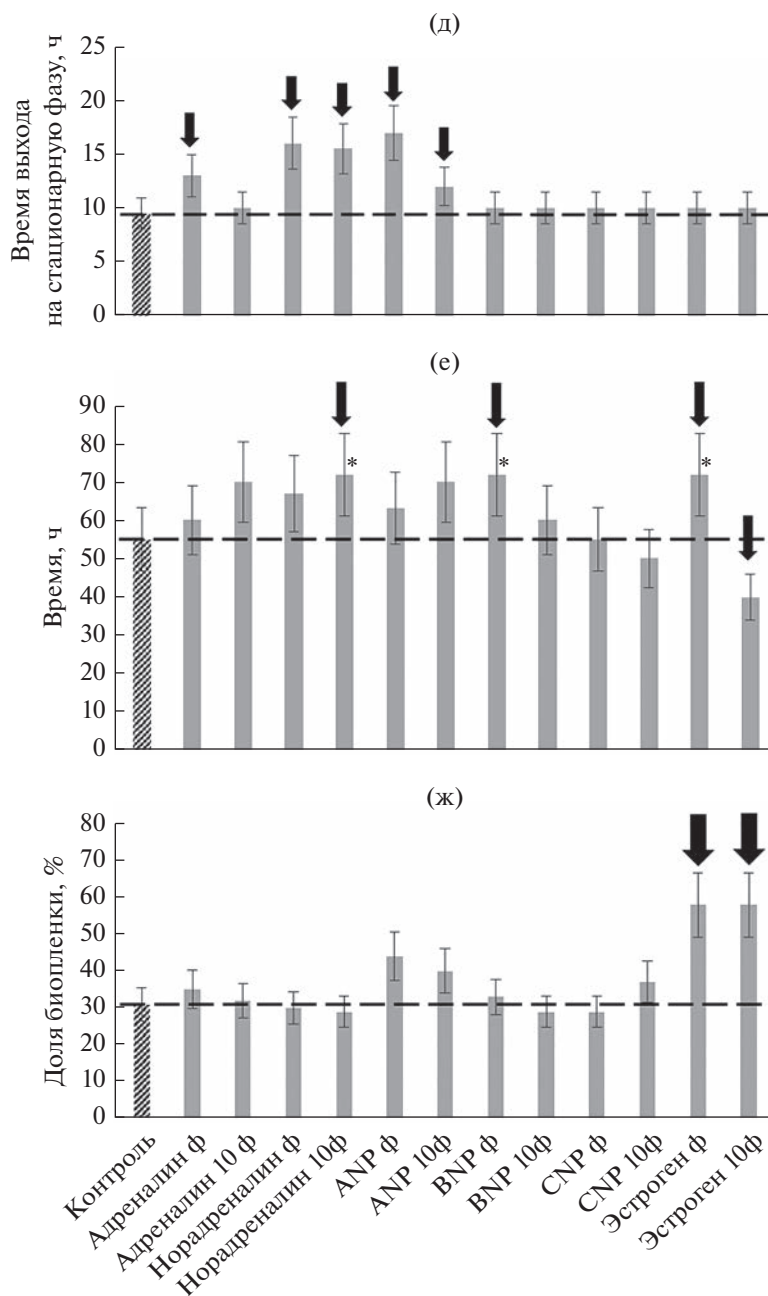


Рис. 1. Окончание.

зой ANP (12 ч) и физиологической концентрацией адреналина (13 ч) (рис. 1д).

Отмирание культур – фаза автолиза клеток (рис. 1е), в контрольном варианте началось на 55 ч роста. В опытных вариантах быстрее всего начало автолиза отмечалось при 10ф эстрогена (через 40 ч), а позже всего – в вариантах с десятикратной концентрации норадреналина и ANP, а также с физиологическими концентрациями BNP и эстрогена, что, возможно, свидетельствует

об их способности стабилизировать клетки и замедлять процесс их автолитического разрушения.

Таким образом, в десятикратной физиологической дозе эстроген замедляет и ингибирует рост и развитие культур *E. durans*. Гормоны норадреналин (десятикратная концентрация), эстроген (физиологическая концентрация), BNP (физиологическая концентрация) продлевают стационарную фазу роста культуры.

В табл. 1 обобщены экспериментальные данные, полученные в этом разделе исследования;

Таблица 1. Действие гормонов на ростовые характеристики *E. durans* при планшетном культивировании

Варианты	Длительность экспоненциальной фазы, ч	Время выхода на стационар, ч	Начало фаз		Удельная скорость роста, ч ⁻¹	Время генерации, ч	ОП
			замедления роста, ч	автолиза, ч			
Контроль	4.5	9.5	4.5	55	0.2245	3.0	2.313
Адреналин ф	6.0*	13.0*	5.0	60	0.2263	3.5	2.388
Адреналин 10ф	4.0	10.0	4.0	70*	0.1998	3.2	2.395*
Норадреналин ф	4.0	16.0*	5.0	67*	0.2006	5.0*	2.366
Норадреналин 10ф	4.5	15.5*	5.0	>72*	<i>0.1897</i>	3.0	2.364
ANP ф	4.5	17.0	5.0	63*	0.1937	3.5	2.222
ANP 10ф	5.0	12.0	4.0	70*	<i>0.1817</i>	3.3	2.368
BNP ф	3.5**	10.0	3.5**	>72*	0.2094	2.8	2.347
BNP 10ф	4.0	10.0	4.0	60	0.2470*	2.8	2.325
CNP ф	4.0	10.0	4.0	55	<i>0.1151</i>	4.5*	2.267*
CNP 10ф	4.0	10.0	3.5	50	0.204	2.8	<i>1.989</i>
Эстроген ф	4.0	10.0	5.0	>72*	0.2117	3.0	<i>2.098</i>
Эстроген 10ф	7.0*	10.0	8.0*	40	<i>0.1433</i>	7.7	<i>1.88</i>

* Значения больше, чем в контроле.

** Значения меньше, чем в контроле.

полужирным шрифтом отмечено подавление или стимуляция роста и развития культуры.

Важным свойством, на которое влияли гормоны, было развитие биопленок на дне и стенках лунок, что определяли при дифференцированном измерении оптической плотности культур в лунках через 72 ч роста. В контрольных вариантах доля биопленки составляла 30–31%. В опытных вариантах доля биопленок колебалась в пределах контрольных значений, кроме вариантов с десятикратной концентрацией CNP и эстрогена, где доля биопленки составляла 58–60%, что практически в два раза превышало контрольный уровень (рис. 1ж).

Стимулирующее влияние десятикратных физиологических концентраций гормонов CNP и эстрогена на развитие биопленки планшетных планктонных культур МКБ (*E. durans*) отмечено впервые.

Влияние гормонов на частоту образования персистеров в стационарных культурах E. durans

При наступлении неблагоприятных для роста условий бактериальные популяции реализуют стратегию выживания, включающую два генетически детерминированных события: переход в стационарную фазу и образование персистеров. Влияние гормонов на частоту образования персистеров определяли при их селекции ампициллином (0.25 мг/мл) в двух экспериментальных схе-

мах, соответствующих основным типам роста бактерий – в планктонной культуре (в пенициллиновых флаконах) и биопленке (на стекловолоконных фильтрах) при внесении гормонов вместе с инокулятом. Результаты влияния гормонов в их физиологических (ф) и 10ф концентрациях на рост планктонных культур энтерококков в пенициллиновых флаконах показали небольшое, но достоверное ингибирование роста (на 20–30% от контрольного варианта) (рис. 2а). Гормоны ингибировали также образование П во всех вариантах, кроме внесения адреналина и норадреналина в физиологических концентрациях (рис. 2б, табл. 2).

Однако действие гормонов на образование П в биопленочных культурах энтерококков имело противоположный характер. Биопленочные культуры развивались на стекловолоконных фильтрах при инокуляции 20 мкл стационарной планктонной культуры *E. durans* (9.6×10^6 КОЕ/мл). Через 24 ч численность клеток в контрольных вариантах достигала 4.68×10^8 КОЕ/мл. В опытных вариантах при внесении гормонов вместе с инокулятом общая численность биопленочных клеток существенно возрастала (рис. 3а). Наибольший титр клеток был в вариантах с внесением: ф и 10ф эстрогена и норадреналина, а также физиологической концентрации ANP.

Клетки-персистеры 24 ч контрольных и опытных биопленочных культур селектировали ампициллином (10 мг/мл). Шесть гормонов в физиологической и десятикратной концентрациях вно-

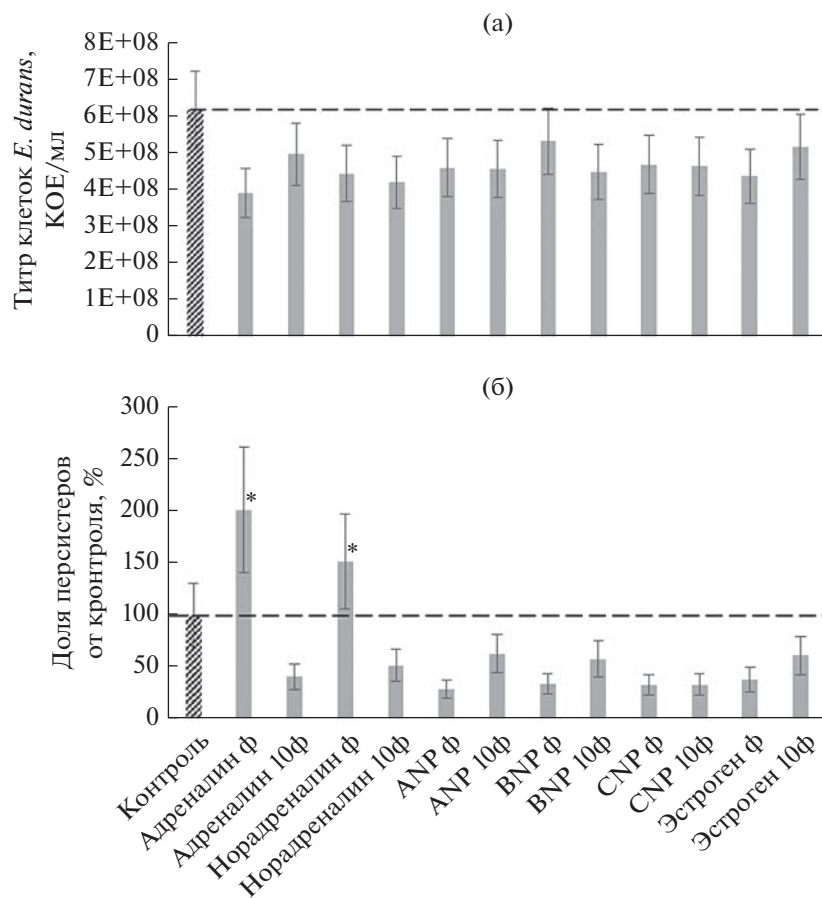


Рис. 2. Влияние гормонов на: (а) численность клеток в культурах стационарной фазы роста (КОЕ/мл); (б) долю (%) персистеров в стационарных культурах *E. durans*, при инкубации в пенициллиновых флаконах. * Отличие от контроля больше 30%.

силы вместе с инокулятом. На рис. 3б и в табл. 2 суммированы данные о доле П в опытных и контрольных вариантах, выраженные в процентах от контроля (без гормонов, 100%). Наиболее значимая стимуляция образования П имела место в вариантах с внесением десятикратной дозы гормонов ANP и CNP (в 2 и в 2.5 раза), а также BNP в физиологической концентрации (практически в 2 раза), менее сильный эффект — в вариантах с физиологическими дозами адреналина и ANP и с десятикратной дозой норадреналина (стимуляция на 50%). В вариантах с использованием физиологической концентрации норадреналина и десятикратной концентрации BNP наблюдалось слабое ингибирующее действие на образование П (рис. 3б).

Таким образом, частота образования П (%) самым существенным образом зависит от типа роста бактерий — планктонного или биопленочного, и в разы более выражена при биопленочном росте (табл. 2).

Покоящиеся анабиотические формы *E. durans*

Покоящиеся формы (ПФ) *E. durans* получали при длительной инкубации (3 мес.) бактериальных культур, выросших в полноценной лимитированной по источникам питания среде MRS, что, как было показано ранее, стимулирует образование клеток-персистеров (van der Berg et al., 2017) и созревающих из них ПФ (Мулюкин и соавт., 2009, 2014; Голод и соавт., 2009; Погорелова и соавт., 2009). О наличии ПФ судили по сумме необходимых свойств длительно выживающих клеток (Бухарин и соавт., 2005).

Сохранение жизнеспособности клеток. Титр клеток *E. durans* в планктонных периодических культурах *E. durans* стационарной фазы роста был приблизительно одинаков при развитии бактерий в средах разного состава: (1) MRS; (2) MRS, со в 6 раз меньшей концентрацией фосфора; (3) MRS разбавленной (1 : 6) (табл. 3). Выросшие культуры были оставлены на длительное инкубирование (хранение) (3 мес.) в статическом режиме при комнатной температуре при разных условиях: (1) в колбах, где они выросли, с ватными

Таблица 2. Доля (%) персистеров *E. durans* в планктонных и биопленочных культурах при селекции персистеров ампициллином

Варианты	% персистеров от общего титра клеток	
	планктонная культура	биопленочная культура
Контроль	0.28	0.42
Адреналин ф	0.56	0.57
Адреналин 10ф	0.11	0.46
Норадреналин ф	0.42	0.34
Норадреналин 10ф	0.14	0.58
ANP ф	0.08	0.60
ANP 10ф	0.18	0.93
BNP ф	0.09	0.72
BNP 10ф	0.16	0.32
CNP ф	0.09	0.55
CNP 10ф	0.09	1.12
Эстроген ф	0.11	0.50
Эстроген 10ф	0.17	0.50

пробками, (2) в пробирках Хангейта с ватными пробками, где образовался высокий столб суспензии и обеспечивался доступ кислорода воздуха; (3) в пробирках Хангейта с крышкой и септой, где доступ кислорода воздуха исключался. Через 3 мес. хранения культур энтерококков, хранившихся в разных условиях, численность выживших клеток (КОЕ/мл) в них существенно различалась и снизилась на 3–6 порядков с 10^8 до 10^2 – 10^5 КОЕ/мл (табл. 3). Наибольшая доля ПФ, прорастающих в стандартных условиях, была в варианте роста *E. durans* в среде MRS с лимитом фосфора при хранении в колбе (0.03% от исходного титра, рис. 4), наименьшая доля – в варианте хранения в пробирках Хангейта с крышкой и септой без до-

ступа кислорода при лимите P (0.0003% от исходного титра).

Таким образом, образованию покоящихся форм *E. durans* и сохранению их жизнеспособности при длительном хранении (3 мес.) способствуют лимит фосфора в среде и доступ кислорода воздуха при хранении. Отсутствие кислорода при длительном хранении культур снижает их способность к прорастанию в стандартных условиях без дополнительных процедур.

Следующей характеристикой ПФ является крайне низкая или экспериментально не выявляемая метаболическая активность, что в наших экспериментах определяли по уровню дыхания (выделению CO_2). В суспензиях ПФ возрастом 3 мес., отмытых от среды хранения и ресуспендированных в среде MRS без глюкозы, эндогенное дыхание практически отсутствовало, но при внесении экзогенного источника энергии – глюкозы, сразу восстанавливалось и составило около 0.1% CO_2 через 5 мин. Эта быстрая реверсия дыхания отражает выход ПФ (или части популяции ПФ) из состояния покоя – их ресукциацию. Аналогичный эффект ресукциации был отмечен при реактивации покоящихся некультивируемых клеток *Mycobacterium tuberculosis* при их перенесении в свежую среду (Salina et al., 2019).

Ультраструктурная организация покоящихся форм. При микроскопировании в фазовом контрасте образцов 3 мес. культур *E. durans* во всех вариантах хранения были визуализированы рефрактерные клетки на фоне лизированных клеток, “чехлов” (рис. 5а). Отметим, что рефрактерность, как визуальный признак обезвоженных клеток, характерна для анабиотических ПФ (Эль-Регистан и соавт., 2006).

При сравнении ультраструктурной организации вегетативных клеток стационарной фазы роста (рис. 5б) и интактных 3-месячных клеток (рис. 5в–5д) *E. durans* были выявлены структурные особенности покоящихся форм.

Таблица 3. Численность жизнеспособных ПФ (КОЕ/мл) *E. durans*, выращенных в разных условиях, через 3 мес. инкубации в статическом режиме в сравнении с контролем

Среда роста	Титр жизнеспособных клеток (КОЕ/мл) в вариантах хранения		
	колба с ватной пробкой	Хангейт с ватной пробкой	Хангейт с крышкой и септой
MRS, контроль		9.8×10^8	
MRS, разбавл. в 6 раз, контроль	2.0×10^4	2.0×10^4	2.0×10^4
MRS, в 6 раз меньше P, контроль	1.0×10^4	4.0×10^3	2.0×10^3
	2.0×10^5	8.0×10^8	
		4.6×10^3	4.8×10^2

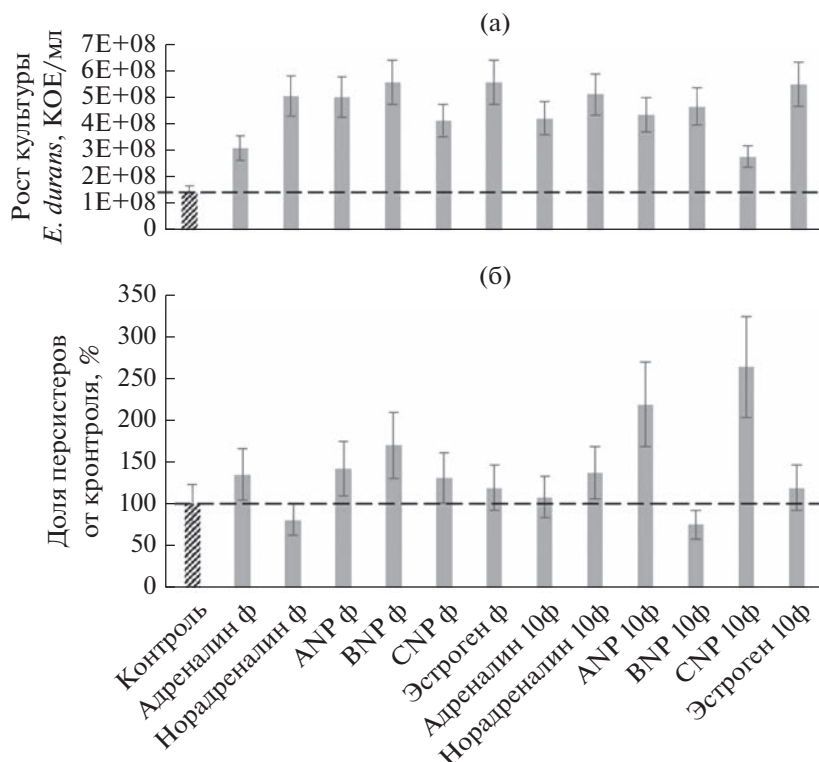


Рис. 3. Влияние гормонов на: (а) общую численность клеток в биопленках (КОЕ/мл); (б) долю (%) персистеров в 24-ч биопленочных культурах.

Популяция выживающих ПФ (3 мес.), полученных в полноценной среде MRS, в варианте хранения в колбе была представлена 2 типами интактных клеток с различной ультраструктурной организацией (рис. 5в–5д), отличающейся от организации стационарных клеток (рис. 5б).

Выживающие клетки первого (I) типа имели ультраструктуру, типичную для цистоподобных покоящихся клеток (ЦКП) неспорообразующих бактерий, многократно описанную нами ранее (Мулюкин и соавт., 2009, 2014). Для них были характерны утолщенная клеточная стенка и биокристаллический нуклеоид, неравномерно компактизованный во всем объеме клетки (рис. 5в, 5г). Выживающие клетки второго типа (II) были представлены L-формами, имеющими такое же тонкое строение, как и ПФ I типа, но лишенные клеточной стенки (рис. 5д). На ультраструктурную организацию выживающих ПФ *E. durans* не влияли условия образования и длительного хранения ПФ. В варианте хранения (3 мес.) культур в пробирках типа Хангейт с крышкой и септой также были обнаружены два типа клеток: толсто-стенные ПФ (рис. 5г) и L-формы, лишенные клеточной стенки (рис. 5д). Отметим, что по сравнению с другими грамположительными бактериями субпопуляции покоящихся МКБ содержали существенно большую долю L-форм.

Терморезистентность покоящихся форм. Еще одним детерминирующим признаком ПФ является их терморезистентность, как принятый в спорологии показатель их стрессоустойчивости, более высокой, чем у вегетативных клеток. При определении терморезистентности клеток энтерококков, выживающих в течение 3 мес. в различных условиях инкубации, были получены парадоксальные результаты (табл. 4).

Термообработке подвергали: (1) клетки культур стационарной фазы роста как вариант сравнения (контроль) и (2) покоящиеся формы, образовавшиеся в культурах, выращенных в модифицированной среде MRS и длительно (3 мес.) хранящиеся в разных условиях (опытные варианты) (табл. 4). До прогревания численность выживших клеток в разных вариантах хранения существенно варьировала от 5.0×10^2 до 2.0×10^5 КОЕ/мл, что было отмечено выше. После термообработки (60°C , 30 мин) численность КОЕ-образующих клеток во всех вариантах хранения резко возросла – на 200–30000% (табл. 4) и стала примерно одинаковой (10^4 – 10^5 КОЕ/мл).

Наиболее выраженное увеличение численности КОЕ после прогрева наблюдали: (1) в вариантах хранения *E. durans* в пробирках типа Хангейт с крышкой и септой; (2) для культур, выращенных в среде MRS, разбавленной 1 : 6 или с лимитом

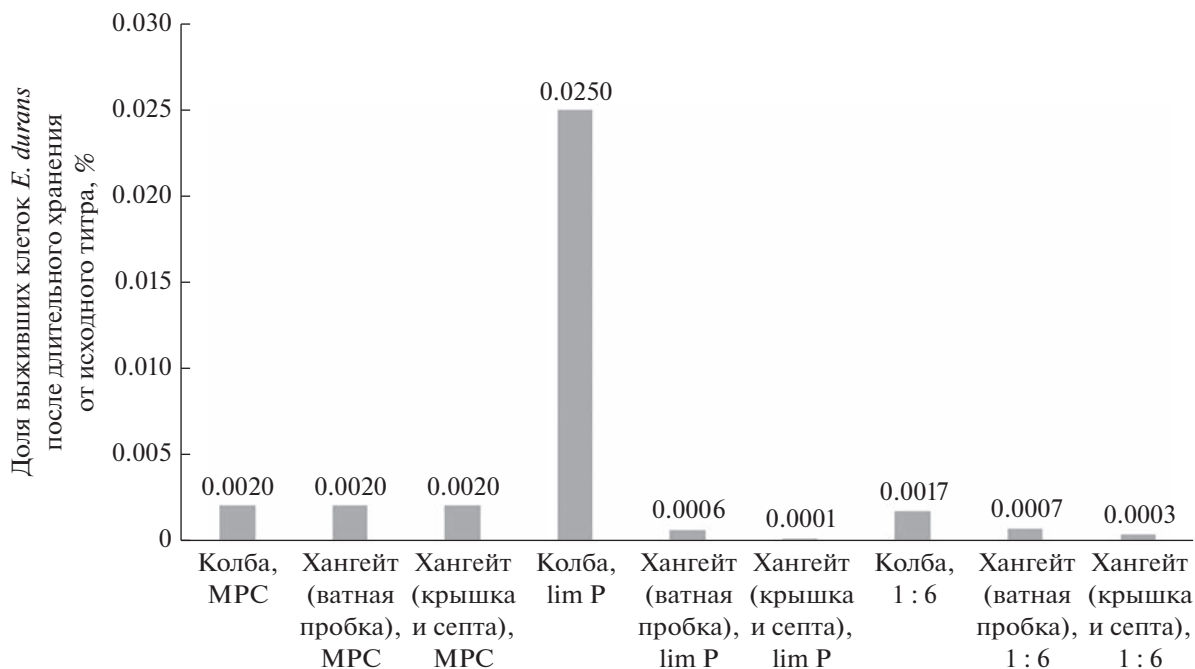


Рис. 4. Доля КОЕ (%) в популяциях ПФ *E. durans*, хранившихся 3 мес. в разных условиях.

фосфора. Обнаруженный эффект был аналогичен известному эффекту активации эндоспор бацилл прогреванием (Krawczyk et al., 2017) и объясняется требованием введения в систему дополнительной свободной энергии для реверсии метаболических процессов у глубоко покоящихся и трудно прорастающих ПФ. Отмеченное увеличение численности прорастающих сохранивших жизнеспособность ПФ энтерококков типа ЦПК можно считать доказательством, во-первых, их глубоко-покоя, во-вторых, – высокой терморезистентности, в-третьих – гетерогенности субпопуляции покоящихся форм по глубине покоя.

Таким образом, по совокупности свойств: (1) образованию в цикле развития бактериальных культур, (2) особенностям ультраструктурной организации, (3) отсутствию метаболической активности, (4) терморезистентности – выживающие клетки I типа в длительно хранящихся культурах *E. durans* можно отнести к анабиотическим ПФ типа ЦПК. Отметим, что терморезистентность L-форм была ранее описана для *E. coli* в работах Markova et al. (2010), ее механизмы требуют специального исследования.

Диссоциативная изменчивость *E. durans*

Ранее было установлено, что при прорастании ПФ бактерий разных таксонов, они вырастали на плотных средах колониями, различающимися морфологическими и физиолого-биохимическими признаками (Мулюкин и соавт., 2014; Лойко и

соавт., 2014). Доминантный колониально-морфологический тип, характерный для клеток планктонных культур *E. durans*, был представлен круглыми колониями S-типа бледно-желтого цвета, маслянистой консистенции, с гладкой, блестящей поверхностью, легко снимающимися с агара (рис. 6а).

Популяция, вырастающая на MRS-агаре при посеве ПФ, хранившихся в течение 3 мес., резко отличалась от колоний доминантного фенотипа. Она была представлена колониями мукоидного типа, прозрачными, слизистой консистенции, сливающимися друг с другом и утопленными в экзоматериале (рис. 6б). Этот фенотип был неустойчив, при последующем пересеве в стандартных условиях он ревертировал к доминантному фенотипу.

Таким образом, *E. durans* реализует свою адаптивную способность развиваться в разных условиях в виде различных колониально-морфологических фенотипов. Доминирующий морфотип преобладал в растущих в стандартных условиях культурах, слизистый морфотип реализовывался после длительного хранения ПФ.

ОБСУЖДЕНИЕ

Основным теоретическим результатом проведенных исследований является доказательство регуляторного влияния гормонов человека (различной химической природы) не только на рост микробных популяций (на модели *E. durans*), но также на их адаптационный потенциал – разви-

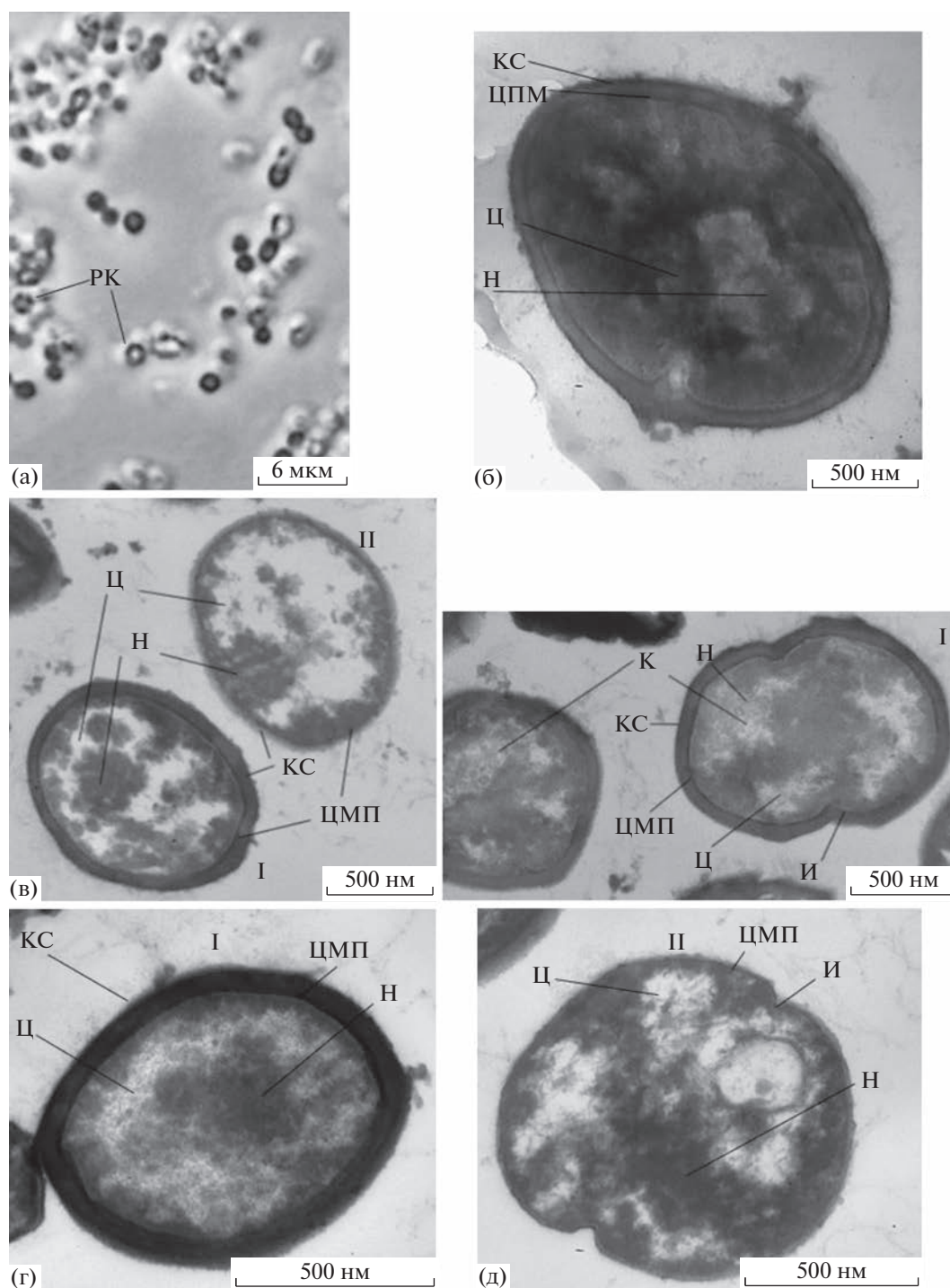


Рис. 5. Фазово-контрастные (а) и электронно-микроскопические (б–д) снимки клеток *E. durans*: (а, б) стационарной фазы роста (среда MRS); (в) хранившихся 3 мес. в колбе (среда MRS); (г, д) хранившихся 3 мес. в пробирках Хангейта (среда MRS). Обозначения: I – ПФ первого типа; II – L-формы; КС – клеточная стенка; ЦПМ – цитоплазматическая мембрана; Н – нуклеоид; Ц – цитоплазма; РК – рефрактерные клетки.

тие форм их выживания в стрессовых и неблагоприятствующих росту условиях.

Наиболее важными и новыми из полученных результатов можно считать следующие. (1) Присутствие гормонов человека различной химиче-

ской природы в среде роста бактерий как единственный переменный фактор при стандартных условиях культивирования (тип роста, состав среды, температура) влияет как на ростовые характеристики развивающихся популяций, так и часто-

Таблица 4. Показатели термоустойчивости ПФ *E. durans*, образовавшихся и хранившихся 3 мес. в разных условиях; прогревание при 60°C в течение 30 мин

Вариант хранения		Титр клеток, КОЕ/мл			Доля (%) терморезистентных клеток		
		№ варианта	до прогрева	после прогрева 60°C 30 мин	от КОЕ до прогрева*	от КОЕ в колбе до прогрева (влияние хранения)**	от КОЕ в колбе после прогрева (влияние процесса)***
1	2	3	4	5	6	7	8
Контроль (стационарная культура)		I	5.1×10^8	1.6×10^5	0.03		
MRS	Колба	II	2.0×10^4	1.0×10^5	500	100	500
	Хангейт с ватной пробкой	III	2.0×10^4	1.0×10^5	500	100	500
	Хангейт с крышечкой и септой	IV	2.0×10^4	1.0×10^5	500	100	500
MRS, в 6 раз меньше фосфора	Колба	V	2.0×10^5	4.0×10^4	20	100	20
	Хангейт с ватной пробкой	VI	4.6×10^3	6.0×10^4	1304	2.3	30
	Хангейт с крышечкой и септой	VII	4.8×10^2	1.2×10^5	25000	0.24	0.6
MRS разбавленная 1 : 6	Колба	VIII	1.0×10^4	2.0×10^4	200	100	200
	Хангейт с ватной пробкой	IX	4.0×10^3	2.0×10^4	500	40	200
	Хангейт с крышечкой и септой	X	2.0×10^3	6.0×10^5	30000	20	6000

* Доля (%) КОЕ-образующих клеток в каждом варианте хранения после прогревания (5) от числа КОЕ в каждом варианте хранения (I–X) до прогревания (4) – 100%.

** Доля (%) КОЕ-образующих клеток в каждом варианте хранения до прогревания (4) от числа в колбе до прогревания (4: II, V, VIII – 100%).

*** Доля (%) КОЕ-образующих клеток в каждом варианте хранения после прогревания (5) от числа КОЕ в колбе до прогревания (4: II, V, VIII) – 100%.

ту образования антибиотикотолерантных клеток-персистеров. При этом вектор и степень влияния гормонов существенно зависят от типа роста бактерий (планктонный или биопленочный) и массообмена (уровня аэрации). (2) При длительной инкубации (3 мес.) популяций *E. durans* в неростовых условиях, в них формируется малочисленная субпопуляция анабиотических клеток, обладающих всеми признаками анабиотических покоящихся форм (ПФ). (3) Численность жизнеспособных ПФ (КОЕ-образующих) зависит от состава среды роста популяций, в которой они образуются, и условий их длительной инкубации (3 мес.). (4) Популяции ПФ гетерогенны по глубине покоя, что отражается на

их способности к образованию колоний на свежей среде. Эта способность может быть (на порядок) повышена путем тепловой активации ПФ, индуцирующей их прорастание. Отклик ПФ на прогревание зависит от исходной среды роста популяции, в которой образуются ПФ и условий длительной инкубации (3 мес.), то есть условий созревания ПФ. (5) Присутствие гормонов (например, ANP) в среде роста бактерий влияет на фенотипические характеристики образующихся персистеров, изменяя в новом цикле их развития на свежей среде диссоциативный фенотипический спектр вырастающей популяции.

Влияние гормонов на рост *E. durans*. В настоящее время широко изучается и доказана регуляторная роль катехоламинов, синтезируемых микроорганизмами и человеком, во взаимодействиях как между ними, так и между микробными клетками, что влияет на поведение микробной популяции (Олескин и соавт., 2020). В настоящей работе были расширены спектр гормонов, действующих на развитие бактериальной популяции, а также условия роста бактерий: планктонный, различающийся массообменом (планшетный или в пенициллиновых флаконах) и биопленочный на стекловолоконных фильтрах.

Оказалось, что влияние гормонов на рост и развитие бактериальных популяций зависит не только от их химической структуры и концентрации, но и от условий роста популяции. Так, при росте бактерий в пенициллиновых флаконах все гормоны ингибировали рост популяции (рис. 2а), тогда как при биопленочном, напротив, стимулировали рост биопленок (рис. 3а). При планшетном росте гормоны существенно (~ в 2 раза) стимулировали развитие придонных биопленок, доля (%) которых доходила до 50–60% от общей массы клеток (рис. 1ж). Регуляторное действие биогенных аминов на биопленкообразование в планктонных культурах бактерий отмечалось ранее (Lute, 2014; Олескин и соавт., 2020), действие эстрогена и натрийуретических пептидов отмечено впервые.

Анализ кривых роста планшетных культур энтерококка выявил различия в регуляторном действии гормонов (табл. 1). Так, стимулирующий эффект адреналина (ф) был обусловлен удлинением фаз экспоненциального и линейного роста при незначительном увеличении удельной скорости роста, тогда как действие ВНФ (10ф), напротив, — увеличением удельной скорости роста при такой же продолжительности фаз роста, как и в контроле. Увеличение ингибирующего эффекта эстрогена (10ф) по сравнению с его действием в более низкой концентрации (ф) коррелировало со снижением удельной скорости роста и увеличением времени генерации. Полученные результаты предполагают перспективность дальнейших исследований в этом направлении и, прежде всего, изучение механизмов действия гормонов на бактериальные клетки и межклеточные взаимодействия.

Влияние гормонов на образование клеток-персистеров. Сопряженно с влиянием на рост бактериальных популяций, применяемые гормоны влияли на такую их адаптивную характеристику, как частота образования персистеров. Отметим, что сохранение популяции как представителя вида и компоненты микробного сообщества (в том числе микробиома человека) зависит не столько от успешности ее развития и экспансии простран-

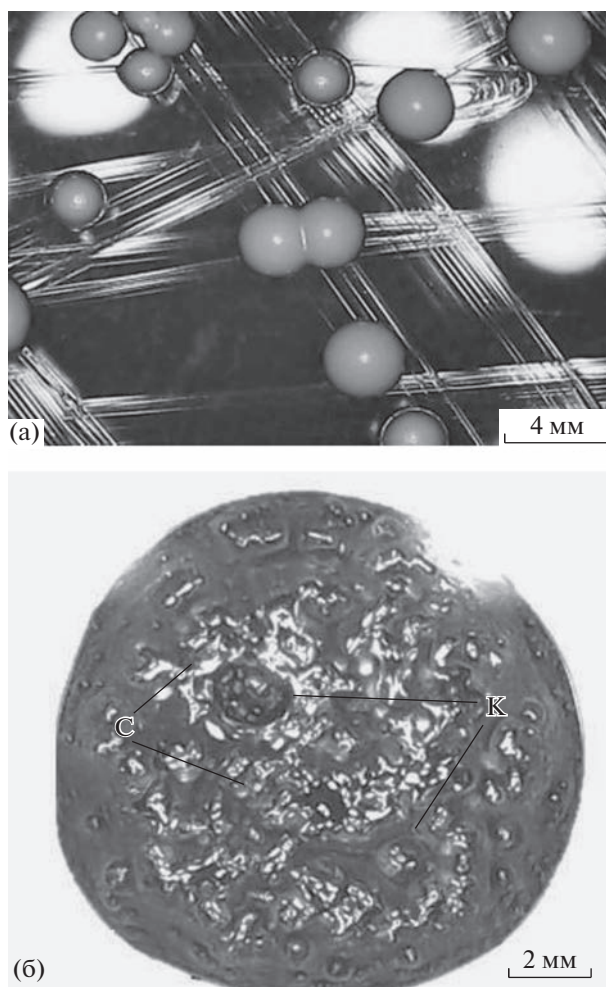


Рис. 6. Морфология колоний *E. durans*, развивающихся на МРС-агаре при посеве: (а) клетками планктонной культуры экспоненциальной или стационарной фаз развития; (б) покоящимися формами 3 мес. хранения в среде МРС в колбе. Обозначения: К — колонии, С — слизь.

ства, сколько от выживания в периодически наступающих неблагоприятных для роста условиях. На первом этапе эту функцию выполняет малочисленная субпопуляция П, преимущественно I типа, образующихся в стационарной фазе в результате цитодифференцировки и фенотипического перехода ординарных клеток в фенотип толерантности к летальным дозам повреждающих воздействий — антибиотиков, ионов тяжелых металлов и др. (Balaban et al., 2004). Численность выживающих П патогенных бактерий определяет уровень бактерионосительства и риски рецидивов хронических заболеваний. Для молочнокислых бактерий — симбионтов человека, образование П является способом их выживания при антибиотикотерапии и сохранения таксономического состава микробиома. О влиянии гормонов на этот тип выживающих клеток информации нет. К механизмам образования П

относят: развитие строгого ответа на наступившее голодание (старвацию) вследствие истощения источников питания (энергии); индукцию SOS-ответа, активацию RecA, вследствие повреждения ДНК; развитие стресса и активацию RelA и SpoT, что приводит к синтезу алармона (p)ppGpp и нарушению баланса токсин–анти-токсин в TA модулях с преобладанием токсина (van der Bergh et al., 2017; Svenningsen et al., 2019; Kaldalu et al., 2020; Wainwright et al., 2021; Wiradiputra et al., 2022; Kaushik et al., 2022).

Сам факт преимущественного образования П в стационарной фазе роста культур сопряжен не только с истощением источников питания, но также с повышением концентрации в среде внеклеточных алармонов, таких как факторы межклеточной коммуникации системы кворум-сенсинг QS (Maisonneuve, Gerdes, 2014) или плотностные регуляторы типа алкилрезорцинов (Эль-Регистан и соавт., 2006; Лойко и соавт., 2015, 2017). Полученные нами результаты позволяют отнести к регуляторам образования П также гормональные соединения различной химической природы, действие которых, возможно, опосредовано их влиянием на рост популяции. Так, при планктонном росте в пенициллиновых флаконах в присутствии гормонов, все они минимизировали в разной степени и рост культур (рис. 2а), и образование П (рис. 2б) (кроме адреналина – ф, нор-адреналина – ф). При развитии популяции на стекловолоконных фильтрах в виде биопленок все гормоны, напротив, стимулировали как рост энтерококков (рис. 3а), так и образование П (рис. 3б).

Таким образом, обнаружена корреляция между стимулирующим/ингибирующим действием гормонов на рост бактериальных популяций и образованием в них персистеров (табл. 2). При этом количественной корреляции между стимулирующим/ингибирующим действием определенного гормона на рост образованием П не обнаружено (рис. 2а, 2б; рис. 3а, 3б).

Отметим, что гормоны применялись нами в крайне низких физиологических концентрациях и, следовательно, могли функционировать только как регуляторные соединения. Проведенный анализ результатов позволяет сделать следующие выводы. Отсутствие прямой корреляции между действием гормонов на рост как умножение численности клеток популяций и частоту образования в них П позволяет говорить о разных механизмах действия гормонов на эти процессы и необходимости исследования этих механизмов, а также обосновывает постановку задачи изучения (и возможной коррекции) гормонального статуса человека как фактора его влияния на персистенцию в организме хозяина симбионтных и патогенных бактерий. Так как, согласно литературным данным, биогенные амины (нейромедиато-

ры) по-разному влияют на рост бактерий разного таксономического статуса, необходимо расширение исследований действия гормонов человека различной химической природы на персистерообразование симбиотических и патогенных бактерий. Достоверно показаны различия между действием гормонов на образование П в планктонных и биопленочных культурах бактерий. Так как в организме человека (равно как и в природных экотопах) преобладает биопленочный фенотип роста симбионтных бактерий, как консументов, так и патогенов, представляется целесообразным (необходимым) расширить изучение условий образования П, включив модели биопленочного роста бактерий.

Формы длительного выживания *E. durans*. Какова дальнейшая судьба П в неблагоприятствующих условиях при пролонгированной инкубации периодических культур бактерий? По этому вопросу не существует единого мнения. Одни исследователи предлагают модель “континуума покоя”, в которой П преобразуются в “более крепко спящие” жизнеспособные некультивируемые клетки (ЖНК) (Augarsetyan et al., 2015). Другие полагают, что персистеры и ЖНК представляют две фазы покоя, имеющие много общих черт (Kim et al., 2018), при этом механизм образования ЖНК, в отличие от персистеров, неясен. Авторы настоящей статьи на основании многолетнего изучения анабиотических покоящихся форм (цистоподобных покоящихся клеток, ЦПК), как форм выживания (месяцы–годы–миллионы лет) неспорообразующих бактерий, выдвинули гипотезу о персистерях как предшественниках анабиотических ПФ, в которых прошла стадия цитодифференцировки, но не завершены процессы созревания и развития анабиотического состояния. Рассмотрим с этих позиций полученные результаты.

В культурах *E. durans*, развивавшихся как в полноценной, так и дефицитных средах, и затем инкубируемых в течение 3 мес., были обнаружены покоящиеся формы типа ЦПК, которые обладали всеми необходимыми характеристиками покоящихся форм: жизнеспособностью (КОЕ-способностью) (табл. 3); отсутствием дыхания с возможностью его реверсии; особенностями структурной организации (рис. 5) и, наконец, терморезистентностью (табл. 4) как показателем их высокой стрессоустойчивости. Численность жизнеспособных ПФ варьировала от 4.8×10^2 до 2.0×10^5 КОЕ/мл в зависимости от условий хранения образцов и на этом этапе определения числа КОЕ была наименьшей в пробах, хранившихся в отсутствие кислорода воздуха (пробирки Хангейта с крышкой и септой) (табл. 4). Однако, при определении терморезистентности длительно выживающих клеток по численности КОЕ после прогревания образцов (60°C, 30 мин), в этих вариантах обнаружилось наибольшее число выживших КОЕ-образующих клеток – до

10^5 кл./мл, то есть их численность возросла на 25000–30000% от численности до прогревания (табл. 4). Отметим, что численность колониеобразующих клеток после прогрева во всех вариантах соответствует численности термоустойчивых клеток в стационарной культуре, то есть численности персистеров, обладающих этим свойством. По формальным признакам эти восстановившиеся способности образовывать колонии после хранения клетки могли быть отнесены к ЖНК, то есть они были некультивируемы до нагревания. Однако мы считаем, что описанный эффект температурной активации длительно выживающих форм можно объяснить явлением гетерогенности популяции анабиотических ПФ по показателю терморезистентности. Гетерогенность покоящихся форм этого типа хорошо известна для эндоспор бацилл и кластридий как показатель глубины покоя, то есть способности к прорастанию без или с применением процедур активации. В наших предыдущих исследованиях цистоподобных ПФ бактерий разных таксонов такая гетерогенность ПФ по степени их терморезистентности была многократно описана как конститутивное свойство покоящихся популяций (Мулюкин и соавт., 2009; Погорелова и соавт., 2009; Голод и соавт., 2009).

Отсюда возникает следующий вопрос: можно ли и следует ли длительно выживающие клетки, не способные образовывать колонии без предварительной активации, например, прогревания (то есть нарушения структурной организации цитоплазматической мембраны ПФ), относить к категории ЖНК? ЖНК – это тема для отдельного теоретического анализа, где прежде всего “необходимо договориться” о четком определении ЖНК как клеток с временным отсутствием способности образовывать колонии в стандартных условиях на плотных средах, отличающихся от покоящихся форм бактерий. В этой статье отметим следующее.

(1) ЖНК, (а) обнаруженные в эстуарных водах и описанные Colwell (1985); (б) ЖНК, обнаруженные и описанные в длительно инкубируемых проточных культурах *Micrococcus luteus* с крайне низкой скоростью протока (Mukamolova et al., 1995); и (в) ЖНК, описанные в этой статье – это три совершенно различных фенотипа. Их объединяет только признак необходимости специальных процедур для восстановления способности образовывать колонии. И только по этому одному признаку они попадают в одну категорию выживающих клеток – жизнеспособных, но не культивируемых.

(2) Почему способность образовывать колонии является определяющим признаком ЖНК? А если длительно выживающие клетки ревертируют к делению в глубинной культуре (метод НВЧК – наиболее вероятного числа клеток) – к чему их

отнести? Можно согласиться с мнением, что длительно выживающие клетки, ревертирующие к делению только в глубинной культуре, – это ЖНК, а дающие колонии на плотной среде – это покоящиеся формы (Шлеева и соавт., 2010), хотя эта точка зрения противоречит постулату, согласно которому неспособность бактерий образовывать колонии – это признак мертвых клеток (Song, Wood, 2021; Vaquero, Levin, 2021). Последнее определение кажется нам неверным.

(3) Разделяя концепцию “континуума покоя” (Ayrapetyan et al., 2015) мы полагаем, что образовавшиеся в стационарной культуре бактерий (*E. durans*) персистеры I типа (а также II типа) в процессе дальнейшей длительной инкубации (хранения) (1 мес. и более) претерпевают изменения, у разных клеток в разной степени, направленные на углубление покоя, что обуславливает гетерогенность субпопуляции П, в том числе по способности прорасти на плотных средах. Это состояние некультивируемости может быть промежуточным. Оно завершается после витрификации цитоплазмы персистеров и их перехода в состояние анабиоза, то есть образованием ПФ. При этом гетерогенность (суб)популяции персистеров, включая приобретение части из них (всеми) состояния некультивируемости, сохраняется в популяции образовавшихся ПФ. Она выражается в различном уровне терморезистентности ПФ и гетерогенности (суб)популяции ПФ по чувствительности к индукции прорастания, то есть по признаку скорости их реверсии к метаболической активности, что неоднократно отмечалось для всех типов покоящихся форм микроорганизмов и является одним из важных признаков адаптивного потенциала микробных популяций.

БЛАГОДАРНОСТИ

Электронно-микроскопические исследования выполнены на оборудовании Центра коллективного пользования ФИЦ Биотехнологии РАН “Коллекция микроорганизмов UNIQEM”.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бухарин О.В., Гинцбург А.Л., Романова Ю.М., Эль-Регистан Г.И. Механизмы выживания бактерий. М.: Медицина, 2005. 367 с.
- Голод Н.А., Лойко Н.Г., Мулюкин А.Л., Нейматов А.Л., Воробьева Л.И., Сузина Н.Е., Шаненко Е.Ф., Гальченко В.Ф., Эль-Регистан Г.И. Адаптация молочнокислых бактерий к неблагоприятным для роста условиям // Микробиология. 2009. Т. 78. С. 317–327.
- Golod N.A., Loiko N.G., Mulyukin A.L., Neimatov A.L., Vorobjeva L.I., Suzina N.E., Shanenko E.F., Gal'chenko V.F., El-Registan G.I. Adaptation of lactic acid bacteria to unfavorable growth conditions // Microbiology (Moscow). 2009. V. 78. P. 280–289.
- Лойко Н.Г., Козлова А.Н., Николаев Ю.А., Гапонов А.М., Тутельян А.В., Эль-Регистан Г.И. Влияние стресса на образование антибиотикотолерантных клеток *Escherichia coli* // Микробиология. 2015. Т. 84. С. 512–528.
- Loiko N.G., Kozlova A.N., Nikolaev Y.A., Gaponov A.M., Tutel'yan A.V., El'-Registan G.I. Effect of stress on emergence of antibiotic-tolerant *Escherichia coli* cells // Microbiology (Moscow). 2015. V. 84. P. 595–609.
- Лойко Н.Г., Краснова М.А., Пичугина Т.В., Гриневиц А.И., Ганина В.И., Козлова А.Н., Николаев Ю.А., Гальченко В.Ф., Эль-Регистан Г.И. Изменение диссоциативного спектра популяций молочнокислых бактерий при воздействии антибиотиков // Микробиология. 2014. Т. 83. № 3. С. 284–294.
- Loiko N.G., Krasnova M.A., Pichugina T.V., Grinevich A.I., Ganina V.I., Kozlova A.N., Nikolaev Yu.A., Gal'chenko V.F., El'-Registan G.I. Changes in the phase variant spectra in the populations of lactic acid bacteria under antibiotic treatment // Microbiology (Moscow). 2014. V. 83. P. 195–204.
- Мулюкин А.Л., Сузина Н.Е., Мельников В.Г., Гальченко В.Ф., Эль-Регистан Г.И. Состояние покоя и фенотипическая вариабельность у *Staphylococcus aureus* и *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* // Микробиология. 2014. Т. 83. № 1. С. 15–27.
- Mulyukin A.L., Suzina N.E., Mel'nikov V.G., Gal'chenko V.F., El'-Registan G.I. Dormant state and phenotypic variability of *Staphylococcus aureus* and *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* // Microbiology (Moscow). 2014. V. 83. P. 149–159.
- Мулюкин А.Л., Сузина Н.Е., Погорелова А.Ю., Антоноук Л.П., Дуда В.И., Эль-Регистан Г.И. Разнообразие морфотипов покоящихся клеток и условия их образования у *Azospirillum brasilense* // Микробиология. 2009. Т. 78. № 1. С. 42–52.
- Mulyukin A.L., Pogorelova A.Yu., El-Registan G.I., Suzina N.E., Duda V.I., Antonyuk L.P. Diverse morphological types of dormant cells and conditions for their formation in *Azospirillum brasilense* // Microbiology (Moscow). 2009. V. 78. P. 33–41.
- Олескин А.В., Кировская Т.А., Ботвинко И.В., Лысак Л.В. Действие серотонина (5-окситриптамина) на рост и дифференциацию микроорганизмов // Микробиология. 1998. Т. 67. С. 306–311.
- Oleskin A.V., Kirovskaya T.A., Botvinko I.V., Lysak L.V. Effects of serotonin (5-hydroxytryptamine) on the growth and differentiation of microorganisms // Microbiology (Moscow). 1998. V. 67. P. 251–257.
- Олескин А.В., Шендеров Б.А., Роговский В.С. Социальность микроорганизмов и взаимоотношения в системе микробиота–хозяин: роль нейромедиаторов. М.: Изд-во МГУ, 2020. 286 с.
- Oleskin A.V., El'-Registan G.I., Shenderov B.A. Межмикробные химические взаимодействия и диалог микробиота–хозяин: роль нейромедиаторов // Микробиология. 2016. Т. 85. С. 3–25.
- Oleskin A.V., El'-Registan G.I., Shenderov B.A. Role of neuromediators in the functioning of the human microbiota: “business talks” among microorganisms and the microbiota-host dialogue // Microbiology (Moscow). 2016. V. 85. P. 1–22.
- Погорелова А.Ю., Мулюкин А.Л., Антоноук Л.П., Гальченко В.Ф., Эль-Регистан Г.И. Фенотипическая вариабельность у *Azospirillum brasilense* штаммов Sp7 и Sp245: сопряженность с состоянием покоя и свойства диссоциантов // Микробиология. 2009. Т. 78. С. 618–628.
- Pogorelova A.Y., Mulyukin A.L., Galchenko V.F., El'-Registan G.I., Antonyuk L.P. Phenotypic variability in *Azospirillum brasilense* strains Sp7 and Sp245: association with dormancy and characteristics of the variants // Microbiology (Moscow). 2009. V. 78. P. 559–568.
- Шлеева М.О., Салина Е.Г., Капрельянтс А.С. Покоящиеся формы микобактерий // Микробиология. 2010. Т. 79. С. 3–15.
- Shleeva M.O., Salina E.G., Kaprelyants A.S. Dormant forms of mycobacteria // Microbiology (Moscow). 2010. V. 79. P. 1–12.
- Эль-Регистан Г.И., Мулюкин А.Л., Николаев Ю.А., Сузина Н.Е., Гальченко В.Ф., Дуда В.И. Адаптогенные функции внеклеточных ауторегуляторов микроорганизмов // Микробиология. 2006. Т. 75. С. 446–456.
- El-Registan G.I., Mulyukin A.L., Nikolaev Yu.A., Gal'chenko V.F., Suzina N.E., Duda V.I. Adaptogenic functions of extracellular autoregulators of microorganisms // Microbiology (Moscow). 2006. V. 75. P. 380–389.
- Ayrapetyan M., Williams T., Oliver J.D. Relationship between the viable but nonculturable state and antibiotic persister cells // J. Bacteriol. 2018. V. 200. Art. e00249-18. <https://doi.org/10.1128/JB.00249-18>
- Ayrapetyan M., Williams T.C., Oliver J.D. Bridging the gap between viable but non-culturable and antibiotic persistent bacteria // Trends Microbiol. 2015. V. 23. P. 7–13. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.09.004>
- Bacteria as Multicellular Organisms // Eds. Shapiro J.A., Dworkin M. Oxford University Press, 1997. 480 p.
- Balaban N., Merrin I., Chait R., Kowalik L., Leibler S. Bacterial persistence as a phenotypic switch // Science. 2004. V. 305. P. 1622–1625.
- Balaban N.Q., Helaine S., Lewis K., Ackermann M., Aldridge B., Andersson D.I., Brynildsen M.P., Bumann D., Camilli A., Collins J.J. et al. Definitions and guidelines for research on antibiotic persistence // Nat. Rev. Microbiol. 2019. V. 17. P. 441–448. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0196-3>

- Baquero F., Levin B.R.* Proximate and ultimate causes of the bactericidal action of antibiotics // *Nat. Rev. Microbiol.* 2021. V. 19. P. 123–132.
<https://doi.org/10.1038/s41579-020-00443-1>
- Bigger J.W.* Treatment of staphylococcal infections with penicillin by intermittent sterilisation // *Lancet.* 1944. V. 244. P. 497–500.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)74210-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)74210-3)
- Canas-Duarte S.J., Restrepo S., Pedraza J.M.* Novel protocol for persister cells isolation // *PLoS One.* 2014. V. 9. Art. e88660.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088660>
- Chebotar I.V., Emelyanova M.A., Bocharova J.A., Mayansky N.A., Kopantseva E.E., Mikhailovich V.M.* The classification of bacterial survival strategies in the presence of antimicrobials // *Microb. Pathog.* 2021. V. 155. Art. 104901.
<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.104901>
- Colwell R.R., Brayton P.R., Grimes D.J., Roszak D.B., Huq S.A., Palmer L.M.* Viable but non-culturable *Vibrio cholerae* and related pathogens in the environment: implications for release of genetically engineered microorganisms // *Nat. Biotechnol.* 1985. V. 3. P. 817–820.
<https://doi.org/10.1038/nbt0985-817>
- Dadinova L.A., Chesnokov Y.M., Kamyshinsky R.A., Orlov I.A., Petoukhov M.V., Mozhaev A.A., Soshinskaya E. Yu., Lazarev V.N., Manuvera V.A., Orekhov A.S., Vasiliev A.L., Shlykova E.V.* Protective Dps-DNA co-crystallization in stressed cells: an *in vitro* structural study by small-angle X-ray scattering and cryo-electron tomography // *FEBS Lett.* 2019. V. 593. P. 1360–1371.
<https://doi.org/10.1002/1873-3468.13439>
- Fuqua W.C., Winans S.C., Greenberg E.P.* Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators // *J. Bacteriol.* 1994. V. 176. P. 269–275.
- Kaldalu N., Hauryliuk V., Turnbull K.J., La Mensa A., Putrinš M., Tenson T.* *In vitro* studies of persister cells // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2020. V. 84. Art. e00070-20.
<https://doi.org/10.1128/MMBR.00070-20>
- Kaldalu N., Joers A., Ingelman H., Tenson T.* A general method for measuring persister levels in *Escherichia coli* cultures // *Methods Mol. Biol.* 2016. V. 1333. P. 29–42.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2854-5_3
- Kaprelyants A.S., Mukamolova G.V., Kell D.B.* Estimation of dormant *Micrococcus luteus* cells by penicillin lysis and by resuscitation in cellfree spent medium at high dilution // *FEMS Microbiol. Lett.* 1994. V. 115. P. 347–352.
- Kaushik V., Sharma S., Tiwari M., Tiwari V.* Antipersister strategies against stress induced bacterial persistence // *Microb. Pathog.* 2022. V. 164. Art. 105423.
<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105423>
- Kell D.B., Kaprelyants A.S., Weichart D.H., Harwood C.R., Barer M.R.* Viability and activity in readily culturable bacteria: a review and discussion of the practical issues // *Antonie van Leeuwenhoek.* 1998. V. 73. P. 169–187.
<https://doi.org/10.1023/A:1000664013047>
- Kim J.S., Chowdhury N., Yamasaki R., Wood T.K.* Viable but non-culturable and persistence describe the same bacterial stress state // *Environ. Microbiol.* 2018. V. 20. P. 2038–2048.
<https://doi.org/10.1111/1462-2920.14075>
- Krawczyk A.O., de Jong A., Omony J., Holsappel S., Wells-Bennik M.H.J., Kuipers O.P., Eijlander R.T.* Spore heat activation requirements and germination responses correlate with sequences of germinant receptors and with the presence of a specific *spoVA2mob* operon in foodborne strains of *Bacillus subtilis* // *Appl. Environ. Microbiol.* 2017. V. 83.
<https://doi.org/10.1128/AEM.03122-16>
- Lewis K.* Persister cells // *Annu. Rev. Microbiol.* 2010. V. 64. P. 357–372.
- Lyte M.* Microbial endocrinology and nutrition: A perspective on new mechanisms by which diet can influence gut-to brain-communication // *PharmaNutrition.* 2013. V. 1. P. 35–39.
- Lyte M.* The effect of stress on microbial growth // *Anim. Health Res. Rev.* 2014. V. 15. P. 172–174.
<https://doi.org/10.1017/S146625231400019X>
- Lyte M.* The microbial organ in the gut as a driver of homeostasis and disease // *Med. Hypotheses.* 2010. V. 74. P. 634–638.
- Maisonneuve E., Gerdes K.* Molecular mechanisms underlying bacterial persisters // *Cell.* 2014. V. 157. P. 539–548.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.050>
- Markova N., Slavchev G., Michailova L., Jourdanova M.* Survival of *Escherichia coli* under lethal heat stress by L-form conversion // *Int. J. Biol. Sci.* 2010. V. 6. P. 303–315.
<https://doi.org/10.7150/ijbs.6.303>
- Mukamolova G.V., Kaprelyants A.S., Kell D.B.* Secretion of an antibacterial factor during resuscitation of dormant cells in *Micrococcus luteus* cultures held in an extended stationary phase // *Antonie Van Leeuwenhoek.* 1995. V. 67. P. 289–295.
- O'Toole G.A.* Microtiter dish biofilm formation assay // *J. Visual. Exper.* 2011. V. 47. P. 2437.
- Salina E.G., Grigorov A.S., Bychenko O.S., Skvortsova Y.V., Mamedov I.Z., Azhikina T.L., Kaprelyants A.S.* Resuscitation of dormant “non-culturable” *Mycobacterium tuberculosis* is characterized by immediate transcriptional burst // *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2019. V. 9. P. 272.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00272>
- Song S., Wood T.K.* “Viable but non-culturable cells” are dead // *Environ. Microbiol.* 2021. V. 23. P. 2335–2338.
<https://doi.org/10.1111/1462-2920.15463>
- Strahl H., Errington J.* Bacterial membranes: structure, domains, and function // *Annu. Rev. Microbiol.* 2017. V. 71. P. 519–538.
- Svenningsen M.S., Veress A., Harms A., Mitarai N., Semsey S.* Birth and resuscitation of (p)ppGpp induced antibiotic tolerant persister cells // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. Art. 6056.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-42403-7>
- Van den Bergh B., Fauvart M., Michiels J.* Formation, physiology, ecology, evolution and clinical importance of bacterial persisters // *FEMS Microbiol. Rev.* 2017. V. 41. P. 219–251.
<https://doi.org/10.1093/femsre/fux001>
- Wainwright J., Hobbs G., Nakouti I.* Persister cells: formation, resuscitation and combative therapies // *Arch. Microbiol.* 2021. V. 203. P. 5899–5906.
<https://doi.org/10.1007/s00203-021-02585-z>
- Wiradiputra M.R.D., Khuntayaporn P., Thirapanmethee K., Chomnawang M.T.* Toxin-antitoxin systems: a key role on persister formation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium // *Infect. Drug Resist.* 2022. V. 15. P. 5813–5829.
<https://doi.org/10.2147/IDR.S378157>

Effect of Hormones and Biogenic Amines on Growth and Survival of *Enterococcus durans*

G. I. El'-Registan¹, O. V. Zemskova¹, O. A. Galuza¹, R. V. Ulanova¹, E. A. Il'icheva¹,
A. V. Gannesen¹, and Yu. A. Nikolaev¹, *

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

*e-mail: nikolaevya@mail.ru

Received March 23, 2023; revised March 25, 2023; accepted March 26, 2023

Abstract—Lactic acid bacteria (LAB) are important components of the human microbiome. While they are capable both of synthesis and response to the signals of the human humoral regulatory system (hormones and neuromediators), the phenomenology and mechanisms of the LAB response to these mediators are insufficiently studied. This work showed estrogen to hinder the growth and development of *E. durans*, while norepinephrine, estrogen, and the brain natriuretic peptide caused dose-dependent extension of the stationary growth phase. This is the first report on stimulation of *E. durans* biofilm formation by the atrial natriuretic peptide and estrogen. The frequency of persister formation depended on the type of bacterial growth (planktonic or biofilm one) and was higher in the case of biofilm growth. Epinephrine and norepinephrine exhibited dose-dependent stimulation of persister formation in planktonic LAB cultures, while other tested hormones inhibited it. The effect on persister formation in biofilms was different: natriuretic peptides exhibited dose-dependent stimulation of persister formation, and none of the hormones inhibited it significantly. After several months of incubation, *E. durans* persister cells matured to anaaaaaaaabiotic dormant forms with the typical ultrastructural features. The population of *E. durans* dormant forms was first shown to contain the form with different dormancy depth, including the viable uncultured ones.

Keywords: lactic acid bacteria, *Enterococcus durans*, biogenic amines, natriuretic peptides, estrogen, growth, survival forms

ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* ПРИ СВЕРХЭКСПРЕССИИ ПОЛИФОСФАТАЗЫ Ppx1

© 2023 г. Л. В. Трилисенко^а, А. Я. Валиахметов^а, Т. В. Кулаковская^а, *

^аФИЦ “Пушинский научный центр биологических исследований Российской академии наук”,
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Пушкино, 142290 Россия

*e-mail: alla@ibpm.ru

Поступила в редакцию 16.02.2023 г.

После доработки 25.03.2023 г.

Принята к публикации 25.03.2023 г.

Экзополифосфатаза Ppx1 дрожжей — конститутивный белок, локализованный преимущественно в цитоплазме. Очищенный фермент гидролизует неорганические полифосфаты с высокой активностью, но у нокаут-мутанта $\Delta ppx1$ *Saccharomyces cerevisiae* не выявлено изменений в физиологических свойствах. С целью выяснения функций этого фермента мы изучили физиологические особенности штамма *Saccharomyces cerevisiae*, сверхэкспрессирующего полифосфатазу Ppx1. При культивировании на среде YPD штамм не проявил особенностей роста по сравнению с родительским штаммом. В клетках *S. cerevisiae*, сверхэкспрессирующих полифосфатазу Ppx1, в стационарной фазе роста в 9 раз увеличился уровень АТФ, значительно снизилась активность вакуолярной АТФазы, увеличилась чувствительность к перекиси по сравнению с родительским штаммом. Уровень АФК при этом был почти вдвое выше, чем у родительского штамма, по степени окисленности липидов различий не наблюдали. Сверхэкспрессия Ppx1 в использованных условиях культивирования не повлияла на уровень полифосфатов, поэтому эти полимеры не являются регуляторами вышеописанных изменений. Известно, что реакции на окислительный стресс и активность вакуолярной АТФазы у дрожжей регулируются цАМФ, а Ppx1 способна к гидролизу этого сигнального соединения. Мы предполагаем, что одной из функций Ppx1 в клетках дрожжей является участие в регуляции уровня цАМФ. В связи с тем, что сверхэкспрессирующий Ppx1 штамм не отличался от родительского по содержанию неорганических полифосфатов, предположено, что наблюдаемые изменения обусловлены влиянием этого фермента на уровень цАМФ, который является его субстратом.

Ключевые слова: полифосфатаза, Ppx1, сверхэкспрессирующий штамм, АТФаза, окислительный стресс, АФК, *Saccharomyces cerevisiae*

DOI: 10.31857/S0026365623600062, EDN: RJGLEN

Неорганические полифосфаты (полиР), линейные полимеры ортофосфорной кислоты, в большом количестве накапливаются в клетках дрожжей (Kulaev, Vagabov, 1983). ПолиР у дрожжей выполняют не только очевидную роль фосфорного и энергетического резерва (Kulaev, Vagabov, 1983), но и участвуют в регуляции клеточного цикла (Gerasimaitė et al., 2014), биогенезе и функционировании клеточной стенки (Калелина и соавт., 2008), а также в преодолении стрессов, в том числе вызванных токсическими концентрациями тяжелых металлов (Kulakovskaya, 2018). В связи с этим изучение роли ферментов метаболизма полиР у дрожжей представляет особый интерес для понимания механизмов приспособления этих эукариотических микроорганизмов к неблагоприятным условиям среды. Среди четырех известных к настоящему времени ферментов, обладающих полифосфатазной активностью, экзопо-

лифосфатаза Ppx1 имеет наиболее давнюю историю изучения. Впервые этот фермент был очищен еще в 1990 г. (Андреева, Окорочков, 1990), а вскоре был идентифицирован кодирующий его ген (Wurst et al., 1995). Близкими ортологами Ppx1 являются гены белки насекомых и млекопитающих, которые проявляют экзополифосфатазную активность и участвуют в процессах образования метастазов у млекопитающих (Tammenkoski et al., 2008). Физико-химические свойства (Андреева, Окорочков 1990; Wurst et al., 1995) и механизм действия на полиР (Tammenkoski et al., 2007; Ugochukwu et al., 2007) для Ppx1 детально изучены. Фермент является экзополифосфатазой, т.е. отщепляет фосфат с конца цепи полиР по процессивному механизму (Wurst et al., 1995); он не гидролизует пиррофосфат, нуждается в ионах магния или кобальта для проявления активности (Андре-

ева, Окорочков, 1990) и локализован в основном в цитоплазме (Lichko et al., 2006).

Сведения о функции Ppx1 у дрожжей ограничены несколькими работами. У нокаут-мутантов *Δppx1 Candida albicans* наблюдали отсутствие инвазивного роста и снижение поверхностного filamentного роста (Jin et al., 2008). Клетки *C. albicans*, имеющие двойную нокаут-мутацию в генах *PPX1* и *PPN1*, кодирующих две различные полифосфатазы, проявляли нарушение устойчивости к ряду стрессов, в том числе к стрессу, вызывающему нарушение репликации ДНК, имели морфологические дефекты и сниженную вирулентность (Ahmed et al., 2022). Эти данные, вместе с указаниями на участие h-prune в метастазировании (Tammenkoski et al., 2008), свидетельствуют в пользу участия Ppx1 в процессах, связанных с цитоскелетом и системами клеточного движения.

Вопрос о функциях этого фермента у *S. cerevisiae* остается недостаточно ясным. Ppx1 является конститутивным белком (Wurst et al., 1995), однако в литературе нет сообщений о каких-либо дефектах роста нокаут-мутантов *Δppx1 S. cerevisiae*. В обычных условиях культивирования вклад этого фермента в метаболизм полиР сложно оценить: у нокаут-мутанта *Δppx1 S. cerevisiae* наблюдали только лишь небольшое увеличение содержания наиболее короткоцепочечной фракции полиР1, а содержание других фракций полиР не изменялось (Кулаковская и соавт., 2006). При культивировании в условиях лимитирования по фосфату рост и динамика потребления клеточных полиР у мутанта, лишённого Ppx1, не отличались от таковых у родительского штамма (Личко и соавт., 2008). В попытках понять функциональное значение Ppx1 у *S. cerevisiae* используют штаммы с более сложными генетическими конструкциями. Так, при изучении штамма дрожжей, у которого уровень и длина цепи вневакуолярных полиР были увеличены за счет экспрессии бактериальной полифосфаткиназы, наблюдали увеличение экспрессии ряда белков, вовлеченных в стрессовые ответы, в том числе Hog1 и Yak1 киназ и факторов транскрипции Msn2/Msn4. Этот эффект усиливался при внесении дополнительной нокаут-мутации в ген *PPX1*, что указывает на важную роль Ppx1 в регуляции уровня вневакуолярных полиР (McCarthy et al., 2022).

Еще одним экспериментальным подходом для выяснения функций полифосфатаз является изучение штаммов дрожжей, сверхпродуцирующих эти ферменты. Так, был получен штамм *S. cerevisiae*, содержащий полноразмерный ген *PPX1* в составе экспрессионного вектора rMB1 с “каскадной экспрессией”, состоявшей из сильного конститутивного промотора глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы (*PKG1*) и терминатора фосфоглицерат киназы (*TDH*) *S. cerevisiae* (Личко и соавт.,

2014). У этого штамма, сверхэкспрессирующего Ppx1, не было обнаружено существенных изменений в уровне полиР (Личко и соавт., 2014).

Целью данной работы было оценить изменения в физиологическом состоянии клеток штамма-сверхпродуцента Ppx1 *S. cerevisiae*, не связанные непосредственно с обменом полиР.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования. В работе были использованы штаммы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*: штамм CRN (*MATa ade2 his3 ura3 ppn1D::CgTRP1*), нокаут-мутант по гену *PPN1*, кодирующего полифосфатазу Ppn1 (Sethuraman et al., 2001) и полученный на его основе трансформант CRN/PPX1, сверхпродуцент полифосфатазы Ppx1 (Личко и соавт., 2014).

Состав среды и условия культивирования. Культуру дрожжей CRN поддерживали на YPD (2% пептона, 1% дрожжевого экстракта, 2% глюкозы) агаризованной среде (2% агар), штамм CRN/PPX1 — на агаризованной селективной среде YNB (“Difco”, США) без урацила (Личко и соавт., 2014). Инокулят и клетки для экспериментов выращивали в жидкой среде YPD, содержащей 14 мМ KH_2PO_4 . Инокулят вносили в среду до оптической плотности 0.08–0.09 ед. Культивирование проводили в колбах с 200 мл среды на качалках при 29°C и перемешивании со скоростью 145 об./мин. Для построения кривой роста штаммов через определенные промежутки времени отбирали аликвоты культур и измеряли оптическую плотность при $\lambda = 530$ нм в кювете шириной 3.07 мм на фотометре КФК-3 (ПО “ЗОМЗ”, Россия).

Сбор биомассы. Биомассу собирали на стационарной стадии роста (24 ч) центрифугированием при 3000 g в течение 10 мин, трижды промывая холодной дистиллированной водой, взвешивали, замораживали при –20°C и использовали для анализа неорганических полифосфатов.

Определение АТФ. Для измерения уровня АТФ промытые и взвешенные образцы биомассы суспендировали в дистиллированной воде до определенного объема, отбирали аликвоты суспензии, содержавшие по 100 мг сырой биомассы и осаждали клетки центрифугированием при 12000 g в течение 3 мин. Для экстракции АТФ к осадку добавляли 320 мкл диметилсульфоксида (DMSO) (“Sigma”, США), суспендировали и хранили при –20°C. В полученных экстрактах АТФ определяли стандартным методом с использованием препарата люциферин-люциферазы (“Sigma”, США). Измерение люминесценции проводили на люцинометре 1250 (“ЛКВ”, Швеция).

Определение глюкозы. Для определения концентрации глюкозы в среде культивирования отбирали по 0.5 мл культуральной жидкости. Клет-

ки удаляли центрифугированием при 12000 g в течение 3 мин. Глюкозу в супернатанте определяли с помощью стандартного набора реагентов Глюкоза ДДС (АО “Диакон-ДС”, Россия). Измерение проводили в планшетах при 500 нм на планшетном фотометре “Эфос 9305” (Россия).

Экстракция полиР. ПолиР экстрагировали из образцов биомассы согласно методике, описанной ранее (Личко и соавт., 2014). К 1 г замороженных клеток добавляли 9 мл 0.5 М HClO_4 и 1 мл 1 М HClO_4 , клетки суспендировали. Полифосфаты экстрагировали в течение 15 мин при 0°C и постоянном перемешивании. Клетки осаждали при 3000 g. Операцию повторяли дважды, супернатанты объединяли. Полученный экстракт содержал кислоторастворимую фракцию полиР (полиРI). К осадку клеток добавляли снова 9 мл 0.5 М HClO_4 и 1 мл 1 М HClO_4 , суспендировали и экстрагировали полиР в течение 20 мин при 90°C, периодически помешивая. После охлаждения клетки осаждали при 3000 g. Операцию повторяли дважды, супернатанты объединяли. Полученный экстракт содержал кислотонерастворимую фракцию полиР (полиРII). Количество фосфора во фракциях определяли по освободившемуся ортофосфату после 10-ти минутного гидролиза аликвоты фракции в 1 М HCl на кипящей бане. Ортофосфат определяли по методу Хейнонена и Лаhti (Heinonen, Lahti, 1981).

Определение АТФазной активности. АТФазную активность определяли после пермеабилзации клеток путем замораживания—оттаивания в присутствии тритона X-100 (Miozzari et al., 1978). 0.5 г клеток суспендировали в 10 мл 10 мМ MES (морфолиноэтансульфоновая кислота)— NaOH буфере, pH 6.5, содержащем 10% сорбит, 100 мМ KCl и 4 мМ MgSO_4 , затем добавляли 0.5 мл 1% тритона X-100 и немедленно замораживали при -80°C . После оттаивания во льду клетки отделяли центрифугированием при 12000 g в течение 3 мин и дважды промывали тем же буфером. Затем суспендировали осадок клеток в 2 мл этого же буфера и использовали полученную суспензию для определения АТФазной активности. Инкубационная среда содержала образцы клеток, 5 мМ АТФ, 5 мМ MgSO_4 и буферные растворы в соответствии с оптимумами pH для трех основных АТФаз дрожжей: 20 мМ MES— NaOH — буфер, pH 6.5 для АТФазы цитоплазматической мембраны, 50 мМ *Трис*- HCl , pH 7.0 для АТФазы вакуолярной мембраны и 50 мМ *Трис*- HCl , pH 8.5 для АТФазы митохондрий. Для оценки активности этих АТФаз использовали специфические ингибиторы: 100 мкМ $\text{Na}_2\text{VO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ как ингибитор АТФазы цитоплазматической мембраны (Borst-Pauwels, Peters, 1981); 0.5 мкМ бафиломицин А (“Sigma-Aldrich”, США) как ингибитор АТФазы вакуолярной мембраны (Bowman et al., 1988) и 5 мМ NaN_3 как ингибитор

АТФазы митохондрий (Harris, 1989). Реакцию гидролиза АТФ во всех трех случаях проводили при 30°C. Вклад каждой из АТФаз оценивали по разнице в количестве выделившегося фосфата между инкубацией в отсутствие и в присутствии ингибиторов. Фосфат определяли колориметрическим методом с использованием красителя малахитового зеленого (Andreeva et al., 2019).

Определение полифосфатазной активности в бесклеточной экстракте. Бесклеточный экстракт получали и полифосфатазную активность определяли с субстратом полиР со средней длиной цепи 188 фосфатных остатков (“Monsanto”, США) в присутствии 2.5 мМ MgSO_4 , как описано ранее (Личко и соавт., 2014).

Определение чувствительности к перекиси. Изучение зависимости роста штаммов от концентрации H_2O_2 проводили в планшетах для иммуноанализа в среде YPD, содержащей от 1 до 5 мМ H_2O_2 . Исходная оптическая плотность культур составляла 0.03–0.04 ед. Клетки культивировали при 30°C в течение 22 ч (стационарная стадия) на термошейкере при 600 об./мин. Оптическую плотность измеряли при 594 нм на планшетном фотометре (“Эфос 9305”, Россия).

Определение активных форм кислорода (АФК) и уровня окисленности липидов (ПОЛ) методом проточной цитометрии. Для определения АФК проводили подсчет количества клеток, в которых 1,2,3-дигидрородамин (DHR) (“Sigma”, США) окислен АФК до флуоресцентной формы (1,2,3-родамин). Для этого к 0.1 мл культуры добавляли 0.002 мл 0.05% раствора DHR в DMSO. Суспензию инкубировали 1 ч при 30°C. Клетки осаждали 1 мин на микроцентрифуге при 18000 об./мин, супернатант декантировали и осадок ресуспендировали в 0.850 мл воды MilliQ. 100000 клеток подсчитывали на цитометре NovoCyte (“Agilent”, США), используя длины волн 488 и 533 нм, соответственно, для возбуждения и эмиссии флуоресценции.

Для оценки уровня окисленности липидов проводили подсчет количества клеток, окрашенных с помощью набора BODIPY (image-IT™ Lipid Peroxidation Kit) (“Invitrogen”, США). Для этого к 0.1 мл культуры добавляли 0.001 мл 2 мМ раствора BODIPY в DMSO. Клетки инкубировали 1 ч при 30°C, осаждали и дважды промывали 0.15 мл воды MilliQ. Осадки суспендировали в 0.1 мл воды MilliQ. 100000 клеток подсчитывали на цитометре NovoCyte (“Agilent”, США). Для возбуждения флуоресценции использовали длину волны 488 нм, для эмиссии — 533 (окисленные липиды) и 585 нм (неокисленные липиды).

Все эксперименты повторяли трижды, статистическую обработку проводили с помощью стандартной программы Excel.

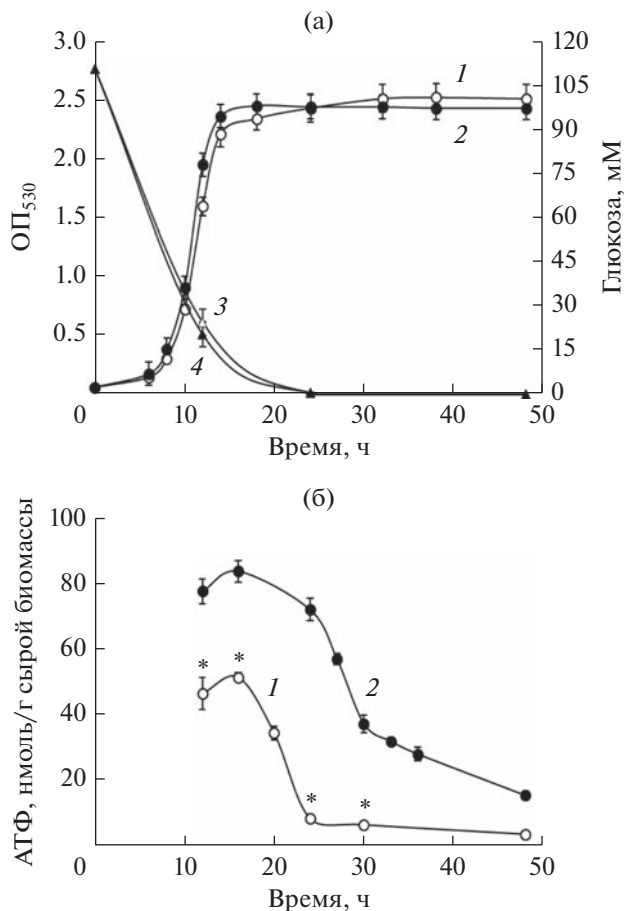


Рис. 1. (а) – Оптическая плотность культур штаммов CRN (1) и CRN/PPX1 (2) и концентрация глюкозы в среде YPD в процессе культивирования штаммов CRN (3) и CRN/PPX1 (4) в среде YPD. (б) – Уровень АТФ в клетках штаммов CRN (1) и CRN/PPX1 (2) в процессе культивирования в среде YPD. Статистическую значимость оценивали относительно данных для родительского штамма CRN с помощью *t*-критерия Стьюдента, используя стандартную программу Excel: для данных на рис. 1а разница является статистически незначимой; для данных рис. 1б: * – $p < 0.01$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При культивировании в среде YPD кривые роста родительского штамма CRN и штамма CRN/PPX1, сверхэкспрессирующего Ppx1, были одинаковыми (рис. 1а). Полифосфатазная активность в бесклеточном экстракте штаммов CRN и CRN/PPX1 составила 0.3 и 8.0 Е на 1 мг белка соответственно. У обоих штаммов в стационарной стадии роста (24 ч) было определено содержание полиР в клетках при выращивании в среде YPD с избытком фосфата (14 мМ). Различий в содержании ортофосфата, кислоторастворимых и кислотонерастворимых полиР не обнаружено (рис. 2), также как показано ранее (Личко с соавт., 2014).

Неожиданной особенностью штамма CRN/PPX1 был более высокий уровень АТФ,

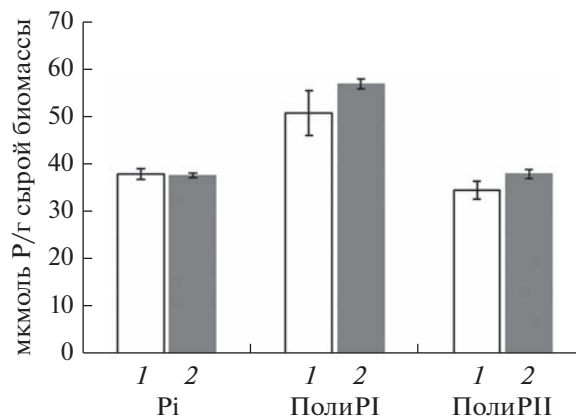


Рис. 2. Содержание Pi, кислоторастворимых полиР (полиРI) и кислотонерастворимых полиР (полиРII) в клетках штаммов CRN (1) и CRN/PPX1 (2) в стационарной фазе роста. Статистическую значимость оценивали относительно данных для родительского штамма CRN с помощью *t*-критерия Стьюдента, используя стандартную программу Excel, разница является статистически незначимой.

причем на стационарной стадии роста уровень АТФ в клетках штамма CRN/PPX1 превышал уровень АТФ в клетках родительского штамма в 9 раз. При этом различия в динамике потребления глюкозы между штаммами не обнаружено (рис. 1б). Следовательно, высокий уровень АТФ в клетках штамма CRN/PPX1 на стационарной стадии роста мог быть связан со снижением ее расходования. Самыми активными потребителями АТФ на стационарной стадии роста, когда этот компонент мало расходуется на анаболические процессы, должны быть протонные АТФазы. Мы проверили активность трех основных АТФаз у обоих штаммов и обнаружили, что активности АТФаз митохондрий и цитоплазматической мембраны не различались, тогда как активность АТФазы вакуолярной мембраны у штамма CRN/PPX1 была в 5 раз ниже, чем у родительского штамма (рис. 3). Поскольку это достаточно активный протонный насос, то такое значительное снижение его активности вполне достаточно для объяснения увеличения содержания АТФ.

Штамм CRN/PPX1 был более чувствительным к перекиси водорода по сравнению с родительским штаммом (рис. 4). Концентрация перекиси, ингибирующая рост на 50% CRN/PPX1 и CRN, составила ~1.4 и 2.3 мМ соответственно (рис. 4). Этот эффект не зависел от стадии роста клеток, которые использовали для засева в планшеты (рис. 4а, 4б). Напомним, что уровень АТФ в логарифмической стадии роста в клетках штамма CRN/PPX1 был выше, чем у родительского штамма всего лишь в полтора раза, тогда как в стационарной стадии это различие было более значительным (рис. 1б). Следовательно, не прослеживается

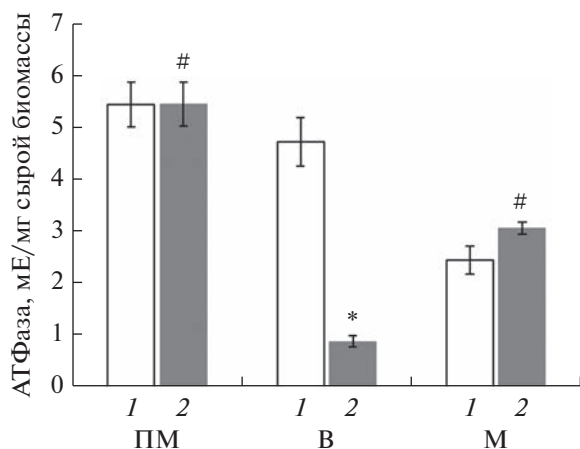


Рис. 3. Активность АТФаз при определении в пермеабелизованных клетках штаммов CRN (1) и CRN/PPX1 (2) на стационарной стадии роста; ПМ – АТФаза плазматической мембраны, В – АТФаза вакуолярной мембраны, М – АТФаза митохондрий. Статистическую значимость оценивали относительно данных для родительского штамма CRN с помощью *t*-критерия Стьюдента, используя стандартную программу Excel: * – $p < 0.01$; # – разница статистически незначима.

взаимосвязь между различиями в чувствительности к перекиси и уровне АТФ.

Мы предположили, что клетки штамма CRN/PPX1 имеют больший уровень активных форм кислорода (АФК) в контрольных условиях роста по сравнению с родительским штаммом. Культивирование в присутствии перекиси усиливает процессы пероксидации в клетке, что могло бы приводить к ингибированию роста при более низких концентрациях перекиси. Было обнаружено, что уровень АФК в клетках стационарной стадии у штамма CRN/PPX1 почти в 2 раза выше, чем у CRN (рис. 5а). Однако статистически достоверной разницы в степени окисленности липидов между штаммами не наблюдали (рис. 5б).

Итак, в клетках *S. cerevisiae*, сверхэкспрессирующих полифосфатазу Ppx1, наблюдали следующие физиологические изменения на стационарной стадии роста: в 9 раз увеличился уровень АТФ, значительно снизилась активность вакуолярной АТФазы, увеличилась чувствительность к перекиси по сравнению с родительским штаммом. Уровень АФК при этом был выше, чем у родительского штамма. Поскольку сверхэкспрессия PPX1 в наших экспериментальных условиях не повлияла на уровень полиР, то сами полиР мы не рассматриваем в данном случае в роли сигнальных молекул, регулирующих эти изменения. Возникает предположение, что триггером этих изменений являются другие сигнальные соединения дрожжей, содержащие фосфоэфирную связь. Ppx1 гидролизует аденозин 5'-тетрафосфат и гуанозин 5'-тетрафосфат до

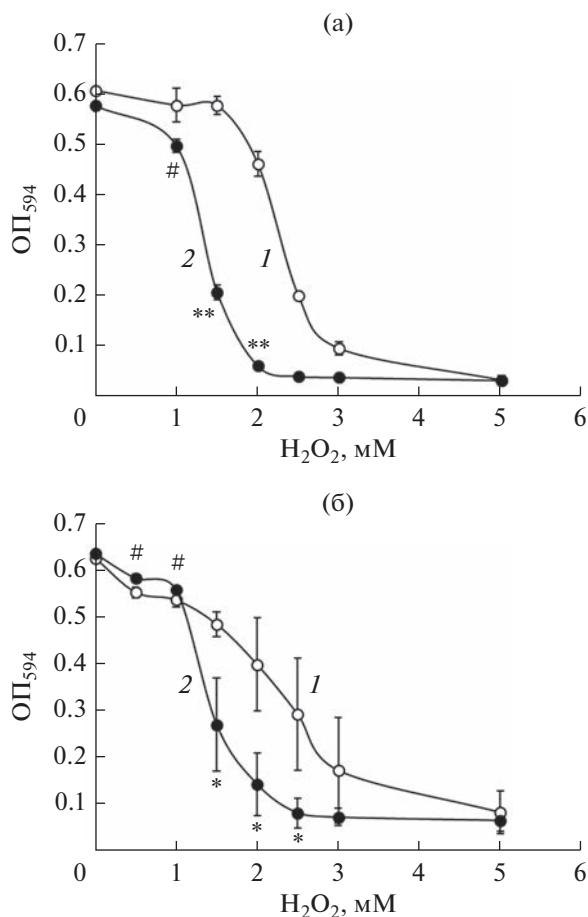


Рис. 4. Оптическая плотность культур в стационарной стадии при культивировании в иммунопланшетах в среде YPD с разной концентрацией H_2O_2 : (а) – для засева использовали клетки, выращенные в течение 24 ч; (б) – для засева использовали клетки, выращенные в течение 11 ч. (1) – штамм CRN, (2) – штамм CRN/PPX1. Статистическую значимость оценивали относительно данных для родительского штамма CRN с помощью *t*-критерия Стьюдента, используя стандартную программу Excel: ** – $p < 0.001$; * – $p < 0.01$; # – разница статистически незначима.

АТФ и ГТФ соответственно (Andreeva et al., 2019), но сведения о сигнальной роли этих соединений немногочисленны (Jakubowski, 1986). Фермент не способен к гидролизу хорошо известного сигнального соединения, инозитол пиррофосфата (Lonetti et al., 2011), однако гидролизует цАМФ до АМФ *in vitro* (Andreeva et al., 2019). У дрожжей множество сигналов, связанных с ростом и стрессовыми условиями, изменяют уровень цАМФ, повышение которого приводит к увеличению активности протеинкиназы А (РКА), а этот фермент, в свою очередь, регулирует широкий спектр клеточных процессов (Portela, Rossi 2020). В частности, протеинкиназа А участвует в реакциях клеток дрожжей на окислительный стресс (Roger et al., 2020). V-АТФаза вакуолярной мембраны находится на

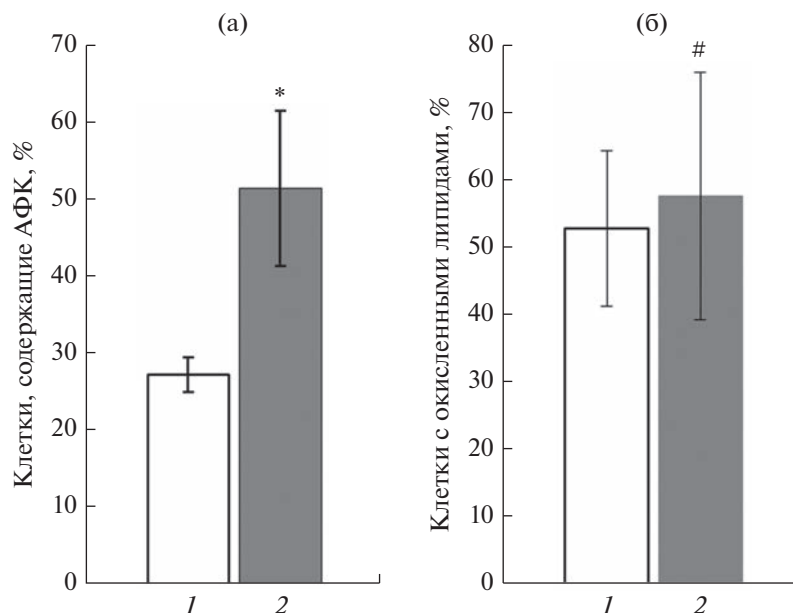


Рис. 5. Оценка уровня АФК (а) и окисленности липидов (б) в клетках штаммов CRN (1) и CRN/PPX1 (2). Статистическую значимость оценивали относительно данных для родительского штамма WT с помощью *t*-критерия Стьюдента, используя стандартную программу Excel: * – $p < 0.01$; # – разница статистически незначима.

пересечении различных внутриклеточных сигнальных путей, а ее сложная многосубъединичная структура претерпевает обратимую сборку и разборку в зависимости от условий среды (Paaga et al., 2014). Процесс разборки стимулируется при снижении концентрации глюкозы в среде (Paaga et al., 2014), а также в условиях окислительного стресса (Khan et al., 2021). Этот процесс зависит, в том числе, от пути Рас/цАМФ/РКА (Ras/cAMP/РКА pathway). Снижение уровня цАМФ может приводить к преобладанию процесса разборки фермента и, соответственно, снижению активности V-АТФазы (Bond, Forgacs 2008).

Наблюдаемое в данной работе снижение активности V-АТФазы и способности клеток дрожжей к преодолению окислительного стресса свидетельствуют в пользу того, что сверхэкспрессия Ppx1 приводит к нарушению увеличения уровня цАМФ при стрессах за счет его недостаточно контролируемого гидролиза. Эти данные позволяют предположить, что одной из функций Ppx1 в клетках дрожжей является участие в регуляции уровня цАМФ.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Андреева Н.А., Окорочков Л.А. Некоторые свойства высокоочищенной полифосфатазы клеточной оболочки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* // Биохимия. 1990. Т. 55. С. 2286–2292.

Andreeva N.A., Okorokov L.A., Kulaev I.S. Purification and certain properties of cell envelope polyphosphatase of the yeast *Saccharomyces carlsbergensis* // Biochemistry (Moscow). 1990. V. 55. P. 819–826.

Калебина Т.С., Егоров С.Н., Арбатский Н.П., Безсонов Е.Е., Горковский А.А., Кулаев И.С. О роли высокомолекулярных полифосфатов в активации глюкан-трансферазы Bgl2p из клеточной стенки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* // ДАН. 2008. Т. 420. С. 695–699.

Kalebina T.S., Egorov S.N., Arbatskii N.P., Bezsonov E.E., Gorkovskii A.A., Kulaev I.S. The role of high-molecular-weight polyphosphates in activation of glucan transferase Bgl2p from *Saccharomyces cerevisiae* cell wall // Dokl. Biochem. Biophys. 2008. V. 420. P. 142–145.

Кулаковская Т.В., Трилисенко Л.В., Личко Л.П., Вагатов В.М., Кулаев И.С. Влияние инактивации генов экзополифосфатазы *PPX1* и *PPN1* на содержание полифосфатов различных фракций у *Saccharomyces cerevisiae* // Микробиология. 2006. Т. 75. С. 35–39.

Kulakovskaya T.V., Trilisenko L.V., Lichko L.P., Vagabov V.M., Kulaev I.S. The effect of inactivation of the exo- and endopolyphosphatase genes *PPX1* and *PPN1* on the level of different polyphosphates in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* // Microbiology (Moscow). 2006. V. 75. P. 25–28.

Личко Л.П., Кулаковская Т.В., Кулаковская Е.В., Кулаев И.С. Инактивация генов *PPX1* и *PPN1*, кодирующих экзополифосфатазы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* не препятствует использованию полифосфатов в каче-

- стве фосфорных резервов // Биохимия. 2008. Т. 73. С. 1224–1229.
- Lichko L.P., Kulakovskaya T.V., Kulakovskaya E.V., Kulaev I.S. Inactivation of *PPX1* and *PPN1* genes encoding exopolyphosphatases of *Saccharomyces cerevisiae* does not prevent utilization of polyphosphates as phosphate reserve // Biochemistry (Moscow). 2008. V. 73. P. 985–989.
- Личко Л.П., Эльдаров М.А., Думина М.В., Кулаковская Т.В. Сверхэкспрессия гена *PPX1* не влияет на полифосфаты *Saccharomyces cerevisiae* // Биохимия. 2014. Т. 79. С. 1487–1492.
- Lichko L.P., Eldarov M.A., Dumina M.V., Kulakovskaya T.V. *PPX1* gene overexpression has no influence on polyphosphates in *Saccharomyces cerevisiae* // Biochemistry (Moscow). 2014. V. 79. P. 1211–1215.
- Ahmed Y., Ikeh M.A.C., MacCallum D.M., Day A.M., Waldron K., Quinn J. Blocking polyphosphate mobilization inhibits *pho4* activation and virulence in the pathogen *Candida albicans* // mBio. 2022. V. 13. Art. e0034222. <https://doi.org/10.1128/mbio.00342-22>
- Andreeva N., Ledova L., Ryazanova L., Tomashevsky A., Kulakovskaya T., Eldarov M. Ppn2 endopolyphosphatase overexpressed in *Saccharomyces cerevisiae*: comparison with Ppn1, Ppx1, and Ddp1 polyphosphatases // Biochimie. 2019. V. 163. P. 101–107.
- Bond S., Forgacs M. The Ras/cAMP/protein kinase A pathway regulates glucose-dependent assembly of the vacuolar (H⁺)-ATPase in yeast // J. Biol. Chem. 2008. V. 283. P. 36513–36521.
- Borst-Pauwels G.W., Peters P.H. Factors affecting the inhibition of yeast plasma membrane ATPase by vanadate // Biochim. Biophys. Acta. 1981. V. 642. P. 173–181.
- Bowman E.J., Siebers A., Altendorf K. Bafilomycins: a class of inhibitors of membrane ATPases from microorganisms, animal cells, and plant cells // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1988. V. 85. P. 7972–7976.
- Harris D.A. Azide as a probe of co-operative interactions in the mitochondrial F1-ATPase // Biochim. Biophys. Acta. 1989. V. 974. P. 156–162.
- Heinonen J.K., Lahti R.J. A new and convenient colorimetric determination of inorganic orthophosphate and its application to the assay of inorganic pyrophosphatase // Anal. Biochem. 1981. V. 113. P. 313–317.
- Gerasimaitė R., Sharma S., Desfougères Y., Schmidt A., Mayer A. Coupled synthesis and translocation restrains polyphosphate to acidocalcisome-like vacuoles and prevents its toxicity // J. Cell. Sci. 2014. V. 127. P. 5093–5104.
- Jakubowski H. Sporulation of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is accompanied by synthesis of adenosine 5'-tetraphosphate and adenosine 5'-pentaphosphate // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. P. 2378–2382.
- Jin R., Dobry C.J., McCown P.J., Kumar A. Large-scale analysis of yeast filamentous growth by systematic gene disruption and overexpression // Mol. Biol. Cell. 2008. V. 19. P. 284–296.
- Khan M.M., Lee S., Couoh-Cardel S., Oot R.A., Kim H., Wilkens S., Roh S.H. Oxidative stress protein Oxr1 promotes V-ATPase holoenzyme disassembly in catalytic activity-independent manner // EMBO J. 2022. V. 41. Art. e109360. <https://doi.org/10.15252/embj.2021109360>
- Kulaev I.S., Vagabov V.M. Polyphosphate metabolism in microorganisms // Adv. Microbiol. Physiol. 1983. V. 24. P. 83–171.
- Kulakovskaya T. Inorganic polyphosphates and heavy metal resistance in microorganisms // World J. Microbiol. Biotechnol. 2018. V. 34. Art. 139. <https://doi.org/10.1007/s11274-018-2523-7>
- Lichko L., Kulakovskaya T., Pestov N., Kulaev I. Inorganic polyphosphates and exopolyphosphatases in cell compartments of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* under inactivation of *PPX1* and *PPN1* genes // Biosci. Rep. 2006. V. 26. P. 45–54.
- Lonetti A., Szijgyarto Z., Bosch D., Loss O., Azevedo C., Sardiardi A. Identification of an evolutionarily conserved family of inorganic polyphosphate endopolyphosphatases // J. Biol. Chem. 2011. V. 286. P. 31966–31974.
- McCarthy L., Abramchuk I., Wafy G., Denoncourt A., Lavallée-Adam M., Downey M. Ddp1 cooperates with Ppx1 to counter a stress response initiated by nonvacuolar polyphosphate // mBio. 2022. V. 13. Art. e0039022. <https://doi.org/10.1128/mbio.00390-22>
- Miozzari G.F., Niederberger P., Hutter R. Permeabilization of microorganisms by Triton X-100 // Anal. Biochem. 1978. V. 90. P. 220–233.
- Parra K.J., Chan C.Y., Chen J. *Saccharomyces cerevisiae* vacuolar H⁺-ATPase regulation by disassembly and reassembly: one structure and multiple signals // Eukaryot. Cell. 2014. V. 13. P. 706–714.
- Portela P., Rossi S. cAMP-PKA signal transduction specificity in *Saccharomyces cerevisiae* // Curr. Genet. 2020. V. 66. P. 1093–1099. <https://doi.org/10.1007/s00294-020-01107-6>
- Roger F., Picazo C., Reiter W., Libiad M., Asami C., Hanzén S., Gao C., Lagniel G., Welkenhuysen N., Labarre J., Nyström T., Grotli M., Hartl M., Toledano M.B., Molin M. Peroxiredoxin promotes longevity and H₂O₂-resistance in yeast through redox-modulation of protein kinase A // Elife. 2020. V. 9. Art. e60346. <https://doi.org/10.7554/eLife.60346>
- Sethuraman A., Rao N.N., Kornberg A. The endopolyphosphatase gene: essential in *Saccharomyces cerevisiae* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001. V. 98. P. 8542–8547.
- Tammenkoski M., Moiseev V.M., Lahti M., Ugochukwu E., Brondijk T.H.C., White S.A., Lahti R., Baykov A.A. Kinetic and mutational analyses of the major cytosolic exopolyphosphatase from *Saccharomyces cerevisiae* // J. Biol. Chem. 2007. V. 282. P. 9302–9311.
- Tammenkoski M., Koivula K., Cusanelli E., Zollo M., Steegborn C., Baykov A.A., Lahti R. Human metastasis regulator protein H-prune is a short-chain exopolyphosphatase // Biochemistry. 2008. V. 47. P. 9707–9713.
- Ugochukwu E., Lovering A.L., Mather O.C., Young T.W., White S.A. The crystal structure of the cytosolic exopolyphosphatase from *Saccharomyces cerevisiae* reveals the basis for substrate specificity // J. Mol. Biol. 2007. V. 371. P. 1007–1021.
- Wurst H., Shiba T., Kornberg A. The gene for a major exopolyphosphatase of *Saccharomyces cerevisiae* // J. Bacteriol. 1995. V. 177. P. 898–906.

Physiological Characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* Strain Overexpressing Polyphosphatase Ppx1

L. V. Trilisenko¹, A. Ya. Valiakhmetov¹, and T. V. Kulakovskaya¹, *

¹Federal Research Center “Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences”, Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Pushchino, 142290 Russia

*e-mail: alla@ibpm.ru

Received February 16, 2023; revised March 25, 2023; accepted March 25, 2023

Abstract—The Ppx1 exopolyphosphatase of yeast is a constitutive protein localized predominantly in the cytoplasm. The purified enzyme hydrolyzes inorganic polyphosphates with high activity; however, in the knockout $\Delta ppx1$ mutant of *Saccharomyces cerevisiae* the increase in the polyphosphate level was small, and no changes in physiological properties of this mutant were observed. To elucidate the functions of Ppx1, we studied the physiological characteristics of the *S. cerevisiae* strain overexpressing this enzyme. When cultivated in the YPD medium, the strain overexpressing Ppx1 showed no growth features different from those of the parental strain. The following physiological features of the strain overexpressing Ppx1 were observed at the stationary stage of growth: the level of ATP increased by nine times, the activity of vacuolar ATPase significantly decreased, and the sensitivity to peroxide increased compared to the parental strain. The level of reactive oxygen species doubled, while the degree of lipid oxidation remained the same as in parental strain. Since overexpression of Ppx1 under the culture conditions used did not affect the polyphosphate level, these polymers were not the regulators of the changes described above. Response to oxidative stress and vacuolar ATPase activity in yeasts is known to be regulated by cAMP, while Ppx1 is capable of hydrolyzing this signaling compound. We suggest that one of the functions of Ppx1 in yeasts is participation in the regulation of cAMP level.

Keywords: polyphosphatase, Ppx1, overexpressing strain, ATPase, oxidative stress, reactive oxygen species, *Saccharomyces cerevisiae*

БИОРАЗНООБРАЗИЕ И МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ СООБЩЕСТВ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ ДВУСТВОРЧАТОГО МОЛЛЮСКА *CRENOMYTILUS GRAYANUS*

© 2023 г. Т. И. Дункай^{a, b}, Е. А. Богатыренко^{a, *}, А. В. Ким^{a, c}

^aДальневосточный федеральный университет, Владивосток, 690992 Россия

^bНациональный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского ДВО РАН, Владивосток, 690041 Россия

^cФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН, Владивосток, 690022 Россия

*e-mail: bogatyrenko.ea@dyfu.ru

Поступила в редакцию 10.03.2023 г.

После доработки 30.03.2023 г.

Принята к публикации 30.03.2023 г.

Впервые проведен анализ по изучению биоразнообразия бактериальных сообществ пищеварительной системы мидии Грея из прибрежных вод Японского моря с хроническим антропогенным загрязнением на основе метабаркодинга. В микробиоте гидробионтов, помимо типичных морских бактерий, были обнаружены представители таксонов, характерных для местообитаний, загрязненных нефтью (*Rhodobacteraceae*, *Corynebacteriaceae*), тяжелыми металлами (*Asinibacterium*) и неочищенными коммунально-бытовыми стоками (*Cloacibacterium*, *Globicatella*). В ходе исследований получена и таксономически охарактеризована коллекция из 411 штаммов культивируемых гетеротрофных бактерий. Показано, что кишечный микробиом моллюсков характеризуется уникальным таксономическим составом в зависимости от района обитания животных. Изучена способность штаммов бактерий, выделенных из пищеварительной системы мидии Грея, разлагать различные питательные субстраты (сахара, аминокислоты, полисахариды) и ксенобиотики (нефтяные углеводороды, бисфенол А, атразин). Большинство полученных изолятов были способны к расщеплению широкого спектра органических субстратов, 13% (54 штамма) окисляли углеводороды нефти, 1% (4 штамма) – бисфенол А и 0.5% (2 штамма) – атразин. Высказано предположение об участии микробиома мидии Грея в симбионтном пищеварении и детоксикации моллюска.

Ключевые слова: *Crenomytilus grayanus*, микробиом, NGS, антропогенное загрязнение, атразин, бисфенол, углеводороды

DOI: 10.31857/S0026365623600086, **EDN:** RKHMYP

Микробиоценозы, занимающие ту или иную экологическую нишу в организме хозяина, характеризуются сложной иерархической структурой, различными межвидовыми отношениями, многоступенчатыми метаболическими процессами. Кроме того, они выполняют множество полезных функций для организма хозяина: повышают его колонизационную резистентность к патогенным микроорганизмам, участвуют в переваривании пищи, детоксикации, поддержании водного, солевого и рН-гомеостаза, синтезируют аминокислоты, органические кислоты, витамины и другие метаболиты, а также могут выступать источником питательных веществ при стрессе (Harris, 1993).

Мидии являются ключевым звеном морских экосистем и одним из перспективных объектов коммерческого воспроизводства среди двустворчатых моллюсков. Учитывая важную роль индигенной микрофлоры в поддержании здоровья

гидробионтов, в современной литературе представлено большое количество научных работ, посвященных изучению микробиоты, ассоциированной с мидиями. Микробное разнообразие описано у таких традиционных объектов аквакультуры, как *Mytilus galloprovincialis* (Cavallo et al., 2009; Santisi et al., 2015), *M. coruscus* (Li et al., 2018), *M. trossulus* (Беленева и соавт., 2003) и *M. edulis* (Bezgachina, Kozitskiy, 2010; Motiei, 2014). Установлено, что состав микробиоты двустворчатых моллюсков существенно зависит от целого ряда факторов: вида гидробионта и его генетических особенностей, стадии его развития, типа органа или ткани, физико-географических особенностей района обитания, времени года, температуры, концентрации растворенного кислорода в воде, питания, наличия в среде поллютантов и т.п. (Pailard et al., 2022). Несмотря на это, чаще всего в структуре бактериальных сообществ разных видов мидий обнаруживают представителей следующих

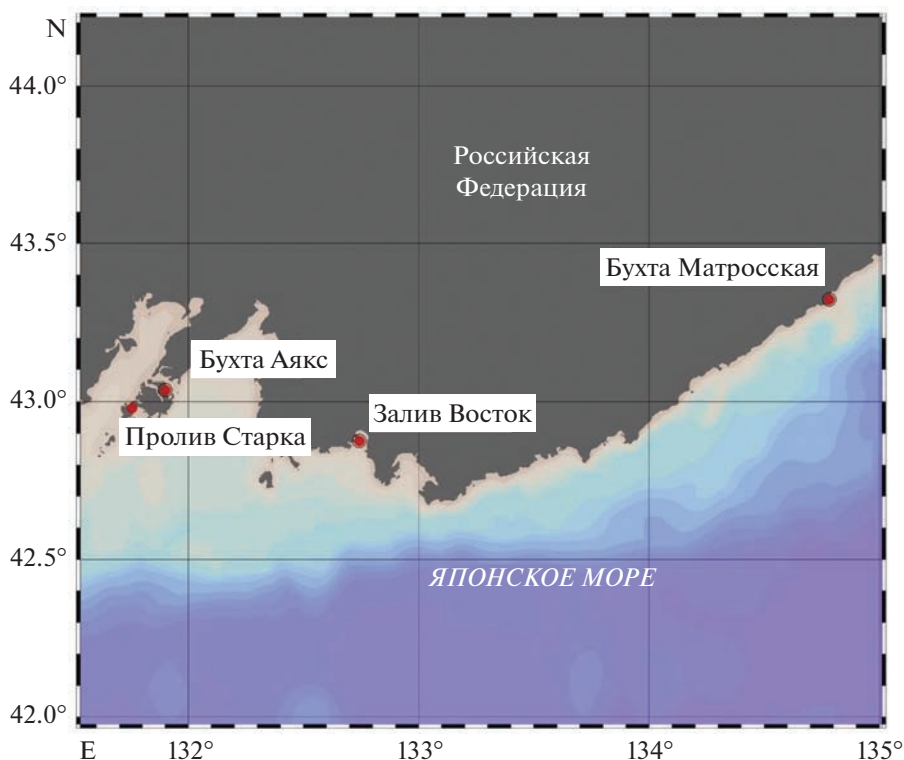


Рис. 1. Районы отбора проб.

таксонов: *Verrucomicrobia*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Cytophaga*, *Spongiobacter*, *Shewanella*, *Vibrio*, *Escherichia*, *Chromobacterium*, *Photobacterium*, *Desulfovibrio*, *Rhodococcus*, *Microbacterium* и *Micrococcus* (Беленева и соавт., 2003; Cavallo et al., 2009; Bezgachina, Kozitskiy, 2010; Motiei, 2014; Santisi et al., 2015; Li et al., 2018).

Что касается мидии Грея *Crenomytilus grayanus* (Dunker, 1853), то микробиота пищеварительной системы этого гидробионта изучена слабо, несмотря на то, что это один из наиболее массовых видов двусторчатых моллюсков в прибрежной зоне северной части Японского моря и традиционный объект промысла. В предыдущих исследованиях с помощью культуральных методов изучали влияние микрофлоры воды и донных отложений на микрофлору *Crenomytilus grayanus* (Vogatyenko et al., 2018), ферментативную активность микроорганизмов-ассоциантов моллюска (Иванова и соавт., 1992), а также сезонную динамику численности гетеротрофных бактерий в тканях мидии Грея (Beleneva, Zhukova, 2009).

Целью работы было изучение биоразнообразия и метаболических особенностей бактериальных сообществ пищеварительной системы мидии Грея (*Crenomytilus grayanus*) из прибрежных акваторий северной части Японского моря.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Район исследований и отбор проб. В качестве районов исследований были выбраны 4 прибрежные акватории северной части Японского моря (рис. 1, табл. 1).

Бухта Аякс расположена на северо-востоке острова Русский, в южной части пролива Босфор Восточный. Акватория расположена у берегов крупного города Владивостока и характеризуется хроническим загрязнением углеводородами, ДДТ (4,4'-дихлордифенил-трихлорэтан), фенолом, тяжелыми металлами, а также бытовым мусором (Мощенко, Шайхлисламова, 2010).

Пролив Старка разделяет острова Русский и Попова, административно относящиеся к г. Владивостоку. В летний период район испытывает существенную рекреационную нагрузку. Наблюдается загрязнение акватории неочищенными сточными водами от туристических баз, нефтяными углеводородами и тяжелыми металлами (Коженкова, Христофорова, 2009).

Залив Восток расположен на северо-востоке залива Петра Великого, вблизи крупных портов Приморского края, включая нефтеналивной порт Козьмино. Для акватории характерно загрязнение фенолами и нефтяными углеводородами, концентрации которых в зависимости от сезона

Таблица 1. Характеристики районов отбора проб (Журавель и соавт., 2012)

Акватория	Соленость, ‰	Температура поверхностных вод, °С	
		зимой	летом
Бухта Аякс	26.3–35.9	1.2–1.4	15–21
Пролив Старка	10.6–33.5	–1.8–0.25	21–26
Залив Восток	29.0–34.1	–1.6–1.9	19–23
Бухта Матросская	30–33.6	–2–1.4	7.7–15.5

превышают ПДК в 10–30 и в 2–12 раз соответственно (Журавель и соавт., 2012).

Бухта Матросская расположена на севере Приморского края. Акватория выбрана в качестве фонового района с минимальной антропогенной нагрузкой. Вблизи отсутствуют крупные населенные пункты и объекты промышленности.

В августе 2019 г. с глубины 6–10 м было отобрано по 10 образцов взрослых особей мидии Грея (*Crenomytilus grayanus*) из каждой исследуемой акватории. В лаборатории животные были очищены от внешних загрязнений и вскрыты. С соблюдением условий стерильности образцы желудочно-кишечного тракта были извлечены, гомогенизированы и заморожены для дальнейших исследований.

Метабаркодинг. Из гомогената тканей выделяли суммарную ДНК в трех повторностях с использованием набора GeneJET Genomic DNA Purification Kit (“Thermo Scientific”, США) согласно протоколу производителя. Концентрацию и чистоту ДНК анализировали с использованием NanoDrop 2000 (“Thermo Scientific”, США).

Аmplификацию региона V3–V4 гена 16S рРНК проводили на приборе CFX-96 (“Bio-Rad”, США) с помощью набора Phusion Hot Start II DNA Polymerase (“Thermo Fisher Scientific”, США), 0.2 мМ dNTP (“Life Technologies”, США) и праймеров 343F (5'-CTCCTACGGRRSGCAGCAG-3') и 806R (5'-GGACTACNVGGGTWTCTAAT-3'), содержащих адаптерные последовательности (Illumina), линкер и баркод.

Продукты амплификации нужной длины вырезали из геля и экстрагировали ДНК с помощью набора реагентов для очистки ДНК из агарозного геля MinElute Gel Extraction Kit (“Qiagen”, Германия). Секвенирование проводили в ЦКП “Геномика” СО РАН (ИХБФМ СО РАН) на секвенаторе MiSeq (“Illumina”, США), используя набор Reagent Kit v3 (2 × 300) (“Illumina”, США).

Прочтения были обработаны с помощью среды программирования R с использованием пакета DADA2 (<https://github.com/benjjneb/dada2>). После создания таблицы последовательностей, удаления химер и кластеризации, таксономическая классификация проводилась с использованием базы данных SILVA v. 138 с бутстреп-поддерж-

кой 80%. Последовательности были нормализованы, выровнены и сгруппированы в операционно-таксономические единицы (ОТЕ) с 97% идентичности (Mikhailov et al., 2019).

Данные, полученные в ходе исследования, зарегистрированы в NCBI в проекте PRJNA892878.

Анализ культивируемых форм бактерий. Образцы кишечника мидий Грея высевали на универсальную питательную среду для морских микроорганизмов (СММ) следующего состава (г/л): CaCO₃ – 1; MgSO₄ – 1; K₂HPO₄ – 0.2; глюкоза – 0.2; пептон ферментативный, сухой для бактериологических целей – 5; агар бактериологический – 15; дрожжевой экстракт – 5; искусственная морская вода ((г/л): NaCl – 27.5; MgCl₂ – 5; MgSO₄ · 7H₂O – 2; CaCl₂ – 0.5; KCl – 1; FeSO₄ – 0.001–500 мл; дистиллированная вода – 500 мл; pH 7.8–8.1) (Youchimizu, 1976). Посевы инкубировали при 22°C в течение 5 сут, после чего получали чистые культуры бактерий.

Идентификацию полученных штаммов бактерий проводили на основе анализа нуклеотидных последовательностей фрагмента гена 16S рРНК, используя пару праймеров 27F (5'-AGAGTTT-GATCATGGCTCAG-3') и 1350R (5'-GACGGGC-GGTGTGTACAAG-3') (Lane et al., 1985). Секвенирование по Сэнгеру осуществлялось на капиллярном приборе ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (“Applied Biosystems”, США).

Рост бактерий на природных органических субстратах. Способность бактерий к деструкции сахаров проводилась с использованием сред Гисса с индикатором ВР (аурин, анилиновый голубой, 1 : 1), для определения сахаролитических свойств (лактоза, глюкоза, сахароза, арабиноза, манноза, ксилоза, дульцит, сорбит, маннит; “Биотехновация”, Россия). Для определения деструкции аминокислот (аргинин, триптофан, фенилаланин, орнитин, аланин, глицин) и мочевины использовали коммерческие наборы производства ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера (Россия).

Способность разлагать крахмал, хитин, хитозан, фукоидан, альгинат натрия, коллаген и хондроитинсульфат определяли путем посева суточных культур бактерий на модифицированную минераль-

ную среду Ворошиловой–Диановой (ВД) (г/л дистиллированной воды): NaCl – 10; NH₄NO₃ – 1; K₂HPO₄ – 1; KH₂PO₄ – 1; MgSO₄ – 0.2; CaCl₂ – 0.02; FeCl₂ – 2 капли насыщенного раствора; агар – 15.0 (Ким, 2022). В качестве единственного источника углерода использовали соответствующий субстрат в концентрации 1%. Для контроля параллельно высевали штаммы бактерий на чашках Петри с минеральной средой без добавления органического субстрата. Инкубировали до 10 сут при температуре 22°C. Отмечали рост бактерий на среде с субстратом и отсутствие роста на голодной минеральной среде. Для выявления амилолитической активности в чашки с крахмальной средой добавляли раствор Люголя и отмечали появление светлых колец вокруг колоний, свидетельствующее о наличии амилаз. Все эксперименты повторяли трижды.

Рост бактерий в присутствии ксенобиотиков. Для определения способности к утилизации нефтяных углеводов все штаммы бактерий высевали на модифицированную минеральную среду ВД с добавлением 1% сырой нефти, инкубировали 14 сут при 22°C, после чего отмечали рост бактерий.

Для определения способности бактерий к утилизации нафталина, бензола, толуола, ксилола готовили суспензии из суточных культур бактерий, выросших на среде с нефтью (плотность OD = 1 при 600 нм). В стерильные микропланшеты вносили по 1.5 мл среды Бушнелла–Хааса (состав (г/л): MgSO₄ · 7H₂O – 0.2; CaC₁₂ · 2H₂O – 0.002; KH₂PO – 1.0; K₂HPO₄ – 1.0; NH₄NO₃ – 1.0; FeCl₃ – 0.05; pH 7.0) и 25 мкл бактериальной суспензии. В качестве единственного источника углерода в лунки добавляли по 5 мкл одного из субстратов (гексадекан, нафталин, бензол, толуол, ксилол) и по 1.5 мкг 2,6-дихлорфенолиндофенол (ДХФИФ). При микробном окислении углеводов электроны переносятся на акцепторы электронов. ДХФИФ является акцептором и, таким образом, можно учитывать способность микроорганизма использовать углеводородный субстрат, наблюдая изменение цвета ДХФИФ с синего (окисленного) на бесцветный (восстановленный). Планшеты инкубировали при 22°C и наблюдали обесцвечивание или снижение окраски среды Бушнелла–Хааса в течение суток (Napson et al., 1993).

Для определения способности к деструкции бисфенола А все исследуемые штаммы бактерий высевали на модифицированную минеральную среду ВД с добавлением 0.1% бисфенола А, далее инкубировали 14 сут при 22°C. Для штаммов бактерий, выросших на этой плотной среде, готовили бактериальную суспензию (плотность OD = 1 при 600 нм) и добавляли в объеме 1 мл в колбы с 50 мл жидкой минеральной среды ВД, содержа-

щей 0.1% бисфенола А. В качестве контроля использовали стерильную среду ВД с 0.1% бисфенола А. Инкубировали при 22°C в течение 5 сут. Пробы центрифугировали при 1500 об./мин в течение 3 мин. Отбирали надосадочную жидкость, переносили ее в чистые пробирки и добавляли 0.5 мл реагент Фолина–Чокальтеу, инкубировали 5 мин. Процент деструкции бисфенола А учитывали на спектрофотометре Genesys 10S UV-VIS (“Thermo Scientific”, США) при длине волны 765 нм по изменению окраски среды. Суть метода заключается в том, что содержащиеся в реагенте Фолина–Чокальтеу фосфовольфрамовые и фосфомолибденовые кислоты при восстановлении фенольными соединениями образуют комплекс синего цвета, интенсивность окраски которого пропорциональна количеству фенольных соединений (Ingale et al., 2021).

Все исследуемые штаммы бактерий были протестированы на способность к деструкции атразина за счет оценки дегидрогеназной активности. Суть метода заключается в восстановлении раствора бесцветной соли 2,3,5-трифенилтетразолия хлористого (ТТХ) в трифенилформазан красного цвета при окислительно-восстановительных реакциях микробного разложения ксенобиотика при действии дегидрогеназ. В стерильные чашки Петри вносили 20 мл среды Е-8 (г/л: KH₂PO₄ – 0.7; (NH₄)₂HPO₄ – 1.5; MgSO₄ – 0.8; NaCl – 0.5; агар – 20.0; pH 6.6 – 6.7), содержащей 0.6 мг/л гербицида атразин и 1% ТТХ. Для контроля разливали в чашки Петри по 20 мл среды Е-8 с ТТХ, но без атразина. Далее на поверхность готовой среды опытного и контрольного вариантов производили посев суточной культуры бактерий. Инкубировали при 22°C в течение 12 сут, после чего измеряли диаметр образовавшейся вокруг посева зоны красного цвета (Патент РФ 2051961).

Статистическая обработка данных проводилась в среде R. По результатам метабаркодинга были рассчитаны индексы разнообразия Шеннона и Симпсона. На основе данных по изучению разнообразия культивируемых бактерий построена диаграмма Венна и рассчитаны коэффициенты сходства Жаккара. Способность расщеплять органические субстраты, включая ксенобиотики, в зависимости от района обитания мидии Грея, была оценена с помощью критерия Шапиро–Уилка, проверяющего гипотезу о нормальности распределения, однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) и апостериорного теста Шеффе.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Метабаркодинг. В результате проведенного анализа из образцов пищеварительной системы мидии Грея было получено 271 453 нуклеотидных последовательностей и 58 ОТЕ бактерий (табл. 2).

Таблица 2. Характеристики биоразнообразия микробиомов мидии Грея

Район	Нуклеотидные последовательности	ОТЕ	Индекс Шеннона	Индекс Симпсона
Бухта Аякс	105042	13	2.417	0.897
Пролив Старка	84461	10	1.446	0.626
Залив Восток	35742	29	2.943	0.914
Бухта Матросская	46208	22	2.661	0.898

Таблица 3. Филумы бактерий, полученные при анализе микробиома пищеварительной системы *Crenomytilus grayanus*

Филум	Бухта Аякс	Пролив Старка	Залив Восток	Бухта Матросская
<i>Proteobacteria</i>	67.97%	5.92%	64.58%	75.97%
<i>Firmicutes</i>	0.00%	76.39%	15.68%	0.00%
<i>Actinobacteriota</i>	21.70%	0.00%	6.46%	8.44%
<i>Bacteroidota</i>	0.00%	12.35%	10.47%	14.40%
<i>Gemmatimonadota</i>	4.45%	5.33%	1.08%	0.00%
<i>Verrucomicrobiota</i>	5.88%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Мухоскочота</i>	0.00%	0.00%	1.72%	1.19%

Значения индексов разнообразия Шеннона и Симпсона оказались довольно высокими для микробиомов мидий из всех исследуемых районов, за исключением п. Старка (табл. 2). При проведении дисперсионного анализа (ANOVA) между образцами кишечного микробиома не наблюдалось существенных различий ($p > 0.05$).

В желудочно-кишечном тракте исследуемых животных были обнаружены представители 7 филумов, из них только *Proteobacteria* оказался в моллюсках из всех районов. При этом представленность данного филума сильно варьировала в образцах (табл. 3).

Структура бактериального сообщества мидий из б. Аякс на уровне семейств была представлена следующими таксонами: неклассифицированными *Pseudomonadales uncultured* (18%), *Rhodobacteraceae* (14.8%), *Sphingomonadaceae* (10.9%), *Pseudomonadaceae* (9%), *Comamonadaceae* (7.7%), *Propionibacteriaceae* (6.9%), *Corynebacteriaceae* (6.3%) и неклассифицированными *Chlamydiales uncultured* (5.8%).

В микробиоме мидий из п. Старка доминирующими семействами были *Bacillaceae* – 57.3% и *Paenibacillaceae* – 19%. Остальные таксоны были не так многочисленны: *Chitinophagaceae* – 9.4%, *Comamonadaceae* – 2.2%, *Sphingomonadaceae* – 1.8%. Особенностью микробиома моллюсков этого района стало присутствие *Weeksellaceae* – 2.9% и *Pseudoalteromonadaceae* – 1.7%.

В пищеварительной системе моллюсков из з. Восток основное разнообразие составили бактерии семейств *Comamonadaceae* – 33.8%, *Chitino-*

phagaceae – 10.4%, *Sphingomonadaceae* – 10.3%, *Aerococcaceae* – 8.2%, *Bacillaceae* – 6.2%, *Pseudomonadaceae* – 6.2%, *Actinomycetaceae* – 4.2%. Оставшиеся 20.7% таксономического разнообразия составили представители 13 семейств.

В микробиоме мидий из б. Матросской доминирующими семействами стали *Pseudomonadaceae* – 23.7%, *Rhizobiales Incertae Sedis* – 22.2%, *Chitinophagaceae* – 12.6% и *Sphingomonadaceae* – 7.2%. Минорная часть сообщества была представлена *Moraxellaceae*, *Actinomycetaceae*, *Micrococcaceae*, *Nitrosomonadaceae*, *Polyangia*, *Comamonadaceae*, *Brevibacteriaceae*, *Caulobacteraceae*, *Alcaligenaceae*, *Sphingobacteriales env.OPS 17*, *Nocardiaceae*.

На уровне семейств общими для всех образцов оказались представители *Comamonadaceae* и *Sphingomonadaceae*.

На уровне родов все исследуемые образцы отличались уникальным таксономическим составом: доминирующими в структуре микробиома моллюсков из б. Аякс были некультивируемые рода порядка *Pseudomonadales* – 18.4%, *Haemobacter* – 14.8%, *Sphingomonas* – 10.9%, из п. Старка – *Bacillus* (57.3%) и *Paenibacillus* (19%), из б. Восток – *Alicyciphilus* (27.4%), *Sediminibacterium* (10.4%) и *Sphingomonas* (10.3%), а из б. Матросская – *Pseudomonas* – 23.7%, *Phreatobacter* – 22.2% и *Sediminibacterium* – 12.6% (рис. 2).

Согласно многочисленным научным исследованиям, состав микробиоты двустворчатых моллюсков существенно зависит от целого ряда факторов: вида гидробионта и его генетических особенностей, стадии его развития, типа органа или

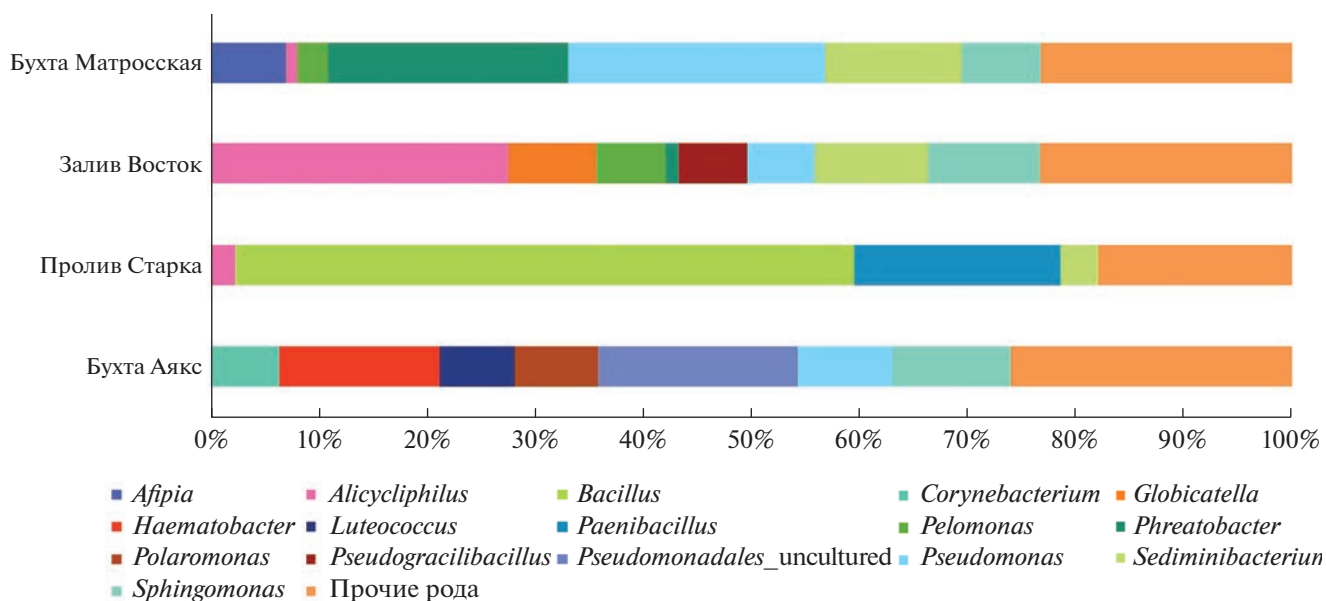


Рис. 2. Рода бактерий, выявленные в микробиоме пищеварительной системы *Crenomytilus grayanus* на основе метабар-кодинга. На рисунке показаны рода, представленность которых составила более 6%.

ткани, физико-географических особенностей района обитания, времени года, температуры, концентрации растворенного кислорода в воде, питания, наличия в среде поллютантов и т.п. (Paillard et al., 2022). Тем не менее, есть ряд работ, где авторам удалось выявить ядро микробиома, состав которого остается стабильным на протяжении длительного времени или под действием изменяющихся условий среды. Так, например, *Spirochaetaceae*, *Vulcaniibacterium* и *Delftia* названы в качестве ядра микробиома пищеварительной системы тихоокеанской устрицы *Crassostrea gigas* (King et al., 2020), *Mycoplasmataceae* и *Spirochaetaceae* – основа микробиома для венеруписа филиппинского *Ruditapes philippinarum* (Offret et al., 2021), а *Peptostreptococcaceae*, *Pirellulaceae* и *Mollisutes* – ядро микробиома для черногубой жемчужной устрицы *Pinctada margaritifera* (Dube et al., 2019).

Наши исследования показали, что особенностью микробиома мидий из п. Старка стало его низкое биоразнообразие на фоне доминирования бактерий родов *Bacillus* и *Paenibacillus*. Эти группы микроорганизмов характеризуются широкими метаболическими возможностями, а на основе *Bacillus* созданы многие пробиотические препараты для аквакультуры, благодаря их способности к синтезу антимикробных веществ в отношении большинства известных возбудителей инфекционных заболеваний (Lee et al., 2021).

Bacillus и *Paenibacillus* были обнаружены только у мидий из п. Старка, в том время, как в составе микробиомов гидробионтов из других исследуемых акваторий доминировали, в основном,

представители семейства *Pseudomonadaceae*. В научной литературе есть сведения об антагонистических отношениях представителей *Bacillus* и *Pseudomonas*, занимающих одинаковые экологические ниши (Simoes et al., 2008). При изучении дальневосточного трепанга *Apostichopus japonicus* было показано, что среди культивируемых бактерий микробиоты гидробионтов из разных акваторий Японского моря доминировали либо *Bacillus*, либо *Pseudomonas*. При этом ферментативная активность обеих групп бактерий имела схожие значения, что, вероятно, предполагает одинаковый вклад этих микроорганизмов в пищеварительный процесс хозяина (Богатыренко, Бузалева, 2016).

Использование молекулярной идентификации позволило обнаружить в микробиоте *Crenomytilus grayanus* из прибрежных вод Японского моря представителей таксонов, характерных для антропогенного загрязнения. Так, существенную долю в структуре бактериальных сообществ мидий из б. Аякс заняли представители *Rhodobacteraceae* и *Corynebacteriaceae*, среди которых, помимо типичных водных обитателей, часто встречаются активные деструкторы углеводов нефти. Также в пищеварительном тракте мидий из этого района были выявлены бактерии-внутриклеточные паразиты, относящиеся к порядку *Chlamydiales*. Известно, что эти микроорганизмы поражают цитоплазму клеток эпителия пищевого дивертикула двусторчатых моллюсков, что приводит к нарушению метаболизма и к гибели животных (Getchell et al., 2016). В микробиоме мидий из п. Старка были обнаружены бактерии рода *Asini-*

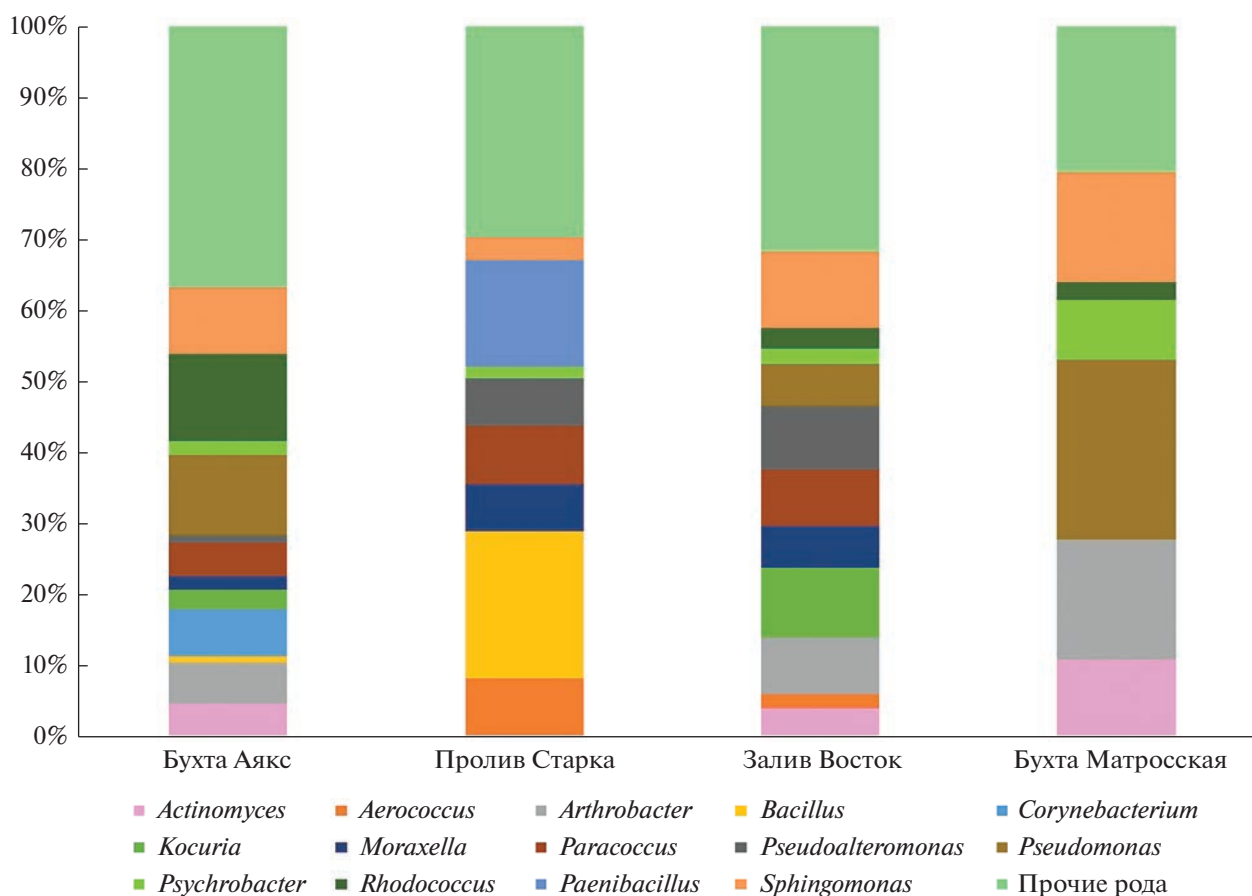


Рис. 3. Рода культивируемых бактерий, выделенных из пищеварительной системы *Crenomytilus grayanus*. На рисунке показаны рода, представленность которых составила более 6%.

bacterium, которые характерны для грунтов, загрязненных тяжелыми металлами в высоких концентрациях (Brzoska et al., 2022).

В образцах мидий из п. Старка и з. Восток были обнаружены таксоны бактерий, характерные для неочищенных коммунально-бытовых стоков. Так, в микробиоме животных из п. Старка встречались бактерии рода *Cloacibacterium*, а из з. Восток – условно-патогенные бактерии рода *Globicatella*, вызывающие у человека менингит и бактериемию. Вместе с тем, в образцах животных из фонового района не были обнаружены таксоны, указывающие на антропогенную нагрузку.

Прибрежные акватории северной части Японского моря испытывают хроническое загрязнение тяжелыми металлами, нефтепродуктами, фенолами, пестицидами, коммунально-бытовыми стоками (Барышева и соавт., 2019; Мощенко и соавт., 2020), что, судя по полученным нами результатам, оказывает влияние на состав бактериальных сообществ пищеварительной системы мидий Грея в исследуемом районе.

Исследование биоразнообразия культивируемых гетеротрофных бактерий. В ходе исследования из

образцов пищеварительной системы мидии Грея на среде СММ была получено 411 штаммов культивируемых гетеротрофных бактерий (34 рода бактерий), из них из б. Аякс – 106, п. Старка – 121, з. Восток – 101 и б. Матросская – 83 (рис. 3).

Из мидий з. Восток по количеству выделенных изолятов доминировали представители родов *Sphingomonas* – 11 штаммов, *Kocuria* – 10 штаммов, *Pseudoalteromonas* – 9 штаммов, *Paracoccus* и *Arthrobacter* – по 8 штаммов.

Из образцов б. Матросской чаще всего выделялись бактерии родов *Pseudomonas* – 21 штамм, *Arthrobacter* – 14 штаммов, *Sphingomonas* – 13 штаммов, *Actinomyces* – 9 штаммов, *Psychrobacter* – 7 штаммов. Стоит отметить, что для микробиома восточной устрицы *Crassostrea virginica* также было характерно доминирование *Pseudomonas* и *Psychrobacter* наравне с *Synechococcus* (Pathak et al., 2021).

Кишечная микрофлора животных из п. Старка характеризовалась большим количеством представителей рода *Bacillus* – 25 штаммов, *Paenibacillus* – 18 штаммов, а также *Aerococcus* и *Paracoccus* – по 10 штаммов.

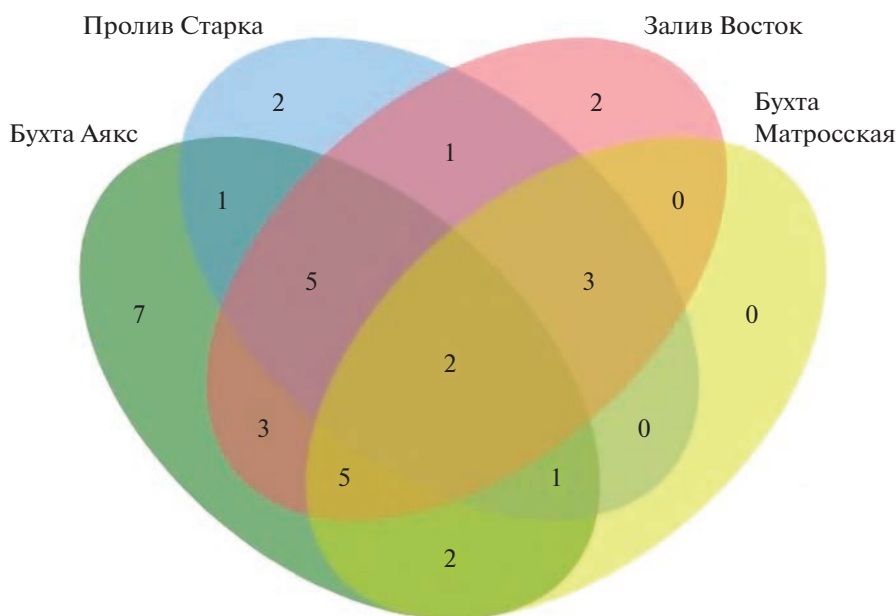


Рис. 4. Диаграмма Венна, отражающая разнообразие культивируемых бактерий на уровне родов, выделенных из пищеварительной системы *Crenomytilus grayanus*.

В работе, посвященной изучению ассоциантов мидии *Crenomytilus grayanus* из б. Троица (залив Петра Великого, Японское море), были получены схожие результаты: 30.6% от общего бактериального разнообразия желудка моллюска было представлено родом *Bacillus* (Иванова и соавт., 1992). Высокая доля этих бактерий может быть обусловлена их способностью к споруляции, которая обеспечивает им выживаемость в кишечнике мидий за счет устойчивости к пищеварительным ферментам и условиям с низкими значениями pH (Pandiyana et al., 2013). Уникальным для микробиоты мидий Грея этого п. Старка стали штаммы бактерий рода *Paenibacillus*, некоторые представители которых, согласно литературным данным, улучшают рост гидробионтов, иммунную и антиоксидантную активность, а также обеспечивают устойчивость к патогенным вибрионам (Amoah et al., 2020).

В пищеварительной системе мидии Грея из б. Аякс по количеству полученных изолятов доминировали бактерии рода *Rhodococcus* – 13 штаммов, *Pseudomonas* – 12 штаммов, *Sphingomonas* – 10 штаммов, *Corynebacterium* – 7 штаммов. В образцах только из этого района были выявлены условно-патогенные бактерии родов *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus* и *Yersinia*. Выявление подобных потенциально опасных бактерий свидетельствует о неблагоприятном санитарно-эпидемиологическом состоянии исследуемой акватории, что вызвано хроническим загрязнением бухты городскими коммунально-бытовыми стоками и значительной рекреационной нагрузкой в летний период. Не-

смотря на то, что условно-патогенная микрофлора не доминировала в биоценозе, она все же смещала равновесие в сторону увеличения несвойственной гидробионту микробиоты. Ранее при исследовании других видов мидий из районов с высокой антропогенной нагрузкой в тканях животных также были обнаружены такие патогенные микроорганизмы, как *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Vibrio parahaemolyticus* (Cavallo et al., 2009; Rubiolo et al., 2019), вирус гепатита А и норовирусы (Schradler et al., 2003). Интересно отметить, что только из мидии б. Аякс был получен 1 штамм рода *Vibrio*, хотя вибрионы широко распространены в морской среде и часто выявляются в микрофлоре разных видов двустворчатых моллюсков (Moriarty, 1998; Motiei, 2014; Rubiolo et al., 2019).

При сравнении биоразнообразия культивируемых гетеротрофных бактерий из мидий Грея исследуемых районов с помощью диаграммы Венна (рис. 4) и коэффициента Жаккара (K_j) было установлено, что микробиом животных каждой акватории характеризуется своим набором бактериальных таксонов. Наибольшие значения коэффициента сходства были получены для гидробионтов из б. Аякс и з. Восток ($K_j = 0.46$) и для гидробионтов из з. Восток и п. Старка ($K_j = 0.44$), наименьшие значения оказались для пар выборок из б. Матросская и п. Старка ($K_j = 0.27$) и для п. Старка и б. Аякс ($K_j = 0.28$).

Настоящее исследование показало, что кишечный микробиом мидий Грея характеризуется уникальным таксономическим составом в зависимости от района обитания животных. Получен-

ные результаты указывают на существенное влияние окружающей среды на формирование симбионтной микрофлоры двустворчатого моллюска.

Вместе с тем, проведенный анализ показал, что для животных из всех районов было характерно присутствие представителей родов *Psychrobacter* и *Sphingomonas*. Вероятно, эти группы микроорганизмов относятся к автохтонной микробиоте моллюсков, и могут выполнять для них ряд полезных функций.

Так, например, есть сведения, что бактерии рода *Sphingomonas* ингибируют патогенных *Vibrio anguillarum* и способны положительно влиять на рост, выживаемость и биохимические показатели мальков рыб (Chaudhary et al., 2021). Также немало работ о пробиотическом потенциале некоторых штаммов *Psychrobacter* spp. для искусственного воспроизводства креветки *Exopalaemon carinicauda* (Lai et al., 2022), атлантической трески *Gadus morhua* (Lazado et al., 2010), групера *Epinephelus coioides* (Liu et al., 2021) и сериолы *Seriola lalandi* (Ramírez et al., 2020).

Также в пищеварительной системе мидий Грея были многочисленны *Actinomyces*, которые известны как продуценты огромного спектра вторичных метаболитов, в том числе, с выраженным антимикробным эффектом (Cera et al., 2022).

В животных из всех районов, кроме п. Старка, часто встречались представители рода *Arthrobacter*, которые могут относиться к индигенной микрофлоре гидробионтов. У некоторых видов *Arthrobacter*, выделенных из морской среды описаны пробиотические свойства, например, способность к синтезу антибиотиков. Показано, что штамм *Arthrobacter* ХЕ-7 положительно влияет на микробиоту кишечника и иммунитет у тихоокеанских белых креветок, а также обладает антагонистической активностью по отношению к *Vibrio parahaemolyticus* (Li et al., 2006). Штамм *Arthrobacter davidanieli* показал свою эффективность при лечении заболеваний у лососевых рыб, вызванных *Renibacterium salmoninarum* и *Piscirickettsia salmonis* (Salonius et al., 2004).

Из мидий всех районов, кроме б. Матросская, было получено большое количество штаммов *Paracoccus*, которые, по данным литературы, являются симбионтами насекомых, кораллов и мшанок, а также обладают антибактериальными, альгицидными и фунгицидными свойствами по отношению к таким микроорганизмам как *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Prorocentrum donghaiense*, *Candida albicans* (Leinberger et al., 2021).

Из мидий з. Восток было выделено 10 штаммов рода *Kocuria*, среди представителей которого, согласно научной литературе, немало патогенных видов. Однако есть сведения о высокой активности этих микроорганизмов в разложении широ-

кого спектра ксенобиотиков, а также о возможности их использования для профилактики и лечения вибриозов у радужной форели, вызванных *Vibrio anguillarum* и *V. ordalii* (Sharifuzzaman, Austin, 2010).

Уникальными для микробиома моллюсков из п. Старка стали штаммы *Alteromonas* spp. В исследовании личиночных стадий *Mytilus galloprovincialis* обнаружено, что биопленки альтеромонад ответственны за индукцию метаморфоза личиночных стадий этого вида моллюска (Bao et al., 2007).

Вероятно, уникальный для мидий каждого района состав микробиома обеспечивает адаптацию животных к индивидуальным условиям окружающей среды.

Исследование метаболических особенностей полученных штаммов бактерий. По результатам исследований установлено, что большинство полученных штаммов бактерий были способны к расщеплению широкого спектра органических субстратов (рис. 5). При анализе не выявлено статистически значимых различий в способности разлагать простые сахара и аминокислоты у бактерий, выделенных от моллюсков из разных районов (критерий Шапиро–Уилка – $p > 0.05$, ANOVA – $F < F_{крит}$). Таким образом, несмотря на различия в таксономическом составе микробиоты мидий из разных акваторий обладают схожими ферментативными свойствами и, вероятно, выполняют одинаковые функции для организма хозяина.

К утилизации сложных органических субстратов, которые в огромном количестве встречаются в морской среде (хитин, хитозан, альгинат, фукоидан, коллаген, хондроитин сульфат), было способно меньшее количество исследуемых штаммов (рис. 5). Одновременно с этим замечено, что доля микроорганизмов, использующих данные соединения в качестве единственного источника углерода, достоверно выше в мидиях из фонового района: б. Матросская (критерий Шапиро–Уилка – $p > 0.05$, ANOVA – $F > F_{крит}$, критическое значение теста Шеффе – $p < 0.05$). Стоит предположить, что антропогенное загрязнение влияет не только на биоразнообразие, но и на функциональные особенности симбионтной микрофлоры двустворчатых моллюсков. Антропогенный пресс может как сокращать количество автохтонной микробиоты, способной к разложению подобных субстратов, так и влиять на ее активность. В работе А.В. Ким (Ким, 2022) показано, что антропогенное загрязнение приводит к уменьшению в микробных ценозах поверхностных морских вод доли бактерий-деструкторов хитина и его производных, клетчатки, альгината натрия и фукоидана, а также к снижению скорости утилизации бактериями этих соединений. Полученные результаты автор связал с адаптацией микробных сообществ загрязненных территорий к потребле-

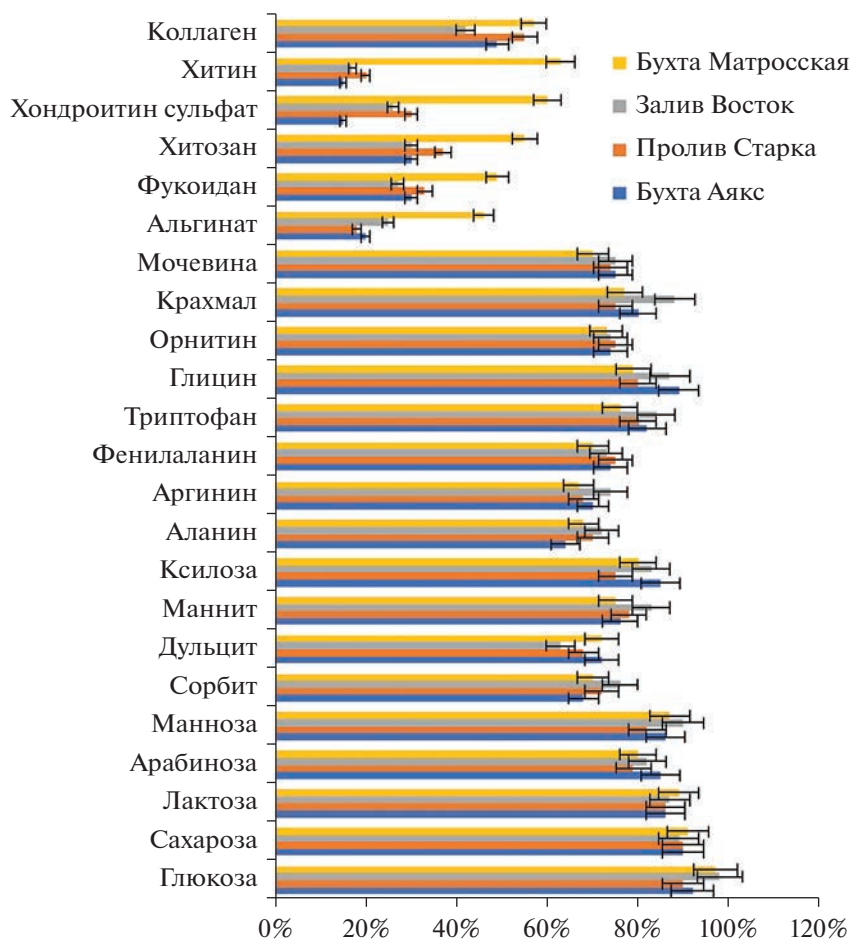


Рис. 5. Доля штаммов бактерий, проявивших способность к разложению органических субстратов.

нию легкоразлагаемой органики, постоянно поступающей в среду вместе с хозяйственно-бытовыми, промышленными и речными стоками, балластными водами. Длительное существование в подобных условиях могло привести к утрате или снижению гидролитической активности в отношении полисахаридов у автохтонной микробиоты (Ким, 2022).

Из литературных источников известно, что ряд прибрежных акваторий Приморского края испытывают хроническое антропогенное загрязнение различными поллютантами (Барышева и соавт., 2019; Мощенко и соавт., 2020). В связи с этим, нами была проанализирована способность полученных штаммов бактерий расти на средах с нефтью и нефтяными углеводородами (гексадекан, бензол, ксилол, толуол, нафталин), пестицидом (атразин) и пластификатором (бисфенол А) в качестве единственного источника углерода.

По результатам исследований рост на минеральной среде с нефтью продемонстрировали 54 штамма бактерий (13%) из моллюсков б. Аякс, з. Восток и п. Старка. Большинство активных штам-

мов было представлено родами *Kocuria*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, которые, согласно литературным данным, относятся к наиболее распространенным таксонам деструкторов углеводов нефти, в том числе, характерным для вод Японского моря (Vogatyrenko et al., 2021).

Способность к окислению гексадекана проявили все 54 штамма бактерий, выросших на среде с нефтью (13% штаммов коллекции) (рис. 6). Разложение соединений ароматического ряда было доступно меньшему количеству микроорганизмов. Так, ксилол расщепляли 46 штаммов бактерий (11.2%), бензол – 45 (11%), толуол – 42 (10.2%) и нафталин – 35 штаммов (8.5%) (рис. 6).

Можно предположить, что в природных условиях указанные микроорганизмы могут участвовать в детоксикации моллюсков от губительного действия углеводов нефти. К подобным выводам пришли авторы исследования, в котором было показано, что добавление в течение 14 дней в среду с молодой дальневосточного трепанга *Apostichopus japonicus* бензпирена сокращает в

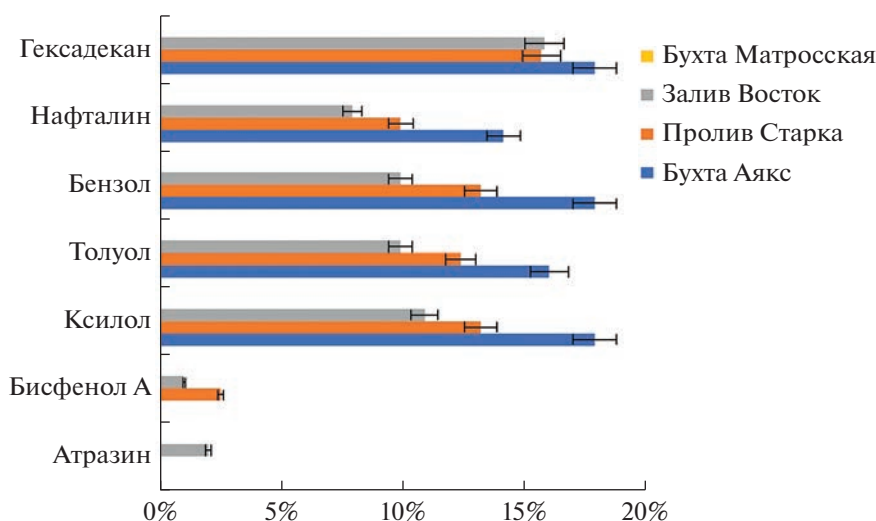


Рис. 6. Доля штаммов бактерий, способных к деструкции ксенобиотиков.

микробиоме голотурии численность автохтонных бактерий (*Lactococcus*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc* и *Weissella*) и резко увеличивает количество углеводородокисляющих микроорганизмов (*Lutibacter*, *Pseudoalteromonas*, *Polaribacter*, *Rhodopirellula* и *Blastopirellula*) (Zhao et al., 2019).

Бисфенол А относится к наиболее распространенным микрополлютантам, который способен вызывать метаболические и репродуктивные нарушения у человека. В последние годы доказано, что он представляет опасность не только для людей, но и для морских обитателей. В одной из научных работ показано, что бисфенол А и его аналоги способны изменять микробиом личинок мидий *Mytilus galloprovincialis* (Balbi et al., 2020). Применение поллютантов привело к увеличению в структуре микробиома моллюска доли потенциальных патогенов (*Vibrio*, *Arcobacter* и *Tenacibaculum*) и бактерий, участвующих в биотрансформации ксенобиотиков (*Oleispira* и *Shewanella*).

В наших исследованиях утилизацию бисфенола А показали 4 штамма — *Bacillus* sp. СтМ5, *Bacillus* sp. СтМ11, *Bacillus* sp. СтМ24 из п. Старка и *Sphingomonas* sp. ВтМ13 из з. Восток. Степень деструкции бисфенола через 5 сут составила 52 ± 2.1 , 37 ± 1.5 , 41 ± 1.9 и $45 \pm 2.3\%$ соответственно. Разлагающие бисфенол А штаммы *Bacillus* и *Sphingomonas* ранее неоднократно выделялись из различных сред многими авторами (López-Moreno et al., 2021; de Moraes Farias, Krepsky, 2022). Установлено, что ключевую роль в разложении бисфенола играет система монооксигеназы цитохрома P450, ферредоксин, ферредоксинредуктаза и лакказы, которые встречаются у бактерий этих родов.

Показано, что воздействие на устриц *Crassostrea virginica* атразина, распространенного в сель-

скохозяйственной практике гербицида, приводит к значительной потере ключевых видов мутуалистических бактерий и последующей колонизации патогенными *Nocardia* (Britt et al., 2020).

В наших исследованиях способность к деструкции атразина была обнаружена у двух штаммов бактерий, выделенных из зал. Восток. На 12 сут эксперимента зона окисления поллютанта на чашках с *Arthrobacter agilis* ВтМ7 составила 30 ± 2.4 мм, а с *Rhodococcus* sp. ВтМ19 — 26 ± 3.1 мм, что указывало на довольно высокую дегидрогеназную активность микроорганизмов. И, хотя родококки известны своей способностью к утилизации многих ксенобиотиков, в литературе наиболее широко описан механизм полного разложения атразина на углекислый газ и аммиак у представителей рода *Arthrobacter* (Abd Rani et al., 2022). Известно, что у *Arthrobacter agilis* гены *atzA/trzN* кодируют атразинхлоргидролазу, катализирующую дехлорирование атразина (Mili et al., 2022). Полученный нами вид широко распространен в почвах, крайне устойчив к изменениям окружающей среды, а также разлагает многие виды загрязнителей.

Таким образом, полученные нами результаты могут быть использованы для дальнейшей детальной оценки вклада микробиома мидии Грея в симбионтное пищеварение и детоксикацию моллюска.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке ДВФУ (Программа стратегического академического лидерства “Приоритет-2030”: Мировой океан, проект № 22-05-1.06-0012).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Барышева В.С., Чернова Е.Н., Патрушева О.В. Загрязнение морской среды залива Восток Японского моря органическими веществами (2016–2018 гг.) // Вестник Дальневосточного отделения Российской академии наук. 2019. № 2 (204). С. 87–94.
- Беленёва И.А., Жукова Н.В., Масленникова Э.Ф. Сравнительное изучение структуры микробных сообществ мидии *Mytilus trossulus* из культивируемой и природной популяций залива Петра Великого // Микробиология. 2003. Т. 72. С. 528.
- Beleneva I.A., Zhukova N.V., Maslennikova E.F. Comparative study of microbial communities from cultured and natural populations of the mussel *Mytilus trossulus* in Peter the Great Bay // Microbiology (Moscow). 2003. V. 72. P. 472–477.
- Богатыренко Е.А., Бузолёва Л.С. Характеристика бактериального сообщества кишечника дальневосточного трепанга *Apostichopus japonicus* // Микробиология. 2016. Т. 85. 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.
- Журавель Е.В., Христофорова Н.К., Дроздовская О.А., Токарчук Т.Н. Оценка состояния вод залива Восток (залив Петра Великого, Японское море) по гидрохимическим и микробиологическим показателям // Изв. Самарского научного центра Российской академии наук. 2012. Т. 14. № 1–9. С. 2325–2329.
- Иванова Е., Киприанова Е., Аминин Д., Михайлов В., Агафонова И. Биологическая активность микроорганизмов – ассоциантов мидии *Crenomytilus grayanus* // Biotechnology & Biotechnological Equipment. 1992. Т. 6. С. 25–30.
- Ким А.В. Влияние антропогенного загрязнения на таксономическое разнообразие и биологические свойства культивируемых бактерий акваторий Приморского края. Автореферат дис. ... канд. биол. наук, 15.06.2022. Владивосток: ФНИЦ биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии ДВО РАН, 22 с.
- Коженкова С.И., Христофорова Н.К. Распределение зеленых водорослей-макрофитов в Амурском заливе (Японское море) // Известия ТИНРО. 2009. Т. 159. С. 156–167.
- Моценко А.В., Белан Т.А., Лишавская Т.С., Севастьянов А.В., Борисов Б.М. Многолетняя динамика концентраций приоритетных поллютантов и общего уровня химического загрязнения прибрежных акваторий Владивостока (залив Петра Великого Японского моря) // Известия ТИНРО. 2020. Т. 200. С. 377–400.
- Моценко А.В., Шайхлисламова Л.Е. Экологическое состояние восточной части пролива Босфор Восточный (залив Петра Великого Японского моря) // Известия ТИНРО. 2010. Т. 161. С. 199–211.
- Amoah K., Huang Q.C., Dong X.H., Tan B.P., Zhang S., Chi S.Y., Yang Q., Liu H., Yang Y.Z. *Paenibacillus polymyxa* improves the growth, immune and antioxidant activity, intestinal health, and disease resistance in *Litopenaeus vannamei* challenged with *Vibrio parahaemolyticus* // Aquaculture. 2020. V. 518. Art. 734563.
- Balbi T., Vezzulli L., Lasa A., Pallavicini A., Canesi L. Insight into the microbial communities associated with first larval stages of *Mytilus galloprovincialis*: possible interference by estrogenic compounds // Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol. 2020. V. 237. Art. 108833.
- Bao W.Y., Yang J.L., Satuito C.G., Kitamura H. Larval metamorphosis of the mussel *Mytilus galloprovincialis* in response to *Asteromonas* sp. 1: evidence for two chemical cues? // Marine Biol. 2007. V. 152. P. 657–666.
- Beleneva I.A., Zhukova N.V. Seasonal dynamics of cell numbers and biodiversity of marine heterotrophic bacteria inhabiting invertebrates and water ecosystems of the Peter the Great Bay, Sea of Japan // Microbiology (Moscow). 2009. V. 78. P. 369–375.
- Bezgachina T.V., Kozitskiy A.N. Concerning the sanitary and microbiological tests of mussels from the White Sea // Current Problems of Physiology and Biochemistry Of Aquatic Organisms. Collected Scientific Papers of the First International Seminar and PhD Workshop (6–9 September 2010, Petrozavodsk, Republic of Karelia, Russia). 2010. P. 12.
- Bogatyrenko E.A., Dunkai T.I., Buzoleva L.S., Kim A.V. Influence of Vladivostok coastal waters pollution on a microflora of mussel *Crenomytilus grayanus* // IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science. 2018. V. 107. Art. e012052.
- Bogatyrenko E.A., Kim A.V., Dunkai T.I., Ponomareva A.L., Es'kova A.I., Sidorenko M.L., Okulov A.K. Taxonomic diversity of culturable hydrocarbon-oxidizing bacteria in the Sea of Japan // Russ. J. Marine Biol. 2021. V. 47. P. 232–239.
- Britt A., Bernini M., McSweeney B., Dalapati S., Duchin S., Cavanna K., Santos N., Donovan G., O'Byrne K., Noyes S., Romero M., Poonacha K.N.T., Scully T. The effects of atrazine on the microbiome of the eastern oyster: *Crassostrea virginica* // Sci. Rep. 2020. V. 10. Art. 11088.
- Brzoska R.M., Edelmann R.E., Bollmann A. Physiological and genomic characterization of two novel *Bacteroidota* strains *Asinibacterium* spp. OR43 and OR53 // Bacteria. 2022. V. 1. P. 33–47.
- Cavallo R.A., Acquaviva M.I., Stabili L. Culturable heterotrophic bacteria in seawater and *Mytilus galloprovincialis* from a Mediterranean area (Northern Ionian Sea–Italy) // Environ. Monitor. Assess. 2009. V. 149. P. 465–475.
- Chaudhary A., Ahmad Q.U.A., Akram A.M., Iqtedar M., Qazi J.I. Effect of *Sphingomonas* sp., as a probiotic on survival, growth and biochemical constituents of *Vibrio anguillarum* challenged *Labeo rohita* fingerlings // Pakistan J. Zool. 2021. V. 53. <https://doi.org/10.17582/journal.pjz/20181009061048>
- de Moraes Farias J., Krepsky N. Bacterial degradation of bisphenol analogues: an overview // Environ. Sci. Pollut. Res. Int. 2022. V. 29. P. 76543–76564.

- Dubé C.E., Ky C.L., Planes S. Microbiome of the black-lipped pearl oyster *Pinctada margaritifera*, a multi-tissue description with functional profiling // *Front. Microbiol.* 2019. V. 10. Art. 1548.
- Getchell R.G., Smolowitz R.M., McGladdery S.E., Bower S.M. Diseases and parasites of scallops // *Develop. Aquacult. Fisher. Sci.* 2016. V. 40. P. 425–467.
- Hanson K.G., Desai J.D., Desai A.J. A rapid and simple screening technique for potential crude oil degrading microorganisms // *Biotechnol. Techniq.* 1993. V. 7. P. 745–748.
- Harris J.M. The presence, nature, and role of gut microflora in aquatic invertebrates: a synthesis // *Microb. Ecol.* 1993. V. 25. P. 195–231.
- Ingale S., Patel K., Sarma H., Joshi S.J. Bacterial biodegradation of bisphenol A (BPA) // *Biotechnology for Sustainable Environment* / Eds. Joshi S.J., Deshmukh A., Sarma H. Singapore: Springer, 2021. P. 95–110. https://doi.org/10.1007/978-981-16-1955-7_4
- King W.L., Siboni N., Kahlke T., Dove M., O'Connor W., Mahbub K.R., Jenkins C., Seymour J.R., Labbate M. Regional and oyster microenvironmental scale heterogeneity in the Pacific oyster bacterial community // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2020. V. 96. P. fiae054.
- Lai X., Chen J., Liang S., Chen H., Liu S., Gao H. Effects of the probiotic *Psychrobacter* sp. B6 on the growth, digestive enzymes, antioxidant capacity, immunity, and resistance of *Exopalaemon carinicauda* to *Aeromonas hydrophila* // *Probiot. Antimicr. Prot.* 2022. <https://doi.org/10.1007/s12602-022-09919-3>
- Lane D.J., Pace B., Olsen G.J., Stahl D.A., Sogin M.L., Pace N.R. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1985. V. 82. P. 6955–6959.
- Lazado C.C., Caipang C.M.A., Rajan B., Brinchmann M.F., Kiron V. Characterization of GP21 and GP12: two potential probiotic bacteria isolated from the gastrointestinal tract of Atlantic cod // *Probiot. Antimicr. Prot.* 2010. V. 2. P. 126–134.
- Lee C., Kim S., Shin J., Kim M.-G., Gunathilaka B.E., Kim S.H., Kim J.E., Ji S.-C., Han J.E., Lee K.-J. Dietary supplementations of *Bacillus* probiotic improve digestibility, growth performance, innate immunity, and water ammonia level for Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* // *Aquacult. Int.* 2021. V. 29. P. 2463–2475.
- Leinberger J., Holste J., Bunk B., Freese H.M., Spröer C., Dlugosch L., Kück C., Schulz S., Brinkhoff T. High potential for secondary metabolite production of *Paracoccus marcusii* CP157, isolated from the crustacean cancer pagurus // *Front. Microbiol.* 2021. V. 12. Art. 688754.
- Li J., Tan B., Mai K., Ai Q., Zhang W., Xu W., Ma H. Comparative study between probiotic bacterium *Arthrobacter* XE-7 and chloramphenicol on protection of *Penaeus chinensis* post-larvae from pathogenic vibrios // *Aquaculture.* 2006. V. 253. P. 140–147.
- Li Y.F., Yang N., Liang X., Yoshida A., Osatomi K., Power D., Batista F.M., Yang J.L. Elevated seawater temperatures decrease microbial diversity in the gut of *Mytilus coruscus* // *Front. Physiol.* 2018. V. 9. Art. 839.
- Liu Z.Y., Yang H.L., Hu L.H., Yang W., Ai C.X., Sun Y.Z. Autochthonous probiotics alleviate the adverse effects of dietary histamine in juvenile grouper (*Epinephelus coioides*) // *Front. Microbiol.* 2021. V. 12. Art. 792718.
- López-Moreno A., Torres-Sánchez A., Acuña I., Suárez A., Aguilera M. Representative *Bacillus* sp. AM1 from gut microbiota harbor versatile molecular pathways for Bisphenol A biodegradation // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. Art. 4952.
- Mikhailov I.S., Zakharova Y.R., Bukin Y.S., Galachyants Y.P., Petrova D.P., Sakirko M.V., Likhoshway Y.V. Co-occurrence networks among bacteria and microbial eukaryotes of Lake Baikal during a spring phytoplankton bloom // *Microb. Ecol.* 2019. V. 77. P. 96–109.
- Moriarty D.J.W. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds // *Aquaculture.* 1998. V. 164. P. 351–358.
- Motiei A. *Mytilus edulis* associated bacteria diversity and interactions based on bioactive molecules. Doctoral diss. Christian-Albrechts-Universität Kiel, 2014. 54 p.
- Offret C., Paulino S., Gauthier O., Château K., Bidault A., Corporeau C., Miner P., Petton B., Pernet F., Fabioux C., Paillard C., Le Blay G. The marine intertidal zone shapes oyster and clam digestive bacterial microbiota // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2020. V. 96. Art. fiae078.
- Paillard C., Gueguen Y., Wegner K.M., Bass D., Pallavicini A., Vezzulli L., Arzul I. Recent advances in bivalve-microbiota interactions for disease prevention in aquaculture // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2022. V. 73. P. 225–232.
- Pandiyani P., Balaraman D., Thirunavukkarasu R., George E.G.J., Subaramaniyan K., Manikkam S., Sadayappan B. Probiotics in aquaculture // *Drug Invention Today.* 2013. V. 5. P. 55–59.
- Pathak A., Stothard P., Chauhan A. Comparative genomic analysis of three *Pseudomonas* species isolated from the eastern oyster (*Crassostrea virginica*) tissues, mantle fluid, and the overlying estuarine water column // *Microorganisms.* 2021. V. 9. Art. 490.
- Ramírez C., Rojas R., Romero J. Partial evaluation of autochthonous probiotic potential of the gut microbiota of *Seriola lalandi* // *Probiot. Antimicr. Prot.* 2020. V. 12. P. 672–682.
- Rubiolo J.A., Botana L.M., Martinez P. Insights into mussel microbiome // *Microbial Communities in Aquaculture Ecosystems* / Ed. Derome N. 1st ed. Cham: Springer Int. Publ., 2019. P. 95–120.
- Salonius K., Siderakis C., MacKinnon A.M., Griffiths S.G. Use of *Arthrobacter davidanieli* as a live vaccine against *Renibacterium salmoninarum* and *Piscirickettsia salmonis* in salmonids // *Developments in Biologicals.* 2004. V. 121. P. 189–197.
- Santisi S., Genovese M., Bonsignore M., Fiumara E., Maricchiolo G., Mancuso M., Genovese L., Giuliano L., Cappello S. Study of bacterial communities in mussel *Mytilus galloprovincialis* by 16S rDNA // *Int. J. Microbiol. Applicat.* 2015. V. 2. P. 18–24.
- Schrader C., Reetz J., Süß J. Food-borne human pathogenic viruses and their molecular detection with special consideration of noroviruses and hepatitis A virus in mussels // *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift.* 2003. V. 116. P. 496–505.
- Sharifuzzaman S.M., Austin B. *Kocuria* SM1 controls vibriosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) // *J. Appl. Microbiol.* 2010. V. 108. P. 2162–2170.
- Simoes M., Simões L.C., Pereira M.O., Vieira M.J. Antagonism between *Bacillus cereus* and *Pseudomonas fluorescens*

in planktonic systems and in biofilms // Biofouling. 2008. V. 24. P. 339–349.

Youchimizu M., Kimura T. Study of intestinal microflora of salmonids // Fish Pathol. 1976. V. 10. P. 243–259.

Zhao Y., Liu H., Wang Q., Li B., Zhang H., Pi Y. The effects of benzo [a] pyrene on the composition of gut microbiota and the gut health of the juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus* Selenka // Fish & Shellfish Immunol. 2019. V. 93. P. 369–379.

Biodiversity and Metabolic Properties of Bacterial Communities from the Digestive System of the Bivalve *Crenomytilus grayanus*

T. I. Dunkai^{1, 2}, E. A. Bogatyrenko^{1, *}, and A. V. Kim^{1, 3}

¹Far Eastern Federal University, Vladivostok, 690922 Russia

²Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, 690041 Russia

³Federal Scientific Center of the East Asia Terrestrial Biodiversity, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, 690022 Russia

*e-mail: bogatyrenko.ea@dyfu.ru

Received March 10, 2023; revised March 30, 2023; accepted March 30, 2023

Abstract—Biodiversity of the bacterial communities in the digestive system of *Crenomytilus grayanus* inhabiting the coastal Sea of Japan waters with chronic anthropogenic pollution was investigated using metabarcoding. Apart from marine bacteria, the taxa typical under contamination with oil (*Rhodobacteraceae*, *Corynebacteriaceae*), heavy metals (*Asinibacterium*), and unprocessed municipal waste (*Cloacibacterium*, *Globicatella*) were revealed in the microbiota. A collection of 411 cultured heterotrophic bacterial strains isolated in the course of this study was characterized taxonomically. The intestinal microbiome of the studied mollusks was shown to have a unique composition, depending on their habitat. Ability of bacterial strains isolated from the *C. grayanus* digestive system to degrade various nutrient substrates (sugars, amino acids, and polysaccharides) and xenobiotics (oil hydrocarbons, bisphenol A, and atrazine) was studied. Most isolates degraded a broad range of organic substrates; 13% (54 strains) oxidized oil hydrocarbons; 1% (4 strains) oxidized bisphenol A; and 0.5% (2 strains) degraded atrazine. The possible role of the microbiome *C. grayanus* microbiome in symbiotic digestion and in detoxication of the mollusk is discussed.

Keywords: *Crenomytilus grayanus*, microbiome, NGS, anthropogenic pollution, atrazine, bisphenol, hydrocarbons

АНАЛИЗ КЛЮЧЕВЫХ ДЕТЕРМИНАНТ БИОДЕГРАДАЦИИ НАФТАЛИНА В КЛЕТКАХ БАКТЕРИЙ *RHODOCOCCLUS PYRIDINIVORANS* 5Ar

© 2023 г. А. Ю. Ларченко^а, *, М. И. Мандрик^а

^аБелорусский государственный университет, Минск, 220030 Беларусь

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

Поступила в редакцию 06.01.2023 г.

После доработки 21.02.2023 г.

Принята к публикации 01.03.2023 г.

В результате исследования установлено, что бактерии *Rhodococcus pyridinivorans* 5Ar дикого типа являются высокоэффективными деструкторами нафталина и полностью утилизируют данное соединение в концентрации 500 мг/л в течение трех суток, что может быть использовано для очистки загрязненных нафталином водных экосистем. Инактивация генов биodeградации *narAa* (кодирует большую субъединицу нафталиндиоксигеназы) и *narB* (кодирует *cis*-нафталиндигидродиолдегидрогеназу) приводит к потере бактериями *R. pyridinivorans* 5Ar способности утилизировать нафталин в качестве единственного источника углерода. Это указывает на отсутствие в геноме исследуемых бактерий детерминант, обеспечивающих окисление нафталина по альтернативным путям. Помимо этого, инактивация гена *narB* приводит к накоплению в культуральной среде полярного окрашенного соединения (вероятно, продукта первичного окисления нафталина).

Ключевые слова: биodeградация нафталина, *Rhodococcus*, гены биodeградации, динамика роста, эффективность биodeградации, диоксигеназа

DOI: 10.31857/S0026365623600025, **EDN:** RIWQWF

Технологический прогресс и повсеместное развитие химической промышленности, в частности, нефтяной, активное применение нефтепродуктов и ряда потенциально опасных углеводородов приводит к глобальной загрязнению и наносит непоправимый ущерб окружающей среде. Полициклические ароматические углеводороды (ПАУ) относятся к одним из наиболее распространенных и токсичных среди поллютантов углеводородной природы и обладают не только канцерогенными и мутагенными свойствами, но и склонностью к биоаккумуляции (Хант, 1982). Пути их попадания в окружающую среду можно условно разделить на природные и антропогенные. К природным путям относятся такие явления, как лесные пожары и извержения вулканов, в то время как антропогенные факторы включают разливы нефти, сгорание топлива, каменноугольной смолы, бытовых отходов, а также отходов коксохимических производств (Haritash, 2009).

Несмотря на высокую токсичность и крайне низкую растворимость в воде, ПАУ могут служить источником углерода для некоторых микроорганизмов, в частности, для бактерий рода *Rhodococcus* (Кузюкина, 2010). Существует множество факторов, которые в той или иной степени оказывают влияние на скорость, эффективность

и продуктивность процесса биodeградации ПАУ (Vaidya, 2019). Для повышения степени доступности гидрофобных субстратов, в том числе ПАУ, бактерии продуцируют поверхностно-активные вещества (ПАВ) (Li, 2009). У родококков в биосинтезе этих соединений участвуют ферменты алканмонооксигеназы (Inaba, 2013). Помимо физико-химических свойств ПАУ, обуславливающих их низкую растворимость в воде, что затрудняет их разложение, есть еще ряд показателей, воздействующих на систему взаимодействия подобных субстратов и микроорганизмов (Сазыкин, 2009). Установлено, что с повышением концентрации поллютанта увеличивается и скорость его деградации, однако если концентрация слишком мала, т.е. ниже определенного порогового значения, то микроорганизмы могут игнорировать ксенобиотик как потенциальный субстрат, что проявляется в отсутствии каких-либо процессов его окисления. В то же время, если концентрация поллютанта слишком высока, то он может оказывать токсичное воздействие на микроорганизмы (Vaidya, 2019).

Бактерии рода *Rhodococcus* обладают повышенной устойчивостью к неблагоприятным и экстремальным условиям окружающей среды. Для них характерны психротрофия, гало-, ксеро-

и термотолерантность, устойчивость как к высоким, так и к низким значениям pH, а также резистентность к ксенобиотикам и ионам тяжелых металлов. Из этого следует, что применение бактерий данного рода в качестве деструкторов ПАУ и углеводородов нефти в целом, представляется возможным непосредственно *in situ* (Кузюкина, 2010).

Адаптация бактерий рода *Rhodococcus* к меняющимся и зачастую неблагоприятным условиям среды достигается благодаря стратегии гиперрекомбинации, ассоциированной с большим геномом, а также за счет особенностей клеточной физиологии и способности приобретать широкий круг различных катаболических генов. Большое количество детерминант катаболических путей обнаруживается в составе крупных линейных или кольцевых плазмид. К тому же для родококков характерно существование альтернативных путей катаболизма одного соединения и гомологичных генов, что еще более повышает катаболическое разнообразие и эффективность их как деструкторов (Larkin, 2005). В связи с этим крайне важным является исследование генетической организации бактерий-деструкторов и роли отдельных генетических детерминант в процессах биodeградации.

На сегодняшний день наиболее изучена генетическая организация оперона, включающего в себя гены нафталин-1,2-диоксигеназы, поскольку это ключевой и универсальный фермент на первых этапах биodeградации ПАУ. Гены составляют индуцируемый нафталином *nar*-кластер, включающий в себя следующие детерминанты: *narAa* и *narAb*, соответствующие большой и малой субъединицам диоксигеназы, гидроксимирующей ароматическое кольцо, соответственно, *narB*, кодирующий *цис*-нафталиндигидродиолдегидрогеназу, и *narC*, кодирующий гидратазу-альдолазу (Kulakov, 2005).

Помимо генов, кодирующих ключевые ферменты, в состав *nar*-кластера входят детерминанты, кодирующие рубредоксины – небольшие негемовые железосодержащие белки, участвующие в переносе электронов (*rub1*, *rub2* и *rub1bis*). Кроме того, имеется ген *narR1*, который кодирует GntR-подобный белок-регулятор транскрипции с доменом спираль–поворот–спираль, и *narR2*, XylR-подобный белок, активатор транскрипции, стартовый кодон которого перекрывается со стоп-кодоном *narR1* (Kulakov, 2005).

Между *narR2* и *rub1* у *Rhodococcus* sp. NCIMB12038 обнаружен ген, кодирующий фермент транспозазу – *tnR7*, ниже которого находятся 7 открытых рамок считывания *orf1–orf7*, предполагаемые продукты которых имеют сходство с метил-акцептирующими белками хемотаксиса (*orf4* и *orf5* сходны с NahY у *Pseudomonas putida*), а также с некоторыми бензоат-специфичными порин-подобными белками (*orf6* с BenF *P. putida*).

Однако в другом исследовании установлено сходство *orf6* с геном, кодирующим транспозазу – *tn2R7*. Предположительно, существует еще ген *oxiA*, кодирующий продукт, который имеет высокое сходство с оксидоредуктазами *Streptomyces* и ФАД- или ФМН-содержащими дегидрогеназами *Corynebacterium*. Несмотря на высокий уровень сходства продуктов *orf1–orf7* с белками других микроорганизмов или с продуктами генов самих родококков, их функции остаются неизвестными (Kulakov, 2005; Kimura, 2006; Gennaro, 2010; Чернявская, 2015).

Целью исследования было изучение влияния инактивации некоторых генов *nar*-кластера на способность бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap расти в минеральной среде с нафталином в качестве единственного источника углерода.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Бактериальные штаммы и плазмиды. В исследованиях использовали бактерии *R. pyridinivorans* 5Ap (Белорусская коллекция непатогенных микроорганизмов Института микробиологии НАН Беларуси, № БИМ В-939 Г) и мутантные варианты, полученные на их основе в ходе инсерционного мутагенеза (табл. 1). Суицидальный вектор pK18mob (Km^r, LacZ') (Schäfer, 1994) использовали для клонирования целевых генов. Для отбора рекомбинантных молекул ДНК и последующего их введения в клетки родококков использовали штаммы *E. coli* XL1-Blue (Bullock, 1987) и GM2163 (Metcalf, 1994).

В ходе анализа использовали нуклеотидные последовательности плазмиды pNAPH (номер в GenBank NCBI NZ_CP063451.1) бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap.

Среды и растворы. Для получения ночных культур бактерии культивировали в жидкой питательной среде ПДБ (пептон – 10 г/л, дрожжевой экстракт – 5 г/л, NaCl – 8 г/л; pH 7.0–7.2). Способность утилизировать нафталин изучали при выращивании в жидкой минеральной среде К (Ившина, 1994) с добавлением раствора микроэлементов по Постгейту (Романенко, 1974). Для определения титра клеток проводили посевы на пептонно-дрожжевую агаризованную среду ПДА (пептон – 10 г/л, дрожжевой экстракт – 5 г/л, NaCl – 8 г/л, агар – 15 г/л; pH 7.0–7.2).

Трансформацию *E. coli* осуществляли по методике, описанной в руководстве (Маниатис, 1984).

Тотальную ДНК бактерий выделяли саркозидовым методом (Кузюкина, Ivshina, 2010). Для выделения плазмидной ДНК использовали набор реактивов Fast-n-Easy Plasmid Mini-Prep Kit (“Jena Bioscience”, Германия).

Инсерционная инактивация генов *narAa* и *narB*. Суицидальный вектор pK18mob (Km^r), содержа-

Таблица 1. Характеристика мутантных вариантов бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap

Название мутантного варианта	Генотип	Характеристика и способ получения
<i>R. pyridinivorans</i> 5Ap <i>narAa</i> ::pK18mob	<i>narAa</i> ⁻ Km ^r	Мутантный вариант с инактивированным геном <i>narAa</i> , кодирующим большую субъединицу нафталиндиоксигеназы (направленный инсерционный мутагенез с использованием суицидального вектора pK18mob)
<i>R. pyridinivorans</i> 5Ap <i>narB</i> ::pK18mob	<i>narB</i> ⁻ Km ^r	Мутантный вариант с инактивированным геном <i>narB</i> , кодирующим <i>цис</i> -нафталиндиоксиоксигеназу (направленный инсерционный мутагенез с использованием суицидального вектора pK18mob)

Таблица 2. Праймеры для ПЦР, используемые в ходе исследования

Название гена	Название праймеров	Последовательности праймеров (5' → 3')	Размер ампликона, п.н.
<i>narAa</i> (<i>Rhodococcus</i>)	NarAaForward	TACCTCGGCGACCTGAAGTTCTA	625
	NarAaReverse	AGTTCTCGGCGTCGTCCTGTTTCGAA	
<i>narB</i> (<i>Rhodococcus</i>)	NarBForward	ACGTGCAAGAAGGCGCGAAA	653
	NarBReverse	ACGCTCCCGCGAGGCGAGAA	
—	M13modForward	CACACAGGAAACAGCTATGAC	—

ший фрагменты генов *narAa* или *narB*, вводили в клетки *R. pyridinivorans* 5Ap методом электротрансформации (на приборе Bio-Rad Gene Pulser XCell Electroporation System (США), с использованием следующего режима: напряжение — 1800 В; емкость — 25 Ф; сопротивление — 200 Ом; просвет кюветы — 1 мм), что приводило к гомологичной рекомбинации данной конструкции с соответствующим участком гена и встраиванию плазмиды в ген таким образом, что он становился дефектным. Отбор мутантов проводили на среде ПДА с канамицином (25 мкг/мл). Наличие вставки в гене-мишени оценивали с помощью ПЦР. Для этого использовали набор реагентов (*Taq*-полимераза с буфером, смесь дНТФ) и праймеры, комплементарные нуклеотидной последовательности вектора (M13modForward) и генам *narAa* или *narB* соответственно (табл. 2), производства ОДО “Праймтех” (Беларусь).

Сравнительная характеристика динамики роста штамма *R. pyridinivorans* 5Ap и его мутантных вариантов при культивировании с нафталином. Раствор нафталина в хлороформе (50 г/л) добавляли в стерильные колбы до конечной концентрации 500 мг/л из расчета общего объема среды 50 мл. После полного испарения растворителя в колбы с сухим нафталином вносили 50 мл минеральной

среды К, 50 мкл раствора микроэлементов по Постгейту и отмытую (дважды в физрастворе) ночную культуру до ОП₆₀₀ = 0.05. Культивировали при 28°C с аэрацией 140 об./мин на протяжении 6 сут. При этом каждые 24 ч измеряли ОП₆₀₀ и готовили серию разведений, после чего производили высевы на среду ПДА для определения количества колониеобразующих единиц. Степень стабильности инсерции определяли посредством пересева колоний на среду ПДА с добавлением канамицина (25 мкг/мл).

Определение эффективности биodeградации нафталина. Для каждой культуры были подготовлены колбы с одинаковым объемом среды и ОП₆₀₀ добавленных ночных культур, в количестве, равном числу отбора проб для определения в них концентрации нафталина, т.к. проведение экстракции приводит к утрате исследуемого субстрата. Экстрагировали нафталин из культуральной жидкости, для чего в колбу добавляли 0.5 объема экстрагента — перхлорэтилена. Закрывали колбу резиновой крышкой и встряхивали на протяжении 2 мин. Выдерживали 30–60 мин до разделения фаз и отбирали нижнюю фракцию, содержащую нафталин, растворенный в перхлорэтилене. Полученный экстракт очищали от полярных примесей методом колоночной хроматографии с ок-

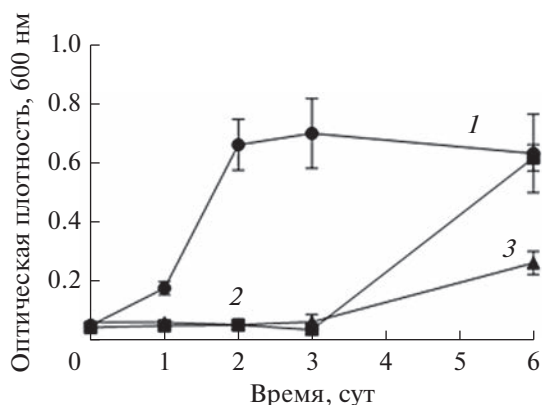


Рис. 1. Динамика роста *R. pyridinivorans* 5Ap дикого типа (wt) и мутантных вариантов по оптической плотности. (1) – wt; (2) – *narAa*⁻; (3) – *narB*⁻.

сидом алюминия. Очищенный экстракт разводили в 2–4 раза и измеряли его оптическую плотность при длине волны 312 нм. Концентрацию нафталина определяли в соответствии с калибровочным графиком. В качестве контроля использовали культуры, выращенные в среде с сукцинатом натрия (единственный источник углерода и энергии).

Обработка результатов. Для обработки данных использовали программы Microsoft Excel и GraphPad Prism. Для анализа нуклеотидной последовательности бактериальной плазмиды биодegradации нафталина *R. pyridinivorans* 5Ap использовали программу SnapGene Viewer 3.2.1 (http://www.snapgene.com/products/snapgene_viewer/) и интернет-ресурс BLAST 2.13.0 (сайт: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Бактерии *R. pyridinivorans* 5Ap являются активными деструкторами нефти и широкого спектра углеводов различных классов, в том числе ПАУ (в частности, нафталина) (Чернявская, 2018). Ранее было установлено, что гены биодegradации нафталина у этих бактерий локализованы на конъюгативной плазмиде, обозначенной как pNAPH (Чернявская, 2015). Установлено, что эта плаزمида несет кластер генов *nar*, определяющий синтез ключевых ферментов начальных стадий окисления нафталина.

Характерной особенностью метаболизма ПАУ, исходя из химического строения данных соединений, является последовательная “атака” ароматических колец с последующим их преобразованием при помощи ферментов, приводящая к ступенчатому уменьшению количества колец в соединении. Также существуют различные пути, приводящие к образованию бензойной кислоты, салицилата, катехола или прокатеховой кислоты,

которые далее, с помощью соответствующих ферментов, окисляются до пирувата, оксалоацетата и ацетил-КоА, в свою очередь поступающих в цикл трикарбоновых кислот (ЦТК) (Vaidya, 2018).

Сущность “атаки” ароматического кольца заключается в том, что при действии фермента диоксигеназы образуется *цис*-дигидродиол, который с помощью дегидрогеназы преобразуется в *цис*-диол (в рамках одного ароматического кольца, представленного в ПАУ). После этих превращений фермент диоксигеназа, расщепляющая ароматическое кольцо, размыкает цикл через разрушение соседних С–С связей, и дальнейшие реакции деградации ПАУ осуществляются в зависимости от типа исходного соединения, поскольку для разных представителей ПАУ характерны различные метаболические пути.

Таким образом, основными ферментами окисления ПАУ можно назвать диоксигеназы, гидроксилирующие ароматическое кольцо ПАУ; дегидрогеназы и диоксигеназы, расщепляющие ароматические кольца (Cerniglia, 1993; Biodegradative Bacteria..., 2014).

В связи с этим мы провели поиск данных диоксигеназ на плазмиде pNAPH бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap и обнаружили шесть диоксигеназ, гидроксилирующих ароматическое кольцо, и одну диоксигеназу, расщепляющую ароматическое кольцо (табл. 3). Как видно из табл. 3, большинство выявленных диоксигеназ обнаруживается в клетках бактерий рода *Rhodococcus*, за исключением β-субъединицы диоксигеназы коричневой кислоты (№ 4, табл. 3), которая проявляет высокую степень сходства с последовательностями бактерий рода *Microbacterium*. Таким образом, можно сказать, что в формировании плазмиды pNAPH имели место процессы рекомбинации с фрагментами ДНК, приобретенными от бактерий других родов путем горизонтального переноса.

Среди выявленных в составе плазмиды pNAPH генов диоксигеназ ключевую роль биодegradации нафталина играет нафталиндиоксигеназа (*NarAaAb*). Следует, однако, отметить, что зачастую для диоксигеназ, окисляющих ПАУ и другие субстраты, характерна широкая субстратная специфичность (Сазыкин, 2009). Кроме того, известен нафталинутилизирующий штамм *Rhodococcus* sp. p52 (Yang et al., 2014), который обладает крайне сходным с исследуемыми бактериями геномом, за исключением *nar*-локуса, что говорит о существовании альтернативных путей утилизации нафталина. Изучение мутантов *R. pyridinivorans* 5Ap, дефектных по ключевым генам биодegradации нафталина (в частности *narAa* и *narB*), позволяет определить, могут ли другие диоксигеназы заместить их в этом процессе.

Динамику роста и эффективность биодegradации нафталина мутантными вариантами по генам

Таблица 3. Диоксигеназы, кодируемые плазмидными генами рNAPH бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap

№	Название продукта (длина, а/к; мол. масса, кДа)	Координаты гена, п.н.	Содержание Г + Ц, %	Сходные нуклеотидные последовательности (степень сходства в %, № в базе данных NCBI)	Сходные аминокислотные последовательности (% идентичности, % сходства с учетом синонимических замен, № в базе данных NCBI)
Диоксигеназы, гидроксиллирующие ароматическое кольцо					
1	Большая субъединица нафталиндииоксигеназы (<i>narAa</i>) (468 а/к; 52.6 кДа)	51785–53191	64	<i>Rhodococcus ruber</i> (99.64%, KY072804.1)	<i>Rhodococcus opacus</i> (99.34%, 96%, WP_005253622.1)
2	β -Субъединица диоксигеназы гидроксиллирующей ароматическое кольцо (<i>narAb</i>) (172 а/к; 19.7 кДа)	53195–53713	62	<i>Rhodococcus ruber</i> (100%, KY072804.1)	<i>Rhodococcus opacus</i> (98.84%, 100%, WP_005253626.1)
3	β -Субъединица диоксигеназы коричной кислоты (203 а/к; 23 кДа)	123696–124307	62	<i>Rhodococcus ruber</i> (93.14%, CP023714.1)	<i>Nocardia farcinica</i> (97.04%, 100%, WP_195060669.1)
4	β -Субъединица диоксигеназы коричной кислоты (195 а/к; 22.1 кДа)	197508–198095	64	<i>Microbacterium sediminis</i> (100%, CP038257.1)	<i>Microbacterium laevaniformans</i> OR221 (76.88%, 100%, EIC07797.1)
5	β -Субъединица диоксигеназы гидроксиллирующей ароматическое кольцо (167 а/к; 19.7 кДа)	132803–133306	64	<i>Rhodococcus</i> sp. (99.21%, CP016820.1) <i>Terrabacter</i> sp. (99.01%, AP008980.1)	<i>Rhodococcus</i> sp. p52 (98.80%, 100%, WP_019287416.1)
6	α -Субъединица диоксигеназы гидроксиллирующей ароматическое кольцо (443 а/к; 49.6 кДа)	133303–134634	62	<i>Rhodococcus</i> sp. (99.47%, CP016820.1)	<i>Rhodococcus</i> sp. p52 (99.32%, 100%, WP_019287415.1)
Диоксигеназы, расщепляющие ароматическое кольцо					
7	Экстрадиол-диоксигеназа (290 а/к; 30.7 кДа)	130613–131485	65	<i>Rhodococcus</i> sp. (99.54%, AB181125.1) <i>Gordonia terrae</i> (99.08%, CP049836.1)	<i>Rhodococcus</i> sp. YK2 (99.66%, 100%, BAC00806.1)

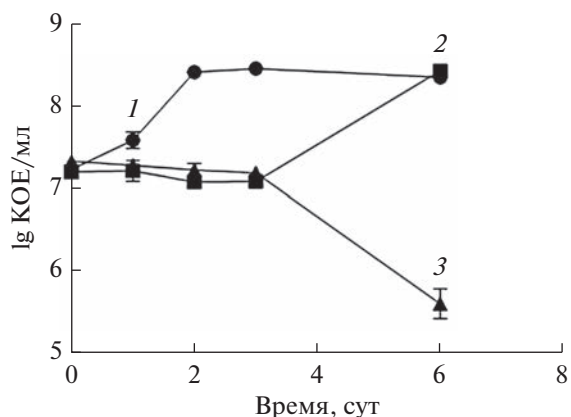


Рис. 2. Динамика роста *R. pyridinivorans* 5Ap дикого типа (wt) и мутантных вариантов по титру КОЕ (для удобства представлен в виде десятичного логарифма от значения титра клеток, lg КОЕ/мл). (1) – wt; (2) – *narAa*⁻; (3) – *narB*⁻.

narAa и *narB* изучали в сравнении с бактериями *R. pyridinivorans* 5Ap дикого типа. Мутанты и бактерии дикого типа культивировали в минеральной среде К с добавлением нафталина (500 мкг/л) в качестве единственного источника углерода (рис. 2).

Интерес к изучаемым детерминантам обусловлен тем, что ген *narAa* кодирует большую субъединицу нафталиндиоксигеназы. Это ключевой фермент биodeградации нафталина; следовательно, рост мутантного варианта на среде с добавлением нафталина будет означать наличие в геноме *R. pyridinivorans* 5Ap других ферментных систем, осуществляющих первичное окисление нафталина. Продукт гена *narB*, *цис*-нафталиндигидродiolдегидрогеназа, действует в промежутке между диоксигеназой, гидроксилирующей ароматическое кольцо, и диоксигеназой, расщепляющей

ароматическое кольцо. Следовательно, рост мутантного варианта будет означать, что нет необходимости в такой подготовке субстрата для действия диоксигеназы, расщепляющей ароматическое кольцо (Mohapatra, Phale, 2021).

Таким образом, мы провели сравнительный анализ динамики роста мутантных вариантов по генам *narAa* и *narB* по сравнению с бактериями *R. pyridinivorans* 5Ap дикого типа на среде с добавлением нафталина (500 мг/л) в качестве единственного источника углерода и энергии (рис. 1, 2). На рис. 1 и 2 видно, что бактерии с инактивированными генами *narAa* и *narB* имеют характер роста, значительно отличающийся от роста *R. pyridinivorans* 5Ap дикого типа.

Что касается варианта, мутантного по гену *narAa*, здесь наблюдается выраженная и продолжительная лаг-фаза (2–2.5 сут), характерная для дикого типа экспоненциальная фаза, после которой практически сразу наступает фаза отмирания. С одной стороны, активный рост в промежутке между третьими и шестыми сутками может быть связан с наличием в геноме альтернативных детерминант деградации нафталина. Однако, поскольку все мутантные варианты были получены в ходе инсерционного мутагенеза, в ходе эксперимента отслеживали стабильность передачи и сохранность инсерции (табл. 4).

Сопоставив данные из рис. 1 и 2 и табл. 4 можно наиболее объективно оценить причину специфического характера роста *R. pyridinivorans* 5Ap *narAa*::pK18mob. Начиная с 3 сут стабильность инсерции начала уменьшаться и к 6 сут составляла 38.5 ± 16.3%. Именно в этот промежуток времени мы отметили рост культуры. Таким образом, он был связан с исключением инсерции и восстановлением целостности гена, кодирующего нафталиндиоксигеназу, а не с присутствием в геноме иных систем, экспрессия которых занимает больше времени.

В случае с мутантом по гену *narB*, к 6 сут наблюдали 80.0 ± 20.0% выросших на среде с канамицином (25 мкг/мл) колоний, что дает основания исключить взаимосвязь повышения показателей оптической плотности и дестабилизации инсерции, инактивирующей данный ген. Кроме того, данные о титре клеток (рис. 2) говорят о наступлении фазы отмирания.

Следует отметить, что при культивировании мутантного варианта по гену *narB* мы регистрировали интенсивную желто-оранжевую окраску среды между третьими и шестыми сутками. Эта окраска сохранялась даже при выделении нафталина из культуральной жидкости и влияла на оптическую плотность. В то же время после очистки окрашенного экстракта методом колоночной хроматографии экстракт становился прозрачным. Это указывает на присутствие неспецифи-

Таблица 4. Стабильность сохранения инсерции в генах *narAa* и *narB*

Время, сут	% устойчивых к канамицину колоний		
	5Ap*	5Ap <i>narAa</i> ::pK18mob	5Ap <i>narB</i> ::pK18mob
0	0	99.3 ± 0.8	99.8 ± 0.4
1	0	96.8 ± 0.4	98.2 ± 0.8
2	0	99.0 ± 0.7	99.5 ± 0.5
3	0	81.3 ± 22.2	97.0 ± 2.9
6	0	38.5 ± 16.3	80.0 ± 20.0

* Высев дикого типа на среду ПДА с канамицином (25 мкг/мл) производили для контроля возникновения спонтанных мутантов.

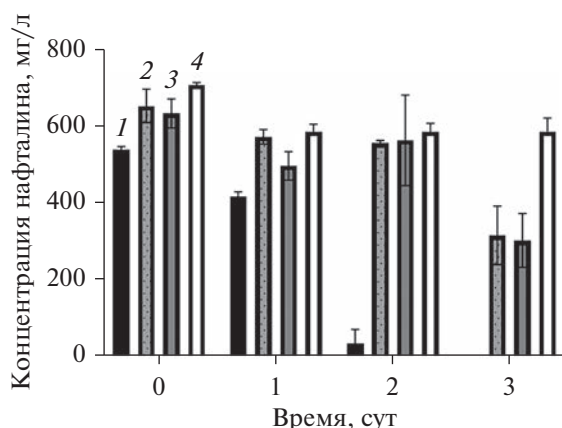


Рис. 3. Динамика утилизации нафталина бактериями *R. pyridinivorans* 5Ar дикого типа (wt) и мутантными вариантами. (1) – wt; (2) – *narAa*⁻; (3) – *narB*⁻; (4) – контрольные пробы, не содержащие бактерий.

ческого окисления первичных метаболитов нафталина с образованием полярного продукта. Желтое окрашивание может также свидетельствовать о накоплении продуктов мета-расщепления или быть связанным с утечкой активных форм кислорода из активных центров ферментов, что способствует образованию свободных радикалов, которые могут участвовать в окислении промежуточных метаболитов и приводить к накоплению тушковых продуктов (Расимович, 2019).

Определение эффективности процесса биодegradации нафталина бактериями *R. pyridinivorans* 5Ar (рис. 3) позволило установить, что на третьи сутки в среде с бактериями *R. pyridinivorans* 5Ar дикого типа (wt) нафталин не детектировался. Таким образом, в течение 3 сут был утилизирован нафталин в концентрации 500 мг/л, что в 5000 раз превышает ПДК нафталина в воде водных объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования и в 125000 раз – в воде водных объектов, имеющих рыбохозяйственное значение (природные воды) (ГОСТ 16106-2019).

Эффективность утилизации нафталина мутантными бактериями *R. pyridinivorans* 5Ar *narAa*:pK18mob и 5Ar *narB*:pK18mob можно охарактеризовать как очень низкую, а падение концентрации нафталина в среде к 3 сут можно объяснить как исключением инсерции (справедливо для мутанта по гену *narAa*), так и естественным испарением данного углеводорода.

Таким образом, в клетках бактерий *R. pyridinivorans* 5Ar нафталиндиоксигеназа (в частности, большая субъединица *NarAa*) и *цис*-нафталиндиоксиоксигеназа (*NarB*), кодируемые плазмидой pNAPH, являются ключевыми ферментами биодegradации нафталина, которые не имеют аналогов. При этом инсерционная инактивация гена *narAa* в селективных условиях (в

присутствии нафталина) оказывается обратимой: на 3 сут происходит исключение инсерции и восстановление способности бактериями утилизировать нафталин; чего не наблюдается для гена *narB*. При инактивации гена *narB* наблюдается накопление в среде окрашенного полярного продукта, экстрагируемого перхлорэтиленом. Интенсивный процесс отмирания бактерий (рис. 3) после накопления данного продукта говорит о его токсичности, а также о важности стадии, катализируемой *цис*-нафталиндиоксиоксигеназой для последующего расщепления интермедиатов нафталина.

Бактерии *R. pyridinivorans* 5Ar дикого являются высокоэффективными деструкторами нафталина, которые в течение 3 сут утилизуют данное соединение в концентрации 500 мг/л, что в 5000 раз превышает ПДК нафталина в воде водных объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования и в 125000 раз – в воде водных объектов, имеющих рыбохозяйственное значение (природные воды). Следовательно, исследуемые бактерии могут быть использованы для эффективной очистки водных экосистем, загрязненных нафталином.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований и Министерства образования Республики Беларусь (грант Б22МВ-029), а также в рамках задания 3.6.2 ГПНИ “Биотехнологии”.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы подтверждают, что конфликты интересов отсутствуют.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Каталог штаммов региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов / Под ред. Ившиной И.Б.. М.: Наука, 1994.
- Catalog of Strains of the Regional Profiled Collection of Alkanotrophic Microorganisms / Ed. Ivshina I.B. M.: Nauka, 1994.
- Maniatis T., Fritsch Э., Сэмбрук Дж.* Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование / Пер. с англ. под ред. Баева А.А., Скрыбина К.Г. М.: Мир, 1984. 479 с. *Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J.* Molecular Cloning. A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982. 545 p.

- Нафталин коксохимический. Технические условия: ГОСТ 16106–2019. введ. 01.03.20. Межгосударственный совет по стандартизации, метрологии и сертификации, 2019. 12 с.
- Расимович Б.Э. Биodeградация нефтезагрязнений под воздействием углеводородоокисляющих микроорганизмов // НефтеГазoХимия. 2019. № 1. С. 48–51.
- Романенко В.И., Кузнецов С.И. Экология микроорганизмов пресных вод. М.: Наука, 1974. 194 с.
- Сазыкин И.С., Сазыкина М.А., Чистяков В.А. Разложение нефти микроорганизмами. Экологические аспекты // Известия ВУЗов. Северо-Кавказский регион. 2009. № 6. С. 88–92.
- Хант Дж. Геохимия и геология нефти / Пер. с англ. под ред. Вассоевича Н.Б., Архипова А.Я. М.: Мир, 1982.
- Hunt J. Petroleum Geochemistry and Geology. W.H. Freeman & Co, San Francisco, CA, 1979.
- Чернявская М.И., Букляревич А.А., Делеган Я.А., Охремчук А.Э., Филонов А.Е., Титок М.А. Биоразнообразие почвенных углеводородоокисляющих бактерий из разных климатических зон // Микробиология. 2018. Т. 87. С. 581–594.
- Chernyavskaya M.I., Buklyarevich A.A., Delegan Ya.A., Okhremchuk A.E., Filonov A.E., Titok M.A. Biodiversity of soil hydrocarbon-oxidizing bacteria from different climatic zones // Microbiology (Moscow). 2018. V. 87. P. 699–711.
- Чернявская М.И. Характеристика штаммов нафталинутилизующих бактерий рода *Rhodococcus* // Труды БГУ: Микробиология. 2016. Т. 11. Ч. 1. С. 190–197.
- Chernyavskaya M.I. Characterization of strains of naphthalene-utilizing bacteria of the genus *Rhodococcus* // Proceedings of BSU: Microbiology. 2016. V. 11. Part 1. P. 190–197.
- Biodegradative Bacteria: How Bacteria Degrade, Survive, Adapt, and Evolve / Eds. Nojiri H., Tsuda M., Fukuda M., Kamagata Y. Springer Tokyo, 2014. 358 p.
- Bullock W.O., Fernandez J.M., Short J.M. XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection // BioTechniques. 1987. V. 5. P. 376–378.
- Cerniglia C.E. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons // Curr. Opin. Biotechnol. 1993. V. 4. P. 331–338.
- Gennaro P.D. Identification and characterization of genes involved in naphthalene degradation in *Rhodococcus opacus* R7 // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2010. V. 87. P. 297–308.
- Haritash A.K., Kaushik C.P. Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review // J. Hazard. Mater. 2009. V. 169. P. 1–15.
- Inaba T. Analysis of genes for succinoyl trehalose lipid production and increasing production in *Rhodococcus* sp. strain SD-74 // Appl. Environ. Microbiol. 2013. V. 79. P. 7082–7090.
- Kimura N. Genetic and biochemical characterization of the dioxygenase involved in lateral dioxygenation of dibenzofuran from *Rhodococcus opacus* strain SAO101 // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2006. V. 73. P. 474–484.
- Kulakov L.A. Web-type evolution of *Rhodococcus* gene clusters associated with utilization of naphthalene // Appl. Environ. Microbiol. 2005. V. 71. P. 1754–1764.
- Kuyukina M.S., Ivshina I.B. Bioremediation of contaminated environments using *Rhodococcus* // Biology of *Rhodococcus*. Microbiology Monographs / Ed. Alvarez H. Springer, Cham. 2019. V. 16. P. 231–270.
- Larkin M.J., Kulakov L.A., Allen Ch.C.R. Biodegradation and *Rhodococcus* – masters of catabolic versatility // Curr. Opin. Biotechnol. 2005. V. 16. P. 282–290.
- Li J.L., Chen B.H. Surfactant-mediated biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons // Materials. 2009. V. 2. P. 76–94.
- Metcalf W.W., Jiang W., Wanner B.L. Use of the rep technique for allele replacement to construct new *Escherichia coli* hosts for maintenance of R6Kgamma origin plasmids at different copy numbers // Gene. 1994. V. 138. P. 1–7.
- Mohapatra B., Phale P.S. Microbial degradation of naphthalene and substituted naphthalenes: metabolic diversity and genomic insight for bioremediation // Front. Bioeng. Biotechnol. 2021. V. 9. Art. 602445.
- Schäfer A. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum* // Gene. 1994. V. 145. P. 69–73.
- te Riele H., Michel B., Ehrlich S.D. Single-stranded plasmid DNA in *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. P. 2541–2545.
- Vaidya S. Degradation of chrysene by enriched bacterial consortium // Front. Microbiol. 2018. V. 9. Art. 1333.
- Yang H. Degradation of recalcitrant aliphatic and aromatic hydrocarbons by a dioxin-degrader *Rhodococcus* sp. strain p52 // Environ. Sci. Pollut. Res. Int. 2014. V. 21. P. 11086–11093.

Analysis of the Key Determinants of Naphthalene Degradation by *Rhodococcus pyridinivorans* 5Ap

A. Yu. Larchenka¹, * and M. I. Mandryk¹

¹Belarusian State University, Minsk, 220030 Belarus

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

Received January 6, 2023; revised February 21, 2023; accepted March 1, 2023

Abstract—Wild-type cells of *Rhodococcus pyridinivorans* 5Ap were found to be highly efficient naphthalene degraders, completely utilizing this compound (500 mg/L) after 3 days, and may be used for remediation of naphthalene-contaminated aquatic ecosystems. Inactivation of the biodegradation genes *narAa* (encoding the large subunit of naphthalene dioxygenase) and *narB* (encoding *cis*-naphthalene dihydrodiol dehydroge-

nase) resulted in the loss of ability to use naphthalene as the sole energy source, which indicated the absence in the genome of *R. pyridinivorans* 5Ap of the determinants responsible for alternative pathways of naphthalene oxidation. Moreover, *narB* inactivation resulted in accumulation of a polar colored compound (probably a product of primary naphthalene oxidation) in the medium.

Keywords: naphthalene biodegradation, *Rhodococcus*, biodegradation genes, growth dynamics, biodegradation efficiency, dioxygenase