

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИ

АНАЛИЗ МИКРОБНОГО СООБЩЕСТВА МАНУСКРИПТА
XI ВЕКА КУЛЬТУРАЛЬНЫМИ И НЕ ИСПОЛЗУЮЩИМИ
КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МЕТОДАМИ¹

© 2022 г. Н. Раисния^a, Е. Арефян^a, *, М. А. Амузегар^a, **

^aDepartment of Microbiology, School of Biology, College of Science, University of Tehran, Tehran, Iran

*e-mail: arefian@ut.ac.ir

**e-mail: amoozegar@ut.ac.ir

Поступила в редакцию 14.12.2021 г.

После доработки 22.01.2022 г.

Принята к публикации 22.01.2022 г.

Микробное сообщество (*Bacteria*, *Archaea*, *Fungi*) исторической рукописи было исследовано с помощью микроскопии (полевая эмиссионная сканирующая электронная микроскопия), культуральных методов и секвенирования на платформе Illumina MiSeq. Была изучена продукция гидролитических ферментов (целлюлаз, амилаз и протеаз) выделенными штаммами. Микроскопия напыленных золотом образцов бумаги выявила бактериальные клетки, конидии и мицелий грибов. Выделенные 11 бактериальных штаммов (роды *Bacillus*, *Streptomyces*, *Corynebacterium*) и 4 штамма грибов (роды *Aspergillus* и *Alternaria*) были идентифицированы с помощью сравнения последовательностей генов 16S рНК и ITS фрагментов с последовательностями из баз данных EzBioCloud и MycoBank. Секвенирование на Illumina MiSeq выявило присутствие 20 родов бактерий, включая *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Citrococcus*, *Promicromonospora*, *Carnobacterium*, *Arthrobacter*, *Salinibacterium* и *Streptomyces*. *Pseudomonas* лидировал по числу родов (58%), а *P. stutzeri* был наиболее многочисленным видом бактерий (55.2%). Данные по ампликонам грибов указывали на присутствие 62 родов, в том числе *Penicillium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Mucor* и *Chaetomium*. Наиболее многочисленными родами были *Penicillium* (58.89%) и *Aspergillus* (33.02%), а *P. polonicum* (55.45%) и *A. ruber* (22.55%) были наиболее многочисленными видами грибов. Попытки обнаружения архей с помощью культуральных методов и высокопроизводительного секвенирования дали отрицательный результат. Анализ ферментативной активности микробных изолятов выявил опасность биodeградации. Было показано, что комбинация культуральных методов и высокопроизводительного секвенирования предпочтительнее использования этих подходов по отдельности.

Ключевые слова: биodeградация, культивируемые микроорганизмы, секвенирование нового поколения, Illumina MiSeq, ферментная активность, бумажные материалы

DOI: 10.31857/S0026365622300115

Архивные и библиотечные ресурсы — это ценная часть культурного наследия, представляющая различные аспекты культурной и общественной жизни народа и его научные достижения в различные исторические периоды. Защита этих сокровищ — важное и ответственное дело. Постоянный мониторинг и контроль вредных факторов являются важнейшими компонентами стратегии хранения и помогают увеличить стабильность и сохранность документальных памятников. Факторы, разрушающие бумагу, можно разделить на три группы: физические, химические и биологические. Микроорганизмы играют ключевую роль в разрушении библиотечных ресурсов. Таким об-

разом, описание разнообразия микробных сообществ — важный шаг в разработке превентивных стратегий сохранения и соответствующих восстановительных мер. Бумажные материалы, так же как и другие объекты культурного наследия, могут быть заселены различными группами микроорганизмов. Большинство грибов и бактерий, заселяющих эти материалы, устойчивы к таким неблагоприятным факторам окружающей среды, как низкая влажность и могут разрушать органические вещества, проявляя мощную ферментативную активность (Savković et al., 2019). Биоразрушение, вызванное микроскопическими грибами и бактериями, может проявляться, например, как появление цветных пятен и снижение механической прочности бумажных материалов (Gutarowska, 2016; Sequeira et al., 2019) вследствие синтеза пигментов микроорганизмами, а также взаимодей-

¹ Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0026365622300115 для авторизованных пользователей.

ствия между секретируемыми ими веществами и составляющими бумаги, образования биопленок и разрушения органических соединений (Sterflinger, Pinzari, 2012).

Ранее состав микробных сообществ, связанных с бумагой и объектами культурного наследия, изучался с помощью микроскопии и культуральных методов (Tarsitani et al., 2014). Культуральные методы – золотой стандарт микробиологических исследований – позволяют изучить физиологические и метаболические характеристики биодеструкторов. Однако было показано, что этими методами выявляется лишь небольшая доля (<1%) разнообразия микробных сообществ архивных и библиотечных материалов (Karakasidou et al., 2018). Они могут идентифицировать только живые культивируемые микроорганизмы. С другой стороны, многие микроорганизмы, культивируемые *in vitro*, растут медленно или требуют специальных сред (Schabereiter-Gurtner et al., 2001; Duan et al., 2017). В последние десятилетия для определения факторов, разрушающих объекты культурного наследия, стали применяться молекулярные методы на основе ПЦР, такие как клонирование и секвенирование по Сэнгеру (технология первого поколения). В то же время, микробные сообщества нескольких объектов культурного наследия были охарактеризованы с помощью методов ДНК фингерпринтинга, например, гель-электрофореза в денатурирующем градиенте (Joseph, 2021). Большинство этих методов имеют недостатки, такие как высокая стоимость, значительные затраты времени и низкая производительность, и тоже определяют только небольшую часть микробного разнообразия естественных образцов (Otlewska et al., 2014). К счастью, в последнее время, благодаря разработке технологий секвенирования нового поколения (NGS), таких как платформа Illumina, стало возможным осуществлять одновременно тысячи и миллионы реакций секвенирования в бесклеточных системах. В результате микробные сообщества различных систем, в том числе, объектов культурного наследия, можно идентифицировать с более высокой эффективностью при меньших затратах (Duan et al., 2017; Liu et al., 2018; Zhang et al., 2019).

Манускрипт *Al-adoviah al-Mufradah* – шедевр фармакологии. Автором этого труда был врач и фармацевт из Андалузии Абу Бакр Хамед Ибн Самаджун (XI в. н. э.). Составляя эту книгу, Ибн Самаджун с критической точки зрения представил сведения о ряде лекарственных средств, разработанных его предшественниками и современниками, и выразил собственные взгляды. В 1992 г. Fuad Sezgin опубликовал все известные на тот момент разделы в виде четырех иллюстрированных томов и в предисловии отметил, что часть манускрипта, содержащая введение и сведения о лекарствах на первых пять букв алфавита, была

утрачена. К счастью, усилиями экспертов Национальной Библиотеки и Архивов Ирана (NLAI) эта утраченная часть была обнаружена в личной библиотеке коллекционера из Табриза, и уникальное медицинское собрание удалось восстановить. В настоящее время манускрипт находится в хранилище редких книг NLAI.

В числе видимых повреждений структуры и бумажных листов книги можно назвать обесцвечивание бумаги, фоксинг (красновато-коричневые цветные пятна), расплывчатые коричневые и серые пятна, хрупкость, ухудшение состояния полей и переплета книги. Ввиду исторической древности этого произведения и его длительного хранения в неблагоприятных условиях окружающей среды, существовала возможность его биологического загрязнения и колонизации разрушающимися микроорганизмами (рис. S1).

В данной работе ставились следующие задачи: дать описание микробных сообществ (грибов, бактерий и архей), населяющих манускрипт, с помощью культуральных методов и высокопроизводительного секвенирования ампликонов, оценить продукцию гидролитических ферментов микробными изолятами, которые, вероятно, участвовали в деградации органических соединений материала рукописи, и идентифицировать микробные группы, присутствующие в хранилище редких книг, с целью оценки потенциальных биологических рисков для других объектов из бумаги.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Образцы. Манускрипт *Al-adoviah al-Mufradah* хранится на компактных полках при температуре 23–25°C и относительной влажности 30–40% в хранилище редких книг NLAI. Пробы для изучения культивируемых микроорганизмов были взяты в десяти разных местах книги, каждая с площади примерно 1 см² (общая площадь 10 см²), в том числе четыре пробы с первой страницы (FP1–FP4), одна проба с передней кромки (FE), две пробы с внутренних страниц (IP1 и IP2) и три пробы с последней страницы книги (EP1–EP3). Пробы из этих областей были собраны с помощью стерильных тампонов и сразу же использованы для биологической культуры (табл. S1 и S2). Для метагеномного исследования пробы с этих участков были отобраны повторно с помощью стерильных тампонов и скальпелей. С учетом исторической ценности книги и во избежание физических повреждений, было собрано минимальное количество бумажных фрагментов, только с полей и пустых страниц. Некоторые из этих бумажных фрагментов были использованы для полевой эмиссионной сканирующей электронной микроскопии (ПЭСЭМ). Поскольку материал каждого отдельного фрагмента был непредставителен для выделения ДНК, кусочки бумаги, полу-

ченные с десяти участков, объединили в общий образец. До момента выделения ДНК мазки и фрагменты бумаги хранились при -20°C .

ПЭСЭМ. Фрагменты бумаги (диаметром примерно 2–3 мм) помещали на предметное стекло на двустороннюю углеродную клейкую ленту и напыляли слоем золота толщиной примерно 15 нм в устройстве для напыления Quorum Q150T ES. Затем образцы анализировали и фотографировали с помощью ПЭСЭМ (Nova NanoFESEM 450) в режиме высокого вакуума при давлении в камере 0.10 мбар и напряжении 10 кВ, чтобы оценить их возможную колонизацию микробными сообществами и физическую деформацию целлюлозных волокон.

Измерение pH. pH бумаги определяли по методу, предложенному Strlič и соавт., с небольшими изменениями (Strlič et al., 2004). На бумагу наносили каплю дистиллированной воды и к влажной поверхности аккуратно прижимали электрод с плоским наконечником (Metrohm 6, 0253, 100); значение pH фиксировали через 30 с (когда оно стабилизировалось) с помощью pH-метра Metrohm 691 (Швейцария). Окончательный результат определяли как среднее значений, полученных в пяти различных точках.

Культуральные методы. Мазки проб культивировали на среде SDA (Sabouraud Dextrose Agar, “Merck”, Германия) для выделения грибов, на средах R2A (Reasoner’s 2A agar, “Merck”) и TSA (Tryptic Soy Agar, “Merck”) для выделения бактерий и на среде MGM (Modified Growth Medium) с общим содержанием солей 23% для выделения осмофильных и галофильных архей (Nikou et al., 2017). Среда MGM (23%) имела следующий состав (г л^{-1}): NaCl, 184; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 23; MgSO_4 , 26.83; KCl, 7.76; NaBr, 0.61; пептон, 5.0; дрожжевой экстракт, 1.0, и агар, 18; pH доводили до 7.5 с помощью Трис-НCl. Для выделения грибов и бактерий чашки инкубировали 7 сут при 28°C , а для выделения архей – 21 сут при 37°C .

После очистки изолятов и их первичной идентификации на основе морфологии колоний, данных микроскопии и биохимических тестов для бактерий (в том числе на каталазу и оксидазу), повторяющиеся штаммы были классифицированы и подсчитаны. Молекулярную идентификацию штаммов проводили путем амплификации и секвенирования бактериальных генов 16S рРНК и фрагментов ITS грибов. Геномную ДНК изолятов выделяли с помощью специализированных наборов: Gram-positive bacteria mini-prep genomic DNA extraction kit (Iranian Biological Resource Center, IBRC) для бактерий и Plant Mini-Prep genomic DNA Extraction Kit (IBRC) для грибов, в соответствии с протоколом производителя. Качество выделенной ДНК оценивали с помощью электрофореза в 1% агарозном геле. Гены

16S рРНК изолятов бактерий амплифицировали с помощью универсальных праймеров 27F и 1492R; в изолятах грибов участок ITS амплифицировали с праймерами ITS4 и ITS5. Последовательности праймеров приведены в табл. S3. Реакционная смесь имела следующий состав: 0.25 мкл *Taq* ДНК полимеразы (1 ед./мкл), 2.5 мкл ПЦР буфера ($1\times$), 1.5 мкл MgCl_2 (2.5 мМ), 2 мкл dNTPs (0.6 мМ), по 0.5 мкл (0.4 мкМ) прямого и обратного праймеров, 1 мкл (20 нг) матрицы ДНК, стерильная деионизованная вода до общего объема 25 мкл. ПЦР проводили при следующих условиях: стартовая денатурация при 95°C (5 мин); 35 циклов денатурации при 94°C (20 с), отжига при 54°C (30 с) и синтеза при 72°C (45 с); заключительная достройка при 72°C (10 мин). Продукты ПЦР выявляли с помощью электрофореза в 1% агарозном геле с маркером 1 kb plus DNA ladder (“Sigma-Aldrich”). Продукты ПЦР очищали с помощью набора для экстракции из геля (IBRC, Иран) согласно инструкции и секвенировали в компании FAZA Biotech (Иран). Полученные последовательности редактировали с помощью программы Chromas Pro и сравнивали с геномными базами данных EzBioCloud и MocoBank для изолятов бактерий и грибов соответственно. Последовательности генов 16S рРНК и фрагментов ITS были выложены в базу данных NCBI (коды доступа приведены в табл. 1 и 2).

Оценка ферментативной активности. Выделенные штаммы были исследованы с точки зрения их способности разрушать основные органические соединения в составе манускрипта (целлюлозу, крахмал и белок). Для оценки целлюлозолитической, амилолитической и протеолитической активности изоляты грибов и бактерий высевали точно на среды СМС Agar (состав, г л^{-1} : карбоксиметилцеллюлоза, 0.5; NaNO_3 , 0.1; K_2HPO_4 , 0.1; MgSO_4 , 0.05; дрожжевой экстракт, 0.05; агар, 15), Starch Agar (“Himedia”, Германия) и Skim milk Agar (“Himedia”) соответственно. Чашки с культурами бактерий и грибов инкубировали при 28°C в течение 48 и 72 ч соответственно. Для обнаружения целлюлозолитической активности чашки окрашивали Конго красным (0.01%) и раствором йода по Граму и измеряли зону просветления (гало) вокруг колоний (Kasana et al., 2008). Чашки с крахмальным агаром окрашивали раствором йода по Граму. Амилолитическую и протеолитическую активность оценивали, измеряя диаметр светлой и прозрачной зоны на агаре с крахмалом и с обезжиренным молоком соответственно.

Выделение геномной ДНК из смеси фрагментов бумаги и мазков проводили с помощью коммерческого набора QIAamp Fast DNA Stool Mini-Kit (Germany) в соответствии с инструкцией изгото-

Таблица 1. Результаты секвенирования генов 16S рРНК бактериальных изолятов и определение ближайших родственных штаммов в соответствии с базой данных EzBioCloud

Изоляты бактерий	Длина последовательности, п.н	Ближайший идентифицированный филогенетический родственник (номер в базе данных EzBioCloud)	Сходство, %	Номер доступа в базе NCBI
B1	1071	<i>Bacillus atrophaeus</i> , JCM 9070 (AB021181)	99.9	MT279976
B2	1279	<i>Bacillus mojavensis</i> , RO-H-1 (GH600280)	99.84	MT273667
B3	1071	<i>Corynebacterium sanguinis</i> , CCUG 58655 (FJ269041)	100	MT274328
B4	1408	<i>Bacillus filamentosus</i> , SGD-14 (KF265351)	99.9	MT274417
B5	1404	<i>Bacillus velezensis</i> , CR-502 (AY603658)	99.7	MT276229
B6	1362	<i>Streptomyces rochei</i> , NPRL B-2410 (MUMD01000370)	99.9	MT276256
B7	1414	<i>Bacillus humi</i> , LGM 22167 (AJ627210)	98.6	MT276316
B8	1416	<i>Bacillus niacini</i> , IFQ 15566 (AB021194)	100	MT276317
B9	1105	<i>Bacillus cheonanensis</i> , PFS-5 (JQ966280)	99.7	MT276846
B10	1404	<i>Bacillus licheniformis</i> , ATCC 14580 (AE017333)	99.6	MT276852
B11	1415	<i>Bacillus idriensis</i> , SMC 4352-2 (AY904033)	100	MT277111

Таблица 2. Результаты секвенирования ITS фрагментов изолятов грибов и определение ближайших родственных штаммов в соответствии с базой данных MycoBank

Изоляты грибов	Длина последовательности, п.н.	Ближайший идентифицированный филогенетический родственник (номер в базе данных MycoBank)	Сходство, %	Номер доступа в базе NCBI
F1	549	<i>Aspergillus versicolor</i>	100	MT277425
F2	788	<i>Aspergillus sydowii</i>	99.8	MT277426
F3	707	<i>Alternaria alternata</i>	99.5	MT277427
F4	623	<i>Aspergillus niger</i>	100	MT277428

вителя. Результат проверяли электрофорезом в 1.5% агарозном геле.

ПЦР. Для амплификации генов 16S рРНК прокариот и фрагментов ITS грибов использовался двухэтапный протокол ПЦР. На первом этапе проводили ПЦР с геноспецифичными праймерами, а на втором этапе использовали набор праймеров с адапторами (для совместимости матрицы с ячейкой) и индексными последовательностями (уникальными для каждого образца). В первом туре участок V3–V4 генов 16S рРНК бактерий и архей амплифицировали с метагеномными праймерами 0341F/0785R и 0349F/0785R. Фрагмент ITS2 грибов амплифицировали с праймерами ITS3F/ITS4R. Последовательности праймеров приведены в табл. S4.

В первом туре ПЦР реакционная смесь имела следующий состав: 2.5 мкл буфера для ПЦР (1×), 2.5 мкл MgCl₂ (2.5 мМ), 1.5 мкл dNTPs (0.6 мМ), по 0.75 мкл (0.3 мкМ) прямого и обратного праймеров, 0.2 мкл *Taq* ДНК полимеразы (1 ед./мкл), 1 мкл (5 нг) матрицы ДНК, стерильная деионизованная вода до общего объема 25 мкл. Реакцию

проводили при следующих температурных условиях: начальная денатурация при 95°C (5 мин); 25 циклов денатурации при 95°C (20 с), отжига при 55°C (30 с) и синтеза при 72°C (40 с); завершающая достройка при 72°C (10 мин). Чтобы проверить качество амплификации, продукты первого тура ПЦР анализировали в 1.5% агарозном геле с маркером размеров Gene ruler 50bp (“Thermo Scientific”). Далее продукт первого тура служил матрицей во втором туре ПЦР. Концентрации компонентов и температурные условия во втором туре ПЦР были такими же, как и в первом туре, с тем отличием, что проводилось 15 циклов реакции вместо 25 (последовательности праймеров с бар-кодами приведены в табл. S5). Продукты второго тура ПЦР наносили на агарозный гель (1.5%), разделяли электрофорезом, вырезали полосы с ампликонами длиной 480–580 п.н. и очищали их с помощью набора для экстракции из геля (“Qiagen”, Германия) в соответствии с протоколом производителя.

Подготовка библиотек и секвенирование. Концентрацию ДНК в препаратах очищенных ампли-

конов бактерий и грибов определяли с помощью набора Invitrogen™ Qubit™ dsDNA BR Assay Kit (Великобритания) и приводили к стандарту 10 нг л^{-1} . Затем препараты отправляли в компанию “Magen” (Korea) для секвенирования на платформе Illumina MiSeq 2×300 .

Обработка и анализ данных секвенирования. Сырые данные FASTQ обрабатывали и анализировали с помощью программного пакета QIIME2-2019.4. После демультимплексирования исходных данных с помощью плагина q2-demux качество прочтений визуализировали на графике Interactive Quality и определяли параметры для удаления шумов. Парные прочтения объединяли командой qiime dada2 denoise-paired. Таксономическую классификацию операционных таксономических единиц (OTE) проводили с помощью q2-feature-classifier, сравнивая репрезентативные последовательности с базами данных Greengenes (v. 13.8) для бактерий и UNITE (v. 8.3) для грибов. Следует отметить, что классификация грибов, используемая в нашей работе, соответствует ссылкам, приведенным в базе данных UNITE (Tedersoo et al., 2018). Необработанные риды FASTQ были выложены в раздел Sequence Read Archive (SRA) базы данных NCBI (номер доступа SRA: PRJNA658545).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Физические характеристики. При анализе образцов бумаги с золотым напылением с помощью ПЭСЭМ в режиме высокого вакуума среди целлюлозных волокон были видны клетки бактерий, конидии и мицелий грибов. По-видимому, присутствие микробного сообщества вызвало разрушение и расслаивание целлюлозных волокон (рис. 1). Среднее значение pH образцов — 4.1.

Микробное разнообразие по данным культуральных методов. Из проб, взятых с тестируемых участков, были выделены четыре штамма грибов и 11 штаммов бактерий; эти штаммы идентифицировали молекулярными методами. Следует отметить, что на чашках со средой MGM для выделения осмофильных и галофильных архей роста не наблюдалось, и культивируемых архей выделено не было. Результаты секвенирования фрагментов генов 16S рРНК и ITS и их сравнения с базами данных EzBioCloud и MocoBank представлены в табл. 1 и 2 соответственно. Число колоний (КОЕ/см^2), связанных с изолятами бактерий и грибов в различных местах рукописи приведено в табл. S1 и S2.

Синтез гидролитических ферментов. Результаты тестов на продукцию ферментов гидролиза (целлюлаз, амилаз и протеаз) выделенными микробными штаммами приведены в табл. 3. Результаты оценивались по диаметру зоны просветления в соответствующих средах культивирования.

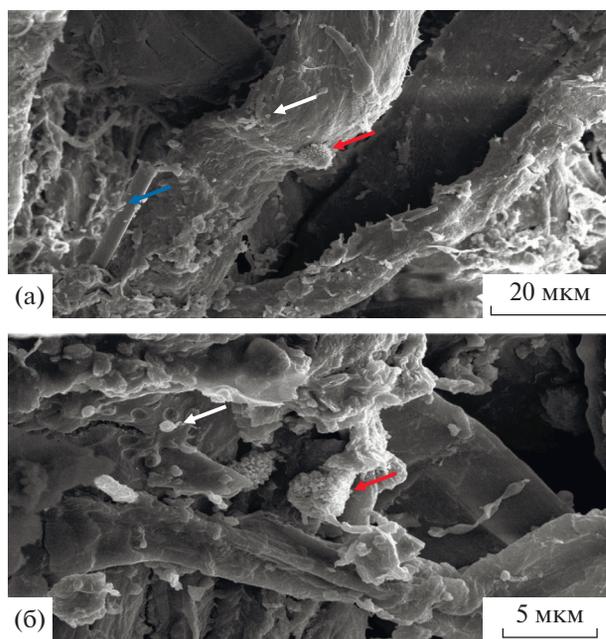


Рис. 1. Микрофотографии бумаги из манускрипта *Al-Adoviah al-Mufradah*, полученные с помощью ПЭСЭМ в высоком вакууме с золотым напылением образцов. (а) Общий вид заселения целлюлозных волокон клетками бактерий (белая стрелка), мицелием и спорами грибов (красная стрелка). Видны кристаллы соли (синяя стрелка) и расслоение волокон целлюлозы. Увеличение $4000\times$. (б) Отдельные клетки бактерий и цепочки клеток; структуры с отростками, напоминающими конидии грибов. Можно отличить клетки бактерий (меньше 1 мкм , белая стрелка) от конидий грибов (красная стрелка). Увеличение $13000\times$.

Применительно к результатам, полученным нами для изолятов бактерий и грибов (табл. 3), стоит отметить следующее. Три из девяти штаммов рода *Bacillus*, а именно: B1, B5 и B10 (родственные *B. atrophaeus*, *B. velezensis* и *B. licheniformis* соответственно), произвели все три типа ферментов (целлюлазы, амилазы и протеазы). Для трех штаммов *Bacillus*, а именно: B2 (родственный *B. mojavensis*), B4 (родственный *B. filamentosus*) и B11 (*B. idriensis*), наблюдался синтез двух ферментов: амилазы и протеазы у B2 и целлюлазы и протеазы у B4 и B11. У двух других штаммов рода *Bacillus*, B8 (*B. niacini*) и B9 (родственного *B. cheonanensis*), наблюдался только один тип ферментативной активности: целлюлазная у B8 и протеазная у B9. У штамма B7 (родственного *B. humi*) гидролитическая активность отсутствовала. Два изолята, представляющих *Actinobacteria*, B3 (*Corynebacterium sanguinis*) и B6 (родственный *Streptomyces rochei*), синтезировали только целлюлазу. Тесты на ферменты гидролиза у изолятов грибов показали, что три штамма (F1, F2 и F3), в том числе два штамма рода *Aspergillus* (родственные *A. versicolor* и *A. sydowii*) и один штамм рода *Alternaria* (*Alt. alternata*), проявляли

Таблица 3. Гидролитическая активность штаммов бактерий (В) и грибов (F), наблюдаемая после 48 и 72 ч культивирования соответственно

Изоляты бактерий и грибов	Целлюлазы	Амилазы	Протеазы
B1	++	+	+++
B2	—	++	+++
B3	+	—	—
B4	+	—	++
B5	++	++	+++
B6	++	—	—
B7	—	—	—
B8	++	—	—
B9	—	—	+
B10	++	+	++
B11	++	—	+++
F1	+	+	+
F2	++	+	++
F3	+	+	++
F4	+++	—	—

Гидролизная активность: “—” — отсутствует (нет гало); “+” — низкая (гало до 1.5 см в диаметре); “++” — умеренная (гало до 2.5 см в диаметре); “+++” — сильная (гало до 3.5 см в диаметре).

все три типа активности. У изолята F4 (*A. niger*) был подтвержден синтез целлюлазы, но активности амилаз и протеаз не наблюдалось. Таким образом, подавляющее большинство изолятов бактерий и грибов (за исключением штаммов B2, B7 и B9) могли производить целлюлазу. Протеазная активность наблюдалась у меньшего числа изолятов, и часть штаммов (B3, B6, B7, B8, и F4) не проявляли протеазной активности. Амилазная активность наблюдалась у семи из 15 изолятов (B1, B2, B5, B10, и F1, F2, F3).

Микробное разнообразие по данным высокопроизводительного секвенирования. Результаты секвенирования на платформе Illumina были получены в форме двух файлов FASTQ, представляющих библиотеки грибов и бактерий. Тот факт, что в первом туре ПЦР не наблюдалось амплификации архейных генов 16S рРНК (участок V3–V4) указывает, что этот домен не представлен в составе микробного сообщества манускрипта.

Состав сообщества бактерий по данным секвенирования. После обработки данные по бактериям включали 6589 валидных ридов, которые были отнесены к 63 ОТЕ; в результате таксономической классификации были идентифицированы 20 родов и семь видов. Согласно данным метагеномного секвенирования, сообщество бактерий включало три филума. Самым многочисленным

был филум *Proteobacteria* (74.16% ридов; 41 ОТЕ); за ним следовали *Actinobacteria* (16.57% ридов; 10 ОТЕ) и *Firmicutes* (9.12% ридов; 10 ОТЕ). На уровне класса, 70.92% ридов относились к *Gammaproteobacteria*, 16.57% ридов — к *Actinobacteria*, 9.12% ридов — к *Bacilli* и 3.25% ридов — к *Alphaproteobacteria*. На уровне семейства наиболее многочисленными были *Pseudomonadaceae* (58.0%), *Enterobacteriaceae* (11.1%), *Micrococcaceae* (10.1%), и *Bacillaceae* (5.9%). Остальные 15% ридов составляли другие семейства бактерий. На уровне рода самыми многочисленными были представители *Pseudomonas* (58%), а самым многочисленным видом по числу ридов был *Pseudomonas stutzeri* (55.2%). Состав сообщества бактерий на уровне филумов, семейств и родов представлен на диаграммах рис. 2.

Состав сообщества грибов по данным секвенирования. Данные, относящиеся к грибам, после удаления шумов, слияния и фильтрации химер включали 57353 достоверных прочтений и были отнесены к 139 ОТЕ. Наиболее представленным по числу ридов и ОТЕ был филум *Ascomycota*: 96.55% ридов; 96 ОТЕ. Кроме того, в сообществе были обнаружены представители филумов *Mucoromycota* (1.70% ридов; 3 ОТЕ) и *Basidiomycota* (1.04% ридов; 26 ОТЕ); небольшое число оставшихся ридов были отнесены к *Rozellomycota* (0.41% ридов; 1 ОТЕ) и *Entorrhizomycota* (0.003% ридов; 1 ОТЕ). Всего в сообществе грибов было аннотировано 59 семейств, 62 рода и 54 вида. Наиболее представленным семейством оказались *Aspergillaceae* (92.0%). Наиболее многочисленными таксонами в сообществе оказались *Penicillium* (58.89%) и *Aspergillus* (33.02%) на уровне рода и *Penicillium polonicum* (55.45%) и *Aspergillus ruber* (22.55%) на уровне вида. Состав сообщества грибов на уровне филумов, семейств и родов представлен на диаграммах рис. 3.

ОБСУЖДЕНИЕ

Предварительный анализ фрагментов бумаги с помощью ПЭСЭМ выявил сравнительно плотное микробное обсеменение бумажных волокон, в том числе клетки бактерий и структуры грибов (конидии и мицелий). Изображения, полученные при меньшем увеличении, показали отложение кристаллов соли вдоль целлюлозных волокон, что может быть обусловлено процессами производства бумаги, проклейкой и примесями в материалах. Согласно исследованиям биодеградации объектов культурного наследия, некоторые бактерии и грибы, в том числе *Aspergillus*, *Penicillium*, *Bacillus*, *Arthrobacter* и *Streptomyces*, могут выделять органические кислоты, которые растворяют материал и образуют отложения соли, видимые на изображениях SEM (Bicchieri et al., 2019).

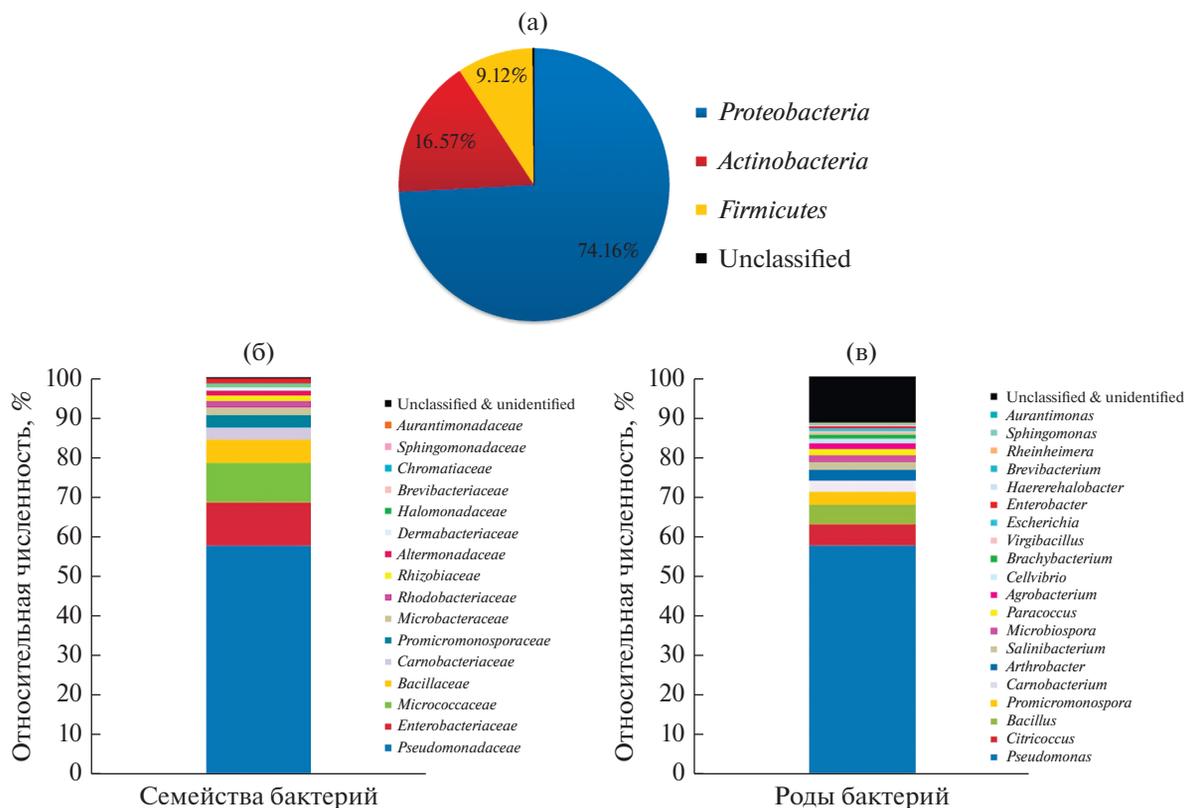


Рис. 2. Доля в сообществе различных групп бактерий на уровне филумов (а), семейств (б) и родов (в).

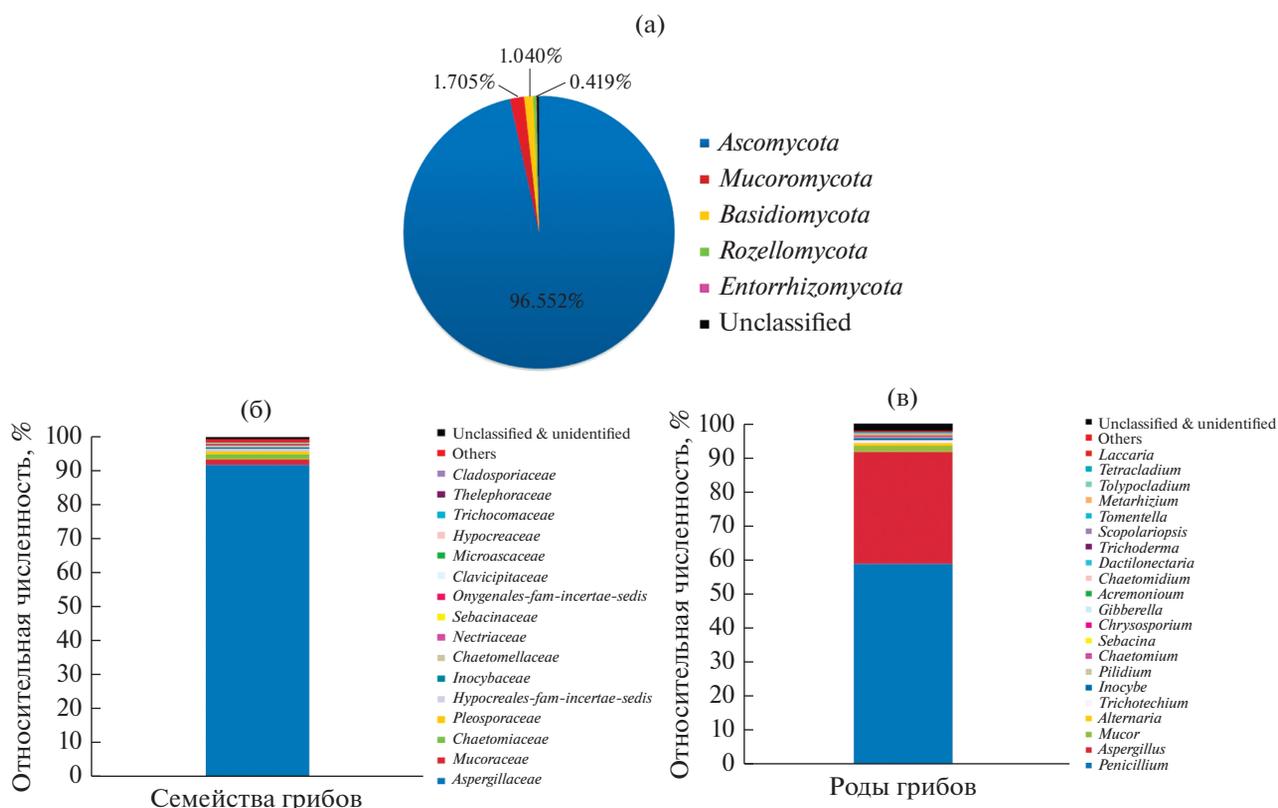


Рис. 3. Доля в сообществе различных групп грибов на уровне филумов (а), семейств (б) и родов (в).

После предварительной оценки с помощью ПЭСЭМ с нескольких участков бумаги были неинвазивно взяты пробы, чтобы оценить жизнеспособность микроорганизмов. В результате последующего культивирования были выделены штаммы, представляющие сообщество бактерий и грибов. Поиск архей в микробном сообществе манускрипта, как культуральными методами, так и с помощью высокопроизводительного секвенирования, дал отрицательный результат. Данные, приведенные в табл. S1 и S2, показывают, что плотность культивируемых микроорганизмов на единицу площади (КОЕ/см²) на первой и последней страницах была выше, чем в середине книги, возможно, потому, что эти страницы больше подвергались воздействию пыли и грязных рук.

Как отмечено выше, культуральными методами было выделено девять штаммов рода *Bacillus*; они были идентифицированы секвенированием генов 16S рРНК. Ранее сообщалось, что различные виды рода *Bacillus* участвуют в заселении и разрушении культурных артефактов из бумаги (Principi et al., 2011; Piñar et al., 2015). Бактерии этого рода, по-видимому, вносят вклад в развитие пятен фоксинга (Karakasidou et al., 2018), которые обильно присутствуют на исследуемом манускрипте. Среди штаммов, выделенных с манускрипта, был и штамм *B. licheniformis*. В работе Jacob et al. (2015) описано выделение этой бактерии из бумажных документов XIX в. Согласно этой статье, низкомолекулярные пептиды, синтезируемые *B. licheniformis*, могут действовать как внутренний фактор, сдерживающий развитие разрушающих сообществ грибов на поверхности бумаги (Jacob et al., 2015). Кроме того, выделение других видов рода *Bacillus*, в частности, *B. atrophaeus*, *B. idriensis* и *B. niacini*, согласуется с результатами более ранних исследований бактериальных сообществ бумажных объектов и целлюлозных материалов (Suihko, Stackebrandt, 2003; Gutarowska, 2016). Результаты секвенирования на платформе Illumina тоже указывают на присутствие членов рода *Bacillus* в микробном сообществе (4.9% ридов). За исключением *B. muralis*, эти риды были аннотированы до уровня семейства или рода, что объясняет более высокое разнообразие видов *Bacillus*, обнаруженных культуральным методом. *B. muralis* обнаруживали и в других исследованиях микробных сообществ культурных и исторических артефактов, например, настенных росписей в Испании и Германии (Neugman et al., 2005), и бумажных манускриптов, например, “Атлантического кодекса” Леонардо да Винчи (Tarsitani et al., 2014).

Кроме того, с манускрипта были выделены и идентифицированы частичным секвенированием еще два вида: *Corynebacterium sanguinis* и *Streptomyces rocheie* (*Actinobacteria*). Наиболее существенное свойство актинобактерий — устойчивый вторичный

метаболизм пигментов и органических кислот, которые играют ключевую роль в биодеградации культурного наследия, окрашивая материалы и разрушая органические вещества (Duan et al., 2017). Согласно Jaén-Luchoro et al. (2020), штаммы *C. sanguinis* ранее выделялись из естественных (водных и промышленных) образцов. Этот вид имеет большое генетическое сходство с *C. lipophylloflavum*, видом с выраженной способностью к синтезу целлюлазы (Sakthivel et al., 2010; Jaén-Luchoro et al., 2020). В работе Sato et al. штаммы рода *Streptomyces* были выделены из пятен и поврежденных участков бумажных объектов, затопленных в результате цунами 2011 г. в Японии (Sato et al., 2014). С другой стороны, оценивалась также роль различных видов рода *Streptomyces*, в том числе *S. rocheie*, в разрушении древесины и целлюлозных материалов (Lupan et al., 2014). Результаты тестов на синтез ферментов указывают, что выделенные штаммы могут иметь потенциал к разрушению бумажных материалов.

Согласно данным секвенирования на платформе Illumina, самым представленным видом по числу ридов был *P. stutzeri*. Различные штаммы рода *Pseudomonas* ранее выделялись из памятников культуры (поверхность фрески) и окружающей воздушной среды (Pangallo et al., 2012); из-за высокой устойчивости к антимикробным биоцидам они могут вызывать вторичный микробный кризис (Bastian et al., 2009). Виды рода *Pseudomonas* не переносят кислых условий, и ни один из них не способен расти при pH ниже 4.5 (Lalucat et al., 2006). Можно сделать вывод, что в определенный момент манускрипт был заражен этим штаммом. Однако химический распад бумаги и синтез органических кислот вследствие грибковой колонизации привели к тому, что материал приобрел кислую реакцию pH (pH 4.1), и в результате рост и выживание штаммов *Pseudomonas* стали невозможны. С другой стороны, тот факт, что представители *Pseudomonas* не формируют спор, тоже повлиял на их плохую выживаемость и на невозможность выделить их культуральными методами.

Присутствие рода *Promicromonospora* (3.1% ридов) может быть связано с загрязнением среды, где хранилась рукопись, пылью и кутикулами насекомых (Mohammadipanah et al., 2017). Представители рода *Arthrobacter* (2.9% ридов) ранее идентифицировались в почве, в воздухе старых зданий и на культурных артефактах. Мембраны бактерий рода *Arthrobacter* содержат каротиноидные пигменты, например β-каротин и α-бактериоруберин. Таким образом, колонизация этими штаммами может привести к обесцвечиванию и развитию фоксинга (Piñar et al., 2015; Duan et al., 2017).

В сообществе были идентифицированы представители родов *Escherichia* (0.6%) и *Enterobacter* (0.5%), принадлежащих к семейству *Enterobacteri-*

aceae и включающих колиформные бактерии; следовательно, существовала возможность загрязнения манускрипта в результате контакта с грязными руками или фекалиями животных.

В нашей работе был аннотирован (на уровне рода или вида) также ряд других бактерий, которые ранее определялись в работах на бумажных материалах или других объектах культурного наследия, а именно: *Carnobacterium* и *Salinibacterium*, 2.9 и 2.0% родов соответственно (Gutarowska 2016); *Microbispora rosea*, 1.7% родов (Karbowska-Berent et al., 2011); *Paracoccus marcusii*, 1.6% родов (Lupan et al., 2014); *Cellvibrio*, 1.21% родов (Harkawy et al., 2011); *Brachybacterium*, 1.1% родов (Zhgun et al., 2020); *Virgibacillus picturae*, 1.0% родов (Sterflinger, Piñar, 2013).

Большинство видов рода *Aspergillus*, выделенных с манускрипта, в том числе *A. versicolor*, *A. niger* и *A. sydowii*, могут расти в условиях низкой доступности воды и играют значимую роль в разрушении архивных и библиотечных материалов, синтезируя ферменты гидролиза (Zghair, 2019). В то же время, результаты секвенирования на платформе Illumina показали, что представители *Aspergillus* составляли значительную долю сообщества (33.02%). Некоторые виды, идентифицированные этим методом, например, *A. ruber* (22.55%) и *A. penicillioides* (0.84%), ранее выделялись с целлюлозных материалов, например, исторических рукописей и музейных предметов из материала dluwang (ткань из коры, изготавливаемая путем отбивания коры тутового дерева); оценивалась их роль в разрушении бумаги и образовании кирпично-красных пятен (Oetari et al., 2016; Liu et al., 2018).

Согласно результатам секвенирования на платформе Illumina, наиболее многочисленным родом грибов был *Penicillium* (58.89%). Большинство видов рода *Penicillium* проявляют значительную ферментативную активность и могут разлагать органические вещества. Представители *Penicillium* выделялись из проб аэрозолей, отобранных в музеях, библиотеках и архивах, так что при наличии подходящих условий для роста они могут представлять собой угрозу для бумажных материалов (Karbowska-Berent et al., 2011; Zhang et al., 2019).

Род *Alternaria* – еще одна составляющая сообщества грибов, обнаруживаемая как при культивировании, так и секвенированием. Различные виды *Alternaria* часто обнаруживаются в зонах хранения библиотек и архивов; известно, что они могут быть факторами биоразрушения бумаги и целлюлозных материалов (Mesquita et al., 2009).

Представители *Chaetomiaceae*, в том числе родов *Chaetomium* и *Chaetomidium*, составляли 1.4% родов. Ранее оба рода выделялись из атмосферы хранилищ (Skóra et al., 2015) и объектов письменного наследия (Gutarowska, 2016). Представители

этих родов синтезируют гидролитические ферменты и антибиотики и, таким образом, обладают разрушающей и бактериолитической активностью (Sterflinger, Piñar, 2013; Piñar et al., 2015).

Кроме того, секвенирование на Illumina выявило таксоны *Mucor*, *Trichoderma*, *Chrysosporium*, *Acremonium* и *Scopulariopsis*, которые также отмечались в предыдущих исследованиях грибковых сообществ библиотек и архивов (Pinheiro et al., 2011, 2019).

Проведенные тесты ферментативной активности (табл. 3) показали, что большинство микробных изолятов производят целлюлазу и несут риск разрушения объектов из бумаги. Выделение штаммов с протеолитической и амилолитической активностью может быть связано с возможным использованием на поверхности исторических бумаг животных клеев с белковой структурой и крахмальным наполнителем. В то же время, образцы с первой и последней страниц книги (прилегающих к кожаной обложке богатой коллагеном) могут послужить для выделения протеолитических штаммов.

Бумага рукописи имела кислую реакцию (рН 4.1). Под воздействием кислой среды волокна, состоящие из целлюлозных цепочек, регулярно распадаются на меньшие фрагменты. Присутствие закисляющих веществ в бумаге может быть связано с разными факторами, в том числе с абсорбцией загрязняющих веществ из воздуха и окружающей среды (оксиды серы и азота в воздухе, низкокачественные контейнеры) и с внутренними характеристиками бумаги (исходный материал и процесс производства). В то же время, грибы могут выделять соединения с кислой реакцией, чтобы изменить рН субстрата в соответствии со своими потребностями роста (Area, Cheradame, 2011). Некоторые виды *Aspergillus* (*A. niger* и *A. versicolor*) и *Penicillium* оказались способны значительно снижать рН среды (до 4 единиц рН). Поскольку бумажные материалы очень чувствительны к кислотному гидролизу, тот факт, что обычные виды грибов имеют выраженную способность синтезировать метаболиты с кислой реакцией, подразумевает ключевую роль сообщества грибов в их разрушении (Pinheiro et al., 2019).

Результаты нашей работы показали, что ПЭСЭМ – подходящий инструмент предварительного скрининга микробного заселения объектов из бумаги. Сравнение результатов, полученных культуральными методами и с помощью высокопроизводительного секвенирования, показало, что последний метод имел преимущество при описании микробного разнообразия исторических документов. С другой стороны, в обнаружении потенциально активных разрушительных штаммов главная роль принадлежит культуральным исследованиям и анализу ферментативной

активности. Таким образом, наилучшим выбором было бы сочетать эти подходы для многофакторной оценки микробных сообществ. Вопрос о присутствии архей в микробных сообществах различных объектов исторического наследия и их участия в биоразрушении требует дальнейшего изучения.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность за поддержку этого исследования Университету Тегерана и Национальной Библиотеке и Архивам Ирана за предоставленные возможности. Мы также признательны Dr. Sajjad Sargikhan, менеджеру Молекулярного Банка Иранского Центра Биологических Ресурсов (Iranian Biological Resource Center, IBRC), и другим экспертам этого центра за ценную научную помощь.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Авторы заявляют, что им не известно о конфликтах финансовых интересов или личных отношений, которые могли бы повлиять на публикуемую работу. Эта статья не содержит результатов исследований, в которых в качестве объектов использовались бы люди или животные.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Area M.C., Cheradame H.* Paper aging and degradation: recent findings and research methods // *BioResources*. 2011. V. 6. P. 5307–5337.
<https://doi.org/10.15376/biores.6.4.5307-5337>
- Bastian F., Alabouvette C., Jurado V., Saiz-Jimenez C.* Impact of biocide treatments on the bacterial communities of the Lascaux Cave // *Naturwissenschaften*. 2009. V. 96. P. 863–868.
<https://doi.org/10.1007/s00114-009-0540-y>
- Bicchieri M., Biocca P., Colaizzi P., Pinzari F.* Microscopic observations of paper and parchment: the archaeology of small objects // *Herit. Sci*. 2019. V. 7(1). P. 1–12.
<https://doi.org/10.1186/s40494-019-0291-9>
- Duan Y., Wu F., Wang W., He D., Gu J.D., Feng H., Chen T., Liu G., An L.* The microbial community characteristics of ancient painted sculptures in Maijishan Grottoes, China // *PLoS One*. 2017. V. 12 (7).
<https://doi.org/10.1371/Journal.Pone.0179718>
- Gutarowska B.* (Ed.). *A Modern Approach to Biodeterioration Assessment and Disinfection of Historical Book*, Lodz Univ. Technol., 2016. <https://docplayer.net/50335305-Modern-approach-for-biodeterioration-assessment-and-disinfection-of-historical-book-collections.html>
- Harkawy A., Górny R.L., Ogierman L., Wlazło A., Ławniczek-Wałczyk A., Niesler A.* Bioaerosol assessment in naturally ventilated historical library building with restricted personnel access // *Ann. Agric. Environ. Med*. 2011. V. 18. P. 323–329. <http://www.aem.pl/Bioaerosol-assessment-in-naturally-ventilated-historical-library-building-with-restricted,71708,0,2.html>

Heyrman J., Logan N.A., Rodríguez-Díaz M., Scheldeman P., Lebbe L., Swings J., Heyndrickx M., De Vos P. Study of mural painting isolates, leading to the transfer of “*Bacillus maroccanus*” and “*Bacillus carotarum*” to *Bacillus simplex*, emended description of *Bacillus simplex*, re-examination of the strains previously attributed to “*Bacillus macroides*” and description of *Bacillus muralis* sp. nov. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. 2005. V. 55. P. 119–131. <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijms.0.63221-0>
<https://doi.org/10.1099/ijms.0.63221-0>

Jacob S., Bhagwat A.M., Kelkar-mane V. *Bacillus* species as an intrinsic controller of fungal deterioration of archival documents // *Int. Biodeterior. Biodegrad*. 2015. V. 104. P. 46–52.

<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.05.001>

Jaén-Luchoro D., Gonzales-siles L., Karlsson R., Svensson-stadler L., Molin K., Cardew S., Jense-Markopolous S., Ohlén M., Inganäs E., Skovbjerg S., J. Tindall B., Moore E., *Corynebacterium sanguinis* sp. nov., a clinical and environmental associated *Corynebacterium* // *Syst. Appl. Microbiol*. 2020. V. 43.

<https://doi.org/10.1016/j.syapm.2019.126039>

Joseph E. (Ed). *Microorganisms in the Deterioration and Preservation of Cultural Heritage*. Springer Nature, 2021.

Karakasidou K., Nikolouli K., Amoutzias G.D., Pournou A., Manassis C., Tsiamis G., Mossialos D. Microbial diversity in biodeteriorated Greek historical documents dating back to the 19th and 20th century: a case study // *Microbiologyopen*. 2018. V. 7.

<https://doi.org/10.1002/mbo3.596>

Karbowska-Berent J., Górny R.L., Strzelczyk A.B., Wlazło A. Airborne and dust borne microorganisms in selected Polish libraries and archives // *Build. Sci*. 2011. V. 46. P. 1872–1879.

<https://doi.org/10.1016/j.buildenv.2011.03.007>

Kasana R.C., Salwan R., Dhar H., Dutt S., Gulati A. A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using Gram’s iodine // *Curr. Microbiol*. 2008. V. 57. P. 503–507.

<https://doi.org/10.1007/s00284-008-9276-8>

Lalucat J., Bennasar A., Bosch R., García-Valdés E., Palleroni N.J. Biology of *Pseudomonas stutzeri* // *Microbiol. Mol. Biol. Rev*. 2006. V. 70. P. 510–547.
<https://doi.org/10.1128/mmbr.00047-05>

Liu Z., Zhang Y., Zhang F., Hu C., Liu G., Pan J. Microbial community analyses of the deteriorated storeroom objects in the Tianjin Museum using culture-independent and culture-dependent approaches // *Front. Microbiol*. 2018. V. 9.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00802>

Lupan I., Ianc M.B., Keleme B.S., Carpa R., Rosca-Casian O., Chiriac M.T., Popescu O. New and old microbial communities colonizing a seventeenth-century wooden church // *Folia Microbiol*. 2014. V. 59. P. 45–51.

<https://doi.org/10.1007/s12223-013-0265-3>

Mesquita N., Portugal A., Videira S., Rodríguez-Echeverría S., Bandeira A.M.L., Santos M.J.A., Freitas H. Fungal diversity in ancient documents. A case study on the Archive of the University of Coimbra // *Int. Biodeterior. Biodegrad*. 2009. V. 63. P. 626–629.
<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2009.03.010>

Mohammadipanah F., Montero-Calasanz M.D.C., Schumann P., Spröer C., Rohde M., Klenk H.P. *Promicrospora kermanensis* sp. nov., an actinobacterium isolate

- ed from soil // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2017. V. 67. P. 262–267.
<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001613>
- Nikou M.M., Ramezan M., Harirchi S., Makzoom S., Amoozegar M. A., Abolhassan S., Fazeli S., Schumann P., Ventosa A. Salinifilum gen. nov., with description of Salinifilum proteinilyticum sp. nov., an extremely halophilic actinomycete isolated from Meighan wetland, Iran, and reclassification of Saccharopolyspora aidingensis as Salinifilum aidingensis comb. nov. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2017. V. 67. P. 4221–4227.
<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002286>
- Oetari A., Susetyo-Salim T., Sjamsuridza W., Suherman, E.A., Monica M., Wongso R., Fitri R., Nurlaili D.G., Ayu D.C., Teja T.P.* Occurrence of fungi on deteriorated old dluwang manuscripts from Indonesia // *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 2016. P. 114. P. 94–103.
<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.05.025>
- Otlewska A., Adamiak J., Gutarowska B.* Application of molecular techniques for the assessment of microorganism diversity on cultural heritage objects // *Acta Biochim. Pol.* 2014. P. 61. P. 217–225.
- Pangallo D., Kraková L., Chovanová K., Šimonovičová A., De Leo F., Urzì C.* Analysis and comparison of the microflora isolated from fresco surface and from surrounding air environment through molecular and biodegradative assays // *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2012. V. 28. P. 2015–2027.
<https://doi.org/10.1007/s11274-012-1004-7>
- Piñar G., Sterflinger K., Etenauer J.* A combined approach to assess the microbial contamination of the Archimedes palimpsest // *Microb. Ecol.* 2015. V. 69. P. 118–134.
<https://doi.org/10.1007/s00248-014-0481-7>
- Piñar G., Sterflinger K., Pinzari F.* Unmasking the measles-like parchment discoloration: molecular and microanalytical approach // *Environ. Microbiol.* 2015. V. 17. P. 427–443.
<https://doi.org/10.1111/1462-2920.12471>
- Pinheiro A.C., Macedo M.F., Jurado V., Saiz-jimenez C., Viegas C., Brandão J., Rosado L.* Mould and yeast identification in archival settings: preliminary results on the use of traditional methods and molecular biology options in Portuguese archives // *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 2011. V. 65. P. 619–627.
<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2011.02.008>
- Pinheiro A.C., Sequeira S.O., Macedo M.F.* Fungi in archives, libraries, and museums: a review on paper conservation and human health // *Crit. Rev. Microbiol.* 2019. V. 45. P. 686–700.
<https://doi.org/10.1080/1040841X.2019.1690420>
- Principi P., Villa E., Sorlini C.* Molecular studies of microbial community structure on stained pages of Leonardo da Vinci's Atlantic Codex // *Microb. Ecol.* 2011. V. 61. P. 214–222.
<https://doi.org/10.1007/s00248-010-9741-3>
- Sakthivel M., Karthikeyan N., Jayaveny R., Palani P.* Optimization of culture conditions for the production of extracellular cellulase from *Corynebacterium lipophiloflavum* // *J. Ecobiotechnol.* 2010. V. 2. P. 6–13.
- Sato Y., Aoki M., Kigawa R.* Microbial deterioration of tsunami-affected paper-based objects: a case study // *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 2014. V. 88. P. 142–149.
<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.12.007>
- Savković Ž., Stupar M., Unković N., Ivanović Ž., Blagojević J., Vukojević J., Ljaljević Grbić M.* In vitro biodegradation potential of airborne *Aspergilli* and *Penicillia* // *Sci. Nat.* 2019. V. 106.
<https://doi.org/10.1007/s00114-019-1603-3>
- Schabereiter-Gurtner C., Pinar G., Lubitz W., Rolke S.* An advanced molecular strategy to identify bacterial communities on art objects // *J. Microbiol. Methods.* 2001. V. 45. P. 77–87.
- Sequeira S.O., De Carvalho H.P., Mesquita N., Portugal A., Macedo M.F.* Fungal stains on paper: is what you see what you get? // *Conserv. Patrimônio.* 2019. V. 32. P. 18–27.
- Skóra J., Gutarowska B., Pielech-Przybylska K., Stepień Ł., Pietrzak K., Piotrowska M., Pietrowski P.* Assessment of microbiological contamination in the work environments of museums, archives and libraries // *Aerobiologia.* 2015. V. 31. P. 389–401.
<https://doi.org/10.1007/s10453-015-9372-8>
- Sterflinger K., Piñar G.* Microbial deterioration of cultural heritage and works of art – tilting at windmills? // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2013. V. 97. P. 9637–9646.
<https://doi.org/10.1007/s00253-013-5283-1>
- Sterflinger K., Pinzari F.* The revenge of time: fungal deterioration of cultural heritage with particular reference to books, paper // *Environ. Microbiol.* 2012. V. 14. P. 559–566.
<https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02584.x>
- Strlič M., Kolar J., Kočar D., Drnovsek T., Šelih V.S., Susič R., Pihlar B.* What is the pH of alkaline paper? // *e-Preserv. Sci.* 2004. № 1. P. 35–47.
- Suihko M., Stackebrandt E.* Identification of aerobic mesophilic bacilli isolated from board and paper products containing recycled fibers // *J. Appl. Microbiol.* 2003. V. 94. P. 25–34.
- Tarsitani G., Moroni C., Cappitelli F., Pasquariello G., Maggi O.* Microbiological analysis of surfaces of Leonardo da Vinci's Atlantic Codex: biodeterioration risk // *Int. J. Microbiol.* 2014.
<https://doi.org/10.1155/2014/214364>
- Tedersoo L., Sánchez-Ramírez S., Kõljalg U., Bahram M., Döring M., Schigel D., May T., Reyberg M., Abarenkov K.* High-level classification of the Fungi and a tool for evolutionary ecological analyses // *Fungal Divers.* 2018. V. 90. P. 135–159.
<https://doi.org/10.1007/s13225-018-0401-0>
- Zghair A.* Enzymatic efficacy of some types of *Aspergillus* fungi isolated from some manuscripts and its effect on some of the physical and chemical properties of the manuscripts // *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering.* Institute of Physics Publishing. 2019. V. 571. № 1. P. 012043.
- Zhang F., Li L., Sun M., Hu C., Zhang Z., Liu Z., Shao H., Xi G., Pan J.* Fungal community analyses of a pirogue from the Tang Dynasty in the National Maritime Museum of China // *Appl. Sci.* 2019. V. 9(19).
<https://doi.org/10.3390/app9194129>
- Zhgun A., Avdanina D., Shumikhin K., Simonenko N., Lyubavskaya E., Volkov I., Ivanov V.* Detection of potential biodeterioration risks for tempera painting in 16th century exhibits from State Tretyakov Gallery // *PLoS One.* 2020. V. 15. e0230591.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230591>

MICROBIAL COMMUNITY OF AN 11TH CENTURY MANUSCRIPT BY BOTH CULTURE-DEPENDENT AND INDEPENDENT APPROACHES

N. Raeisnia¹, E. Arefian¹, *, and M. A. Amoozegar¹, **

¹Department of Microbiology, School of Biology, College of Science, University of Tehran, Tehran, Iran

*e-mail: arefian@ut.ac.ir

**e-mail: amoozegar@ut.ac.ir

Received December 14, 2021; revised January 22, 2022; accepted January 22, 2022

Abstract—In this study, the microbial community (*Bacteria*, *Archaea*, and *Fungi*) of a historical manuscript was investigated by microscopic observation (field emission scanning electron microscopy), culture-dependent methods, and sequencing of amplicons on the Illumina MiSeq platform. Microbial isolates were also assayed for production of hydrolytic enzymes (cellulase, amylase, and protease). Observation of gold-coated paper samples in high-vacuum mode revealed bacterial cells, conidia, and fungal mycelium among the fibers. Eleven bacterial strains, including species of *Bacillus*, *Streptomyces*, *Corynebacterium*, and four fungal strains, including species of *Aspergillus* and *Alternaria*, were isolated by culture-dependent methods and identified by 16S rRNA and ITS sequencing, by comparison with the EzBioCloud and MycoBank databases, respectively. Illumina MiSeq sequencing revealed the presence of 20 bacterial genera, including *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Citrococcus*, *Promicromonospora*, *Carnobacterium*, *Arthrobacter*, *Salinibacterium*, and *Streptomyces*. According to the number of reads, *Pseudomonas* (58%) was the most abundant genus and *P. stutzeri* (55.2%) was the most abundant bacterial species. Sequencing results of fungal amplicons indicated 62 genera, including *Penicillium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Mucor*, and *Chaetomium*. *Penicillium* (58.89%) and *Aspergillus* (33.02%) were the most abundant genera. *P. polonicum* (55.45%) and *A. ruber* (22.55%) were the most abundant species of the fungal community. The results of searching for archaea in the microbial community of the manuscript by culture-dependent and high-throughput amplicon sequencing were negative. The enzymatic activity of microbial isolates indicated a potential risk of biodeterioration. It seems that using a combination of culture-dependent and high-throughput sequencing methods has a significant advantage over using them individually.

Keywords: biodeterioration, culturable microorganism, next-generation sequencing, Illumina MiSeq, enzymatic activity, paper material