## \_\_\_\_\_ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ \_\_\_\_\_ СТАТЬИ

# СОСТАВ МИКРОБНЫХ ОБРАСТАНИЙ НА ПОВЕРХНОСТИ ПЛАСТИКОВ И СТАЛИ, ЭКСПОНИРОВАННЫХ В ВОДОЕМЕ НА ПОЛИГОНЕ ТВЕРДЫХ БЫТОВЫХ ОТХОДОВ<sup>1</sup>

© 2022 г. Т. П. Турова<sup>а</sup>, Д. Ш. Соколова<sup>а</sup>, Е. М. Семенова<sup>а</sup>, Д. М. Киреев<sup>b</sup>, А. Б. Лаптев<sup>c</sup>, Т. Н. Назина<sup>а</sup>, \*

<sup>а</sup>Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, 119071 Россия <sup>b</sup>Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Уфимский государственный нефтяной технический университет", Уфа, 450064 Россия

<sup>с</sup>Федеральное государственное унитарное предприятие "Всероссийский научно-исследовательский институт авиационных материалов" НИЦ "Курчатовский институт", Москва, 105005 Россия

\*e-mail: nazina@inmi.ru
Поступила в редакцию 09.06.2022 г.
После доработки 05.07.2022 г.
Принята к публикации 07.07.2022 г.

Целью настоящей работы было исследование состава микробных сообществ, формирующихся на поверхности образцов полиэтилентерефталатных ( $\Pi$ ЭТ), полистирольных ( $\Pi$ С) и стальных (CТ) материалов, которые экспонировались в небольшом водоеме, расположенном на территории полигона твердых бытовых отходов (ТБО). Таксономический состав бактерий и микроскопических грибов был определен методом высокопроизводительного секвенирования V4 региона гена 16S рРНК и ITS рибосомного оперона соответственно. В результате биоинформатического анализа было показано доминирование бактерий филумов Pseudomonadota (Proteobacteria), Actinomycetota, Bacteroidota и Bacillota в обрастаниях на всех образцах. Наблюдались количественные изменения в составе доминирующих таксонов бактерий, связанные в основном со временем экспозиции, а не с материалом образцов. С использованием программы iVikodak были предсказаны функциональные характеристики бактерий в обрастаниях. Показана потенциальная способность исследуемых бактериальных сообществ осуществлять легралацию полимерных материалов и ксенобиотиков, а также коррозию стали. В сообществах грибов доминировали сапротрофные представители филумов Ascomycota и Ваsidiomycota. Влияние условий водной среды на общий состав сообщества грибов в процессе экспозиции оказалось менее существенным, чем для бактерий, оно прослеживалось для отдельных родов грибов, так же, как и влияние материала образцов. В составе доминирующих грибов, выявлены виды потенциально способные к биодеградации полимеров и коррозии металлов. Микрофотографии подтвердили локальное разрушение исходных образцов материалов в результате экспозиции в водной среде. Выделены чистые культуры бактерий родов Bacillus и Brevundimonas, деградирующие алканы, жирные кислоты и фенолы.

**Ключевые слова:** полигоны твердых бытовых отходов, высокопроизводительное секвенирование, 16S pPHK, ITS, бактерии, грибы, полиэтилентерефталат, полистирол, сталь, ксенобиотики, функциональная активность, биодеградация

DOI: 10.31857/S0026365622600523

Вода и водные объекты являются наиболее значимыми условиями существования живых организмов, включая человека. Изучение экологического состояния пресноводных водоемов, а также изменения его в результате антропогенного воздействия является важнейшей задачей. Основными источниками загрязнения водных объек-

тов являются промышленные и бытовые сточные воды, хотя в современных условиях для их очистки все чаще применяется "экологически чистая" биологическая утилизация отходов. Основой таких очистных сооружений являются сообщества микроорганизмов, которые с течением времени подстраиваются по своему составу и ферментативному аппарату под перерабатываемые субстраты, в том числе, полимеры и токсичные ксенобиотики. Кроме того, для уменьшения объема промышленных сточных вод, требующих специ-

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0026365622600523 для авторизованных пользователей.

альной очистки, широко применяют повторное использование воды, так называемые "оборотные воды", циркулирующие в замкнутом цикле или используемые в других стадиях производства. Как показали проведенные нами ранее исследования, оборотные воды нефтехимического предприятия могут являться возможным источником бактерий — потенциальных деструкторов синтетических полимеров (Турова и соавт., 2020). При этом в оборотной воде наблюдалась селекция биодеструкторов, а их разнообразие и доля в сообществе возрастала (Laptev et al., 2021).

Большую опасность для природных водоемов представляют также полигоны твердых бытовых отходов (ТБО), которые могут оказывать значительное негативное влияние на качество как подземных вод, так и наземных природных водных объектов. Воздействие ТБО на почву и водоемы обусловлено миграцией жидкого фильтрата, образующегося в результате процессов деградации отходов. В настоящее время ведутся активные исследования микробных сообществ, развивающихся как в массе ТБО (Stamps et al., 2016; Ke et al., 2022), так и в фильтратах, производимых разлагающимися отходами (Huang et al., 2005; Hugo et al., 2022). С использованием высокопроизводительного секвенирования и анализа гена 16S pPHK показано, что на свалках ТБО в целом и в производимых ими жидких фильтратах обитают функционально разнообразные микробные сообщества.

Значительную долю бытовых отходов составляют различные полимеры, в частности, полиэтилентерефталат (ПЭТ) и полистирол (ПС), а также металлолом. Медленное разрушение полимеров в результате деполимеризации, фотохимических и химических процессов приводит к образованию ацетальдегида, производных терефталевой кислоты, стирола, а также органических соединений и металлов (цинка, свинца), которые могут переходить в фильтрат (Вайсман, 2012; Christensen et al., 2019). Кроме того, при деградации органических отходов, включающих растворители, лаки, краски, образуются токсичные соединения, такие как фенол, крезол, алкилбензолы, полифенолы, а также хлорсодержащие ароматические соединения. В толще отходов наблюдается также биокоррозия металлов, инициируемая микрорганизмами. Кроме того, кислоты, образующиеся при окислении органических соединений, способствуют снижению значений рН в жидкой фазе от 7.5—7 до 5—4 и растворению металлов, которые переходят в фильтрат (Milyutina et al., 2020). Токсичные ксенобиотики и окисленные формы металлов в результате миграции свалочного фильтрата могут поступать в водные объекты.

Целью настоящей работы было определение филогенетического и функционального разнообразия прокариот и микроскопических грибов в

обрастаниях, формирующихся на поверхности полимеров и стали, экспонировавшихся в водоеме на территории полигона ТБО, *in silico* поиск ферментов биодеградации полимеров и ксенобиотиков у выявленных прокариот, а также выделение бактерий, разлагающих ПЭТ, ароматические углеводороды и ксенобиотики.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Описание водоема и подготовка образцов. Пресный водоем, на котором проводилось исследование, расположен на территории полигона ТБО в районе с. Черкассы (Башкирия, РФ). Площадь водоема — около  $1.5 \text{ м}^2$  (рис. S1). Водоем находится у подножия природного холма, засыпанного мусором. Поверхностные и дождевые воды с основного массива свалки стекают по склону и наполняют этот водоем. Кроме того, водоем, по-видимому, подпитывается из подземных источников, поскольку никогда не высыхает полностью. Глубина водоема 1.2-1.5 м. На поверхности воды наблюдается маслянистая радужная пленка. Исследования проводили с использованием образцов полиэтилентерефталата (ПЭТ), полистирола (ПС) и стали 20 (СТ). Размеры образцов составляли  $100 \,\mathrm{mm} \times 10 \,\mathrm{mm} \times 2 \,\mathrm{mm}$ . Образцы материалов экспонировали в период с 15 июня по 15 августа 2020 года, в течение 60 сут, с отбором двух партий образцов – после 10 и 60 сут экспозиции. По причине засущливого лета, уровень воды в этот период упал на 40-50 см, потому глубина погружения образцов в начале экспозиции составляла 80 см, а сняты они были с глубины 20-30 см. Температура воды в период экспозиции составляла 15-20°C.

Химический состав воды был определен в испытательном лабораторном центре Федерального бюджетного учреждения здравоохранения "Центр гигиены и эпидемиологии в республике Башкортостан" согласно сертифицированным методам исследования (табл. S1).

Микроскопические методы. При исследовании микробных обрастаний и поверхности образцов применяли сканирующий электронный микроскоп TESCAN VEGA 3 XMU (Чехия). Морфологию клеток бактерий изучали на живых препаратах, используя эпифлуоресцентный микроскоп Axio Imager.D1 ("Carl Zeiss", Germany).

Выделение ДНК, высокопроизводительное секвенирование фрагментов гена 16S рРНК и подготовка их к анализу были проведены, как описано ранее (Турова и соавт., 2020). Для амплификации фрагментов V4 региона гена 16S РНК бактерий была использована пара праймеров 541'F (Hugerth et al., 2014) и Pro-mod-805R (Merkel et al., 2019), а для ITS региона — пара праймеров ITS86F и ITS4R (Bokulich, Mills, 2013).

Анализ библиотек фрагментов гена 16S рРНК. Библиотеки фрагментов гена 16S рРНК бактериальных сообществ анализировали и классифицировали с использованием онлайн-ресурса RDP Release 11 (http://pyro.cme.msu.edu) и SILVA: r138.1 (https://ngs.arb-silva.de/silvangs/). Для анализа библиотек последовательности предварительно объединяли в операционные таксономические единицы (ОТЕ) с уровнем сходства 97%. Индексы разнообразия были рассчитаны с использованием программы EstimateS (http://purl.oclc.org/estimates). Онлайн-ресурс ClustVis (https://biit.cs.ut.ee/clustvis/) был использован для создания графиков методом главных компонент (Principal Component Analysis, PCA) и тепловых карт (heatmaps) бактериальных и грибных компонентов сообществ на родовом уровне. Используя данные о представленности таксонов в библиотеках и наиболее значимые различия условий экспозиции исследуемых образцов, были выявлены потенциальные функциональные характеристики бактериальных сообществ с использованием пакета программ iVikodak (Nagpal et al., 2019) на основании ресурсов базы данных KEGG (Kanehisa, Goto, 2000). Созданные по результатам этого анализа тепловые карты были построены с помощью онлайн-ресурса Clust-Vis. Основные функциональные характеристики грибных компонентов сообществ были получены с использованием программы FunGuild (Nguyen et al., 2016).

Состав питательных сред. Для получения накопительных культур, растущих на продуктах деградации ПЭТ, использовали минеральную среду (МС)  $(\Gamma/\pi)$ : Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 6.78; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 3.0; NaCl – 2.0;  $NH_4Cl - 1.0$ ;  $MgSO_4 - 0.2$ ;  $CaCl_2 \cdot 2H_2O - 0.01$ ;  $FeSO_4 - 0.06$ ; терефталат – 2.5; pH 7.5. Первичные посевы для получения накопительных культур инкубировали в течение 2 месяцев при 17-19°C и затем использовали в качестве посевного материала для выделения чистых культур. Культуры выделяли методом последовательных пересевов колоний на агаризованной среде R2A, содержащей  $(\Gamma/\pi)$ : дрожжевой экстракт — 0.5; пептон — 0.5; казаминовые кислоты -0.5; глюкоза -0.5; крахмал -0.5; Na пируват -0.3;  $K_2HPO_4 - 0.3$ ;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O -$ 0.05; NaCl - 2.0; агар-агар - 15.0. Рост на углеводородах, ксенобиотиках и органических кислотах определяли на минеральной среде МС с оптимальным для каждого штамма содержанием NaCl, добавляя по 0.2% об./об. смеси H-алканов или фенол или натриевые соли уксусной, бензойной и масляной кислот (по 5 г/л). Посевы инкубировали в течение 14 сут при 23°C.

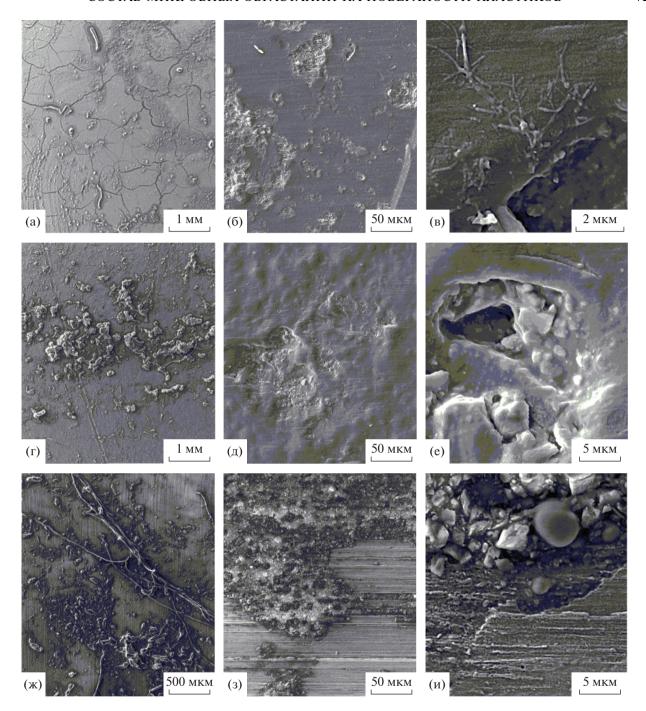
Депонирование. Библиотеки фрагментов гена 16S рРНК бактерий и ITS фрагментов рибосомных оперонов грибов из микробных обрастаний образцов, полученные в результате секвенирования, депонированы в NCBI SRA, биопроект

PRJNA845963. Гены 16S рРНК выделенных штаммов бактерий депонированы в Генбанк под номерами ON679634—ON679636.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Физико-химические характеристики среды. Анализ основных показателей воды свидетельствует о наличии загрязнителей в исследуемом водоеме (табл. S1). Органолептические показатели исследуемой воды оказались значительно хуже нормы. Показатель мутности превышал предельные значения в 9 раз, а показатель цветности – в 3 раза. Мутность природных вод вызывается присутствием тонкодисперсных примесей, обусловленных нерастворимыми или коллоидными неорганическими и органическими веществами различного происхождения. Ослабление интенсивности света с глубиной в мутной воде приводит к большему поглощению солнечной энергии вблизи поверхности. Нагревание верхнего слоя воды уменьшает перенос кислорода из воздуха в воду, снижает плотность воды и может приводить к стратификации водоемов на аэробную и анаэробную зону. Цветность природных вод обусловлена главным образом присутствием гумусовых веществ и соединений трехвалентного железа, а также сточных вод различного происхождения. Кроме того, вода имела запах до 4 баллов, что также превышало норму. По-видимому, в воде было велико содержание органических примесей, которые могут обусловливать повышенный уровень органолептических показателей. Подтверждением этому могут служить повышенные показатели перманганатной окисляемости (в 5.4 раза превышающие ПДК). Из неорганических веществ в исследуемой воде отмечено превышение нормы по содержанию аммонийных форм азота (в 2 раза) и марганца (в 21 раз). Похожие данные о загрязненности воды, значительно превышающей ПДК по жесткости, химическому потреблению кислорода (ХПК), содержанию ионов аммония, марганца, а также нефтепродуктов, были получены ранее для ручья, стекающего с территории полигона ТБО г. Перми (Вайсман, 2012).

Микроскопия микробных обрастаний на исследуемых образцах. Образцы материалов после экспозиции их в водной среде в течение 10 сут были использованы для визуализации микробных обрастаний на их поверхности с помощью сканирующего электронного микроскопа (рис. 1а—1и). Микробные обрастания на образце ПЭТ (рис. 1а) были представлены редкими колониями, не составляющими оформленную биопленку, а на образце ПС (рис. 1г) было значительно больше колоний, которые местами сливались в конгломераты. На образцах пластиков наблюдались также короткие нитевидные структуры, возможно, принадлежащие грибам. На стальном образце (рис. 1ж)



**Рис. 1.** Микрофотографии обрастаний на образцах полиэтилентерефталата (а), полистирола (г) и стали 20 (ж) после 10 сут экспозиции, а также отмытых от обрастаний образцов ПЭТ (б, в), ПС (д, е) и СТ (з, и) при разном масштабе съемки.

кроме конгломератов бактериальных колоний видны хорошо сформированные нити грибного мицелия. Однако при этом и на стальном образце биопленка не покрывала всю поверхность образца, и видны участки свободной поверхности. Для обнаружения возможной деструкции образцов после 10 сут экспозиции они были отмыты от обрастаний. На микрофотографиях образцов пла-

стика видны микроскопические локальные, но глубокие разрушения, что хорошо прослеживается при уменьшении масштаба фотографий (рис. 16, 1в, 1д, 1е, 1з, 1и). Несмотря на короткий период инкубации, повреждения стального образца занимали значительную площадь поверхности, а при уменьшении масштаба становилась заметной и глубина разрушений.

Статистический анализ разнообразия прокариот и грибов в обрастаниях на образцах пластика и стали. В результате высокопроизводительного секвенирования V4 региона гена 16S рРНК прокариот и ITS региона рРНК оперона грибов было получено по шесть библиотек, содержащих 176988 и 435329 ридов соответственно. Из них было сформировано 26194 ОТЕ (филотипов) бактерий и 1477 ОТЕ грибов с уровнем сходства последовательностей >97%.

Уровень покрытия для всех библиотек фрагментов гена 16S рРНК был относительно невысоким и составлял от 71 до 90%, что свидетельствовало о том, что максимальная репрезентативность библиотек не была достигнута (табл. S2). Этому заключению соответствовали и высокие значения индексов Chao 1. Индексы разнообразия Шеннона—Уивера и обратного Симпсона для этих библиотек оказались высокими (5.7—6.9 и 54.5—134.7), а индексы доминирования Бергера—Паркера, наоборот, низкими (0.04—0.09), независимо от типа материала и времени экспозиции.

Уровень покрытия ITS региона рРНК оперона грибов для всех библиотек был почти максимальным (от 99.5 до 99.9%), что подтверждалось низкими значениями индекса Chao 1, приближавшимися к количеству выявленных в библиотеках ОТЕ, и свидетельствовало о полной репрезентативности библиотек. Индексы разнообразия Шеннона—Уивера и обратного индекса Симпсона для библиотек грибов оказались значительно ниже (3.6—4.4 и 16.8—23.0), чем для библиотек генов 16S рРНК бактерий, а индексы доминирования Бергера—Паркера, наоборот, выше (0.1—0.4), независимо от типа материала и времени экспозиции.

Группирование библиотек на уровне ОТЕ для бактерий и грибов методом главных компонент свидетельствовал о том, что бактериальные сообщества достоверно различались между собой только согласно времени экспозиции, но не по материалу образцов (рис. 2а, 2б). На начальном уровне экспозиции (10 сут) бактериальные сообщества на разных материалах мало различались между собой, в отличие от сообществ на конечном этапе, формировавшихся в течение 60 сут. Для грибного компонента микробного сообщества обрастаний не обнаружено достоверного группирования образцов ни по времени экспозиции, ни по материалу образца (рис. 2в, 2г).

Таксономический состав прокариот и грибов в обрастаниях на поверхности образцов пластика и стали

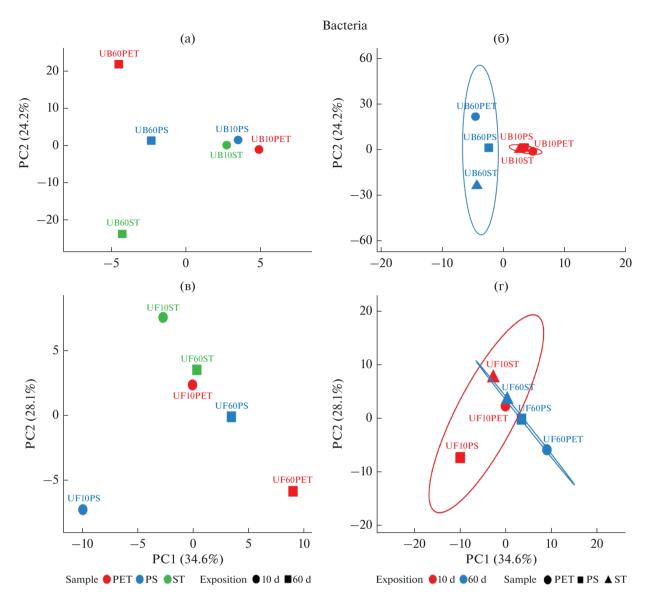
**Прокариоты.** Общее количество последовательностей (ридов) фрагментов гена 16S рРНК прокариот для шести библиотек после исключения неидентифицированных ридов, а также еди-

ничных ридов, представленных только в одной или двух библиотеках, составило 147903. Из них было сформировано 3754 ОТЕ (филотипа) с уровнем сходства последовательностей ≥97%. В библиотеках были выявлены только последовательности бактерий; архейный компонент не был обнаружен. Таксономическое распределение филотипов бактерий на уровне филумов, а для *Pseudomonadota* (*Proteobacteria*) — на уровне классов, показано на рис. S2a.

Состав высших таксонов бактерий был сходным для всех анализируемых библиотек, при этом представленными в библиотеках и доминирующими в большинстве из них были бактерии филумов/классов Betaproteobacteria (11.8–38.0%), Actinomycetota (5.4–23.9%), Gammaproteobacteria (4.7-22.5%), Alphaproteobacteria (6.6-13.6%), Bacteroidota (6.6-12.3%) и Bacillota (5.3-23.3%). Наблюдались количественные изменения в составе доминирующих таксонов, связанные в основном со временем экспозиции, а не с материалом образцов. По сравнению с библиотеками начального периода (10 сут) при увеличении времени экспозиции до 60 сут возрастала доля Gammaproteobacteria (с max 12.2 до 22.5%) и Bacillota (с max 14.7 до 29.1%). Наиболее заметные изменения наблюдались для Deltaproteobacteria, доля которых на начальном этапе экспозиции была заметной для пластика (7.4-7.8%) и значительной для стали (37.2%) и существенно снижалась к концу экспозиции (0-1.6%). В качестве минорных компонентов (<1%) в анализируемых сообществах встречались представители филумов Planctomycetota, Chloroflexota, Spirochaetota и Mycoplasmatota.

В результате классификации ОТЕ в общем составе шести библиотек фрагментов гена 16S pPHK были выявлены представители 290 семейств и 855 родов бактерий. Тепловые карты распределения всех семейств и родов бактерий, созданные с использованием программы ClustVis, позволили проследить распределение библиотек по двум параметрам, а именно, типу материала образца и по времени экспозиции. На тепловых картах бактерий, как на уровне семейств (рис. S3a), так и на уровне родов (рис. S4a), видны две четко различающиеся области, коррелирующие со временем экспозиции образцов. Такое распределение библиотек свидетельствует о заметных изменениях в составе бактериальных сообществ при длительном экспонировании образцов в водной среде.

На тепловой карте 25 родов, преобладающих в общем составе библиотек, также можно отметить формирование этих двух областей (рис. 3а), хотя бактерии родов Aquabacterium, Planococcus, Polaromonas и Acidovorax были представлены на обоих этапах экспозиции. На начальном этапе преобладали сульфатвосстанавливающие бактерии (СВБ) родов Desulfobulbus и Desulfomicrobium, которые



**Рис. 2.** График, показывающий группирование ОТЕ в библиотеках гена 16S рРНК бактерий и ITS рибосомного оперона грибов по материалу образцов — ПЭТ (РЕТ), ПС (PS) и СТ (ST) (а, в) и периоду экспозиции в водной среде 10 и 60 сут (б, г), полученный методом главных компонент (Principal Components Analysis, PCA) с использованием параметра SVD в программе ClustVis. Эллипсы обозначают достоверно различающиеся области группирования с доверительным интервалом 0.95.

были наиболее представлены в сообществе на стальном образце. Известно, что сульфатвосстанавливающие бактерии вызывают биокоррозию металлов в различных природных и промышленных средах (Anandkumar et al., 2016; Loto, 2017). Эти бактерии являются строгими анаэробами и практически полное уменьшение доли этих бактерий в конце экспозиции, по-видимому, было связано с пересыханием водоема в летний период, уменьшением его глубины и соответствующим повышением концентрации кислорода в придонной зоне водоема. На конечном этапе экспозиции, микробные сообщества на образцах материалов стали более разнообразными, чем на на-

чальном этапе, однако не было выявлено значительного преобладания отдельных родов или каких-либо зависимостей их представленности от материала образцов.

Грибы. Общее количество последовательностей (ридов) грибов в шести библиотеках после исключения неидентифицированных ридов и единичных и двойных ридов, представленных только в одной библиотеке, составило 200325, из которых было сформировано 482 ОТЕ (филотипа) с уровнем сходства последовательностей ≥97%. В анализируемых сообществах доминировали представители классов *Dothideomycetes* (13.0—45.7%) и

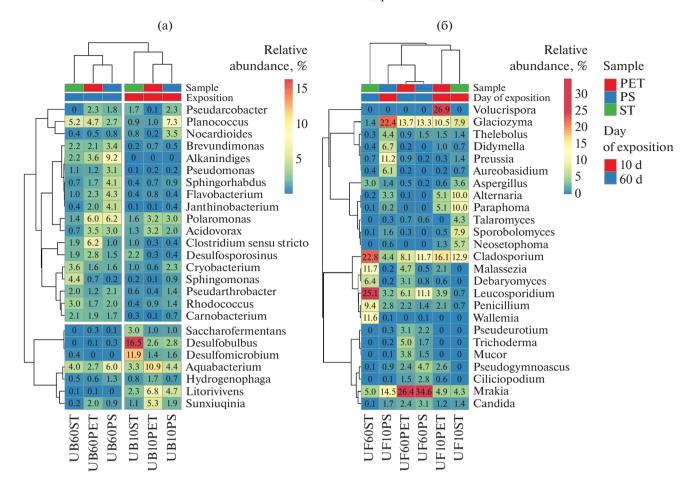
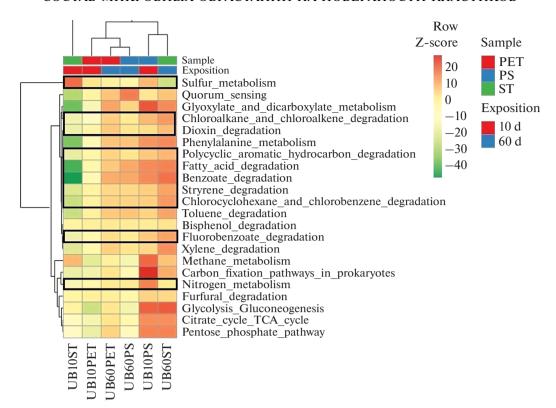


Рис. 3. Тепловые карты (heatmap) распределения 25 доминантных родов бактерий (а) и грибов (б) по 6 библиотекам, представляющим микробные сообщества с образцов полиэтилентерефталата (PET), полистирола (PS) и стали 20 (ST). Представленность родов рассчитана как отношение количества ридов, принадлежащих представителям данного рода, к общему количеству ридов в соответствующей библиотеке. Как строки, так и столбцы были сгруппированы с использованием параметров correlation distance и average linkage программы ClustVis. Сравнительное количество фрагментов последовательностей гена 16S pPHK бактерий и ITS рибосомных оперонов грибов определенных родов в библиотеках показано цветом.

Leotiomycetes (0-31.0%) филума Ascomycota, а также классов Microbotryomycetes (14.9-26.7%) и Tremellomvcetes (5.1–27.7%) филума Basidiomvcota (рис. S2б). Так же, как и для бактерий, наблюдались количественные изменения в составе доминирующих классов грибов, однако при этом диапазон различий был значительно шире, чем для высших таксонов бактерий. Кроме того, были заметны различия, связанные как со временем экспозиции, так и с материалом образцов. Доля наиболее представленных грибов класса Dothideomycetes была высокой во всех сообществах на начальном этапе экспозиции (31.3-45.7%), но заметно падала на конечном этапе (13.0-24.9%). Доля представителей Leotiomycetes была значительно выше в обрастаниях на полиэтилентерефталате на начальном этапе экспозиции (31.3%) по сравнению с остальными сообществами (0-8.7%). Доля *Microbotryomycetes* возрастала к концу экспозиции на образцах ПЭТ (с 14.9 до 20.3%) и СТ (с 16.4 до 26.8%) и оставалась примерно

одинаковой для образцов ПС (27.2—24.7%), а доля представителей *Tremellomycetes*, наоборот, значительно возрастала к концу экспозиции для образцов ПЭТ (с 7.7 до 27.7%) и ПС (15.9—36%), а в обрастаниях на стальном образце оставалась примерно на одном уровне (5.7—5.1%). Таким образом, хотя влияние изменения условий среды в результате пересыхания водоема к концу экспозиции на общий состав сообщества грибов оказалось менее существенным, чем для бактерий, оно прослеживалось для отдельных родов грибов, так же, как и влияние материала образцов.

В результате классификации ОТЕ в общем составе библиотек фрагментов ITS были выявлены последовательности грибов, принадлежащих к 79 семействам и 115 родам. Тепловые карты распределения грибов на уровне семейств (рис. S36) и родов (рис. S46), созданные с использованием программы ClustVis, так же, как и график PCA, не



**Рис. 4.** Тепловая карта, показывающая кластеризацию образцов материалов на основе относительного процента функциональных профилей бактериального сообщества в программе iVikodak. Метаболические пути деградации ксенобиотиков и продуктов деполимеризации полимеров, а также биокоррозии стали, предположительно представленные у бактерий в обрастаниях, отмечены черной рамкой.

выявили четкого группирования образцов ни по типу материала образца, ни по времени экспозиции (рис. S3б), так же, как и тепловая карта 25 преобладающих родов (рис. 3б). Некоторые роды доминирующих грибов были представлены во всех библиотеках, однако их представленность в сообществе изменялась разнонаправленно для сравниваемых библиотек в зависимости от времени экспозиции и материала образцов. Из этих родов на начальном этапе экспозиции доминировали только представители рода *Glaciozyma* на образце ПС (22.4%). На конечном этапе экспозиции доминировали представители рода Mrakia на образцах ПЭТ (26.4%) и ПС (34.6%), рода *Cladosporium* — на образцах ПЭТ (16.1%) и CT (22.8%) и рода *Leuco*sporidium — на образце СТ (22.8%). В то же время, представители некоторых родов присутствовали заметных количествах только на одном образце, в частности, представители рода Volucrispora обнаруживались только на образце ПЭТ на начальном этапе экспозиции (26.9%), а рода Wallemia — только на образе СТ в конце экспозиции (11.6%), но в остальных библиотеках не были выявлены. Тепловая карта 20 преобладающих видов грибов (табл. S3), уточняла выше описанную тепловую карту на родовом уровне (рис. 36). Во всех сообществах доминировали четыре вида грибов: Mrakia frigida, Glaciozyma antarctica, Cladosporium cladosporioides и Leucosporidium fragarium (уровень идентичности последовательностей ITS 99—100% с типовыми штаммами соответствующих видов), хотя представленность их была различной в зависимости от времени экспозиции и типа материала образцов.

Потенциальная способность бактерий к осуществлению процессов метаболизма в обрастаниях на пластике и стали. Программа iVikodak позволяет на основании таксономического состава исследуемых бактериальных сообществ предсказывать их функциональные характеристики, используя геномные базы данных (Nagpal et al., 2019). На рис. 4 с использованием модуля программы "Global Маррег" представлен результат сравнительного анализа вклада исследуемых бактериальных сообществ в осуществление путей метаболизма согласно базе данных KEGG (Kanehisa, Goto, 2000). Были проанализированы основные пути энергетического метаболизма, а также пути деградации ксенобиотиков, представленные в этой базе, и выявленные программой у представителей изучаемых сообществ.

Представленность путей метаболизма у бактерий исследуемых сообществ изменялась в зависимости от времени экспозиции, однако эти измене-

ния были различными для каждого типа материала (рис. 4). Функциональное разнообразие бактерий на образцах ПЭТ и представленность ферментов основных путей углеводного и энергетического метаболизма были заметно выше в конце экспозиции (60 сут) (рис. 4). Для ПС, наоборот, представленность основных путей метаболизма уменьшалась в конце экспозиции (60 cvт), а представленность большинства ферментов деградации ксенобиотиков была примерно одинакова в начале и конце экспозиции. Представленность ферментов всех путей метаболизма у бактериального сообщества на образцах стали значительно увеличивалась в конце экспозиции за исключением серного метаболизма, ферменты метаболизма которого были, наоборот, в основном представлены в начале экспозиции (10 сут). Отметим, что представленность ферментов пути "Quorum sensing", способствующих формированию биопленок, заметно возрастала также к окончанию экспозиции всех исследуемых материалов.

Потенциальная способность к деградации материалов образцов. В наших предыдущих работах рассматривалась представленность ферментов путей деградации ПС, ПЭТ и стали (Турова и соавт., 2020; Tourova et al., 2020). Использование модуля "Local Mapper" программы iVikodak позволяет оценить представленность ферментов, участвующих в путях (картах) метаболизма, связанных с процессами биодеградации (рис. S5—S15).

Показано, что ферменты деградации ПЭТ, включенные в состав пути метаболизма "Деградация полициклических ароматических углеводородов", у бактерий в обрастаниях на образцах из полиэтилентерефталата не были выявлены (рис. S5). Это согласуется с отсутствием в анализируемых сообществах бактерий рода Ideonella, в клетках которых эти ферменты были достоверно обнаружены (Yoshida et al., 2016). Однако в результате анализа было предсказано наличие у бактерий в обрастаниях на поверхности ПЭТ двух ферментов этого пути, терефталат 1,2-диоксигеназы [ЕС:1.14.12.15] 1,2-дигидрокси-3,5-циклогексадиен-1,4-дикарбоксилат дегидрогеназы [ЕС:1.3.1.53], катализирующих превращение терефталевой кислоты (основного метаболита деградации ПЭТ) в протокатеховую кислоту. Причем эти ферменты были наиболее представлены у бактерий на образцах ПЭТ на конечном этапе экспозиции. Кроме того, в основном в конце экспозиции у бактерий были представлен ключевой фермент, лактальдегид редуктаза [ЕС:1.1.1.77], метаболизма другого продукта деградации ПЭТ – этиленгликоля в составе пути "Метаболизм глиоксилата и дикарбоксилата" (рис. S6).

Два ключевых фермента аэробной деградации мономера ПС — стирола, стирол монооксигеназа [ЕС:1.14.14.11] и стирол оксидизомераза [ЕС:5.3.99.7],

катаболизирующие стирол до фенилацетальдегида, были преимущественно представлены в обрастаниях на образце ПС на начальном этапе экспозиции (рис. S7).

Результаты многочисленных исследований процессов микробной коррозии стали свидетельствуют об участии в них сульфатвосстанавливаюших бактерий (СВБ) (Gieg et al., 2011: Anandkumar et al., 2016; Loto, 2017). В нашем исследовании для стальных образцов была проанализирована представленность ферментов серного метаболизма (рис. S8). Так, было предсказано наличие сульфат аденилил трансферазы [ЕС:2.7.7.4], катализирующей восстановление сульфата до аденилил сульфата в процессе сульфатредукции, а также ферментов восстановления аденилил сульфата до сульфита в ассимиляционной и диссимиляционной сульфатредукции. Диссимиляционное восстановление сульфат-иона, представленное преимущественно на начальном этапе экспозиции, вероятно, связано с доминированием СВБ, содержащих аденилилсульфат редуктазу [ЕС:1.8.99.2]. Более низкая представленность этого фермента у бактерий в конце экспозиции, по-видимому, была связана со значительным уменьшением доли СВБ в сообществе. Аденилилсульфат киназа [ЕС:2.7.1.25] фосфоаденозин фосфосульфат редуктаза [ЕС:1.8.4.8], восстанавливающие сульфит до сульфида в ассимиляционном процессе, были представлены примерно одинаково на обоих этапах экспозиции.

Потенциальная способность к деградации ароматических соединений и ксенобиотиков. Бензоат является центраболитом деградации ароматических соединений, в том числе, продуктов разрушения пластиков (в частности, терефталата) и многих токсичных ксенобиотиков. Деградация бензоат-иона (далее бензоата) предположительно осуществлялась на обоих этапах экспозиции бактериями, обладающими двумя ключевыми ферментами пути аэробной деградации бензоата ("Benzoate degradation I"), бензоат-1,2-диоксигеназой [ЕС:1.14.12.10] и дигидрооксициклогексадиен карбоксилат дегидрогеназой [ЕС:1.3.1.25], катализирующими образование катехола из бензоата (рис. S9). Предсказано также присутствие во всех сообществах бактерий, имеющих ферменты катаболизма катехола, как до сукцинил-КоА, так и до пирувата/ацетил-КоА. Кроме того, был представлен фермент бензоат-КоА-лигаза [ЕС:6.2.1.25], катализирующий превращение бензоата в бензоил-КоА — интермедиат биодеградации многих ароматических соединений, и большинство ферментов второго пути деградации бензоата ("Benzoate degradation II"), преимущественно используемого анаэробными бактериями. Однако все предполагаемые ферменты и соответственно функционирование этого пути выявлены только на начальном этапе экспозиции, что соответствует предположению об анаэробных условиях среды на этой стадии. Кроме того, на обоих этапах экспозиции предполагается представленность ферментов деградации бензола.

На обоих этапах экспозиции у бактерий были представлены ключевые ферменты пути деградации фторбензоата — бензоат/толуат диоксигеназа [ЕС:1.14.12.10] и дигидроксициклогексадиенкарбоксилат дегидрогеназа [ЕС:1.3.1.25], катализирующие превращение 2-, 3- и 4-фторбензоата до фторкатехола, который впоследствии включается в путь деградации бензоата через промежуточный метаболит малеилацетат (рис. S10). Кроме того, в этом же цикле пестицид бромоксинил катаболизируется до малеилацетата с помощью фермента пентахлорфенол монооксигеназы [ЕС:1.14.13.50].

В составе пути деградации хлорциклогексанов и хлорбензолов предположительно был представлен фермент 2,4-дихлорфенол 6-монооксигеназа [ЕС:1.14.13.20], катализирующий превращение 4-хлорфенола до 4-хлоркатехола, который в дальнейшем включается в путь деградации бензоата через малеилацетат (рис. S11).

В составе пути деградации хлоралканов и хлоралкенов были предсказаны ферменты, катаболизирующие несколько хлорсодержащих ксенобиотиков. У бактерий на всех этапах экспозиции всех исследованных типов материалов были представлены ферменты путей метаболизма 1,2-дихлорэтана до гликолата, а также формальдегида до формиата (рис. \$12). Менее представлены были ферменты катализирующие превращение трихлорэтена до формиата или глиоксилата, а также дихлорметана до формальдегида. Все эти промежуточные метаболиты в дальнейшем включаются в различные процессы катаболизма.

В составе пути деградации диоксинов на всех образцах и на обоих этапах экспозиции был представлен набор ферментов катаболизма бифенила и 4-хлорбифенила, ключевым ферментом которого является бифенил-2,3-диоксигеназа [ЕС:1.14.12.18] (рис. S13). Продукты деградации этих соединений, бензоат и 4-хлорбензоат, впоследствии через промежуточный метаболит 2-оксопент-4-еноат включаются в дальнейшие реакции до ацетил-КоА, с помощью набора ферментов, который предположительно представлен у бактерий во всех изучаемых сообществах.

Согласно полученным результатам, ферменты путей деградации ксилола, толуола, бисфенола и фурфурола не составляли полных путей деградации этих ароматических соединений, что свидетельствует об отсутствии бактерий-деструкторов этих ксенобиотиков в изучаемых сообществах.

Деградация токсичных нитросоединений происходит в составе пути метаболизма азота (рис. S14). В воде исследуемого водоема не обнаружено превышение нормы для нитрат- и нит-

рит-ионов. Однако у бактерий анализируемых сообществ предсказано наличие ферментов катаболизма нитрата и нитрита в процессах ассимиляционной и диссимиляционной нитратредукции с участием нитратредуктаз [ЕС:1.7.5.1; EC:1.7.99.4; EC:1.7.7.2], которые катализируют восстановление нитрата до нитрита, и нитритредуктаз [ЕС:1.7.7.1; ЕС:1.7.1.15; ЕС:1.7.2.2], завершающих этот процесс восстановлением нитрита до аммония. Кроме того, было предсказано функционирование ферментов полного пути денитрификации до молекулярного азота, включая ключевой фермент нитритредуктазу [ЕС:1.7.2.1], кодирующий восстановление нитрита до оксида азота. Катаболизм аммония, количество которого в воде было значительно выше нормы, потенциально активно осуществляется с помощью ферментов окислительных реакций с образованием глютамата. Представленность ферментов всех этих процессов на разных стадиях экспозиции и на разных материалах отличалась незначительно. Кроме того, в этом же пути метаболизма осуществляется катаболизм токсичных аминосоединений, таких как формамид; гидроксиламин и нитрил – до аммония, а нитроалкана - до нитрита. Промежуточные метаболиты впоследствии катаболизируются через другие пути метаболизма.

Кроме того, с помощью модуля "Local Mapper" была рассмотрена представленность ферментов деградации *н*-алканов. Углеводороды, вероятно, присутствовали в составе маслянистой пленки нефтепродуктов на поверхности изучаемого водоема. В KEGG ферменты деградации *н*-алканов включены в состав пути деградации жирных кислот. Основной фермент деградации *н*-алканов, алкан-1-монооксигеназа был представлен у бактерий в обрастаниях на всех образцах на обоих этапах экспозиции (рис. S15).

В целом можно заключить, что в составе сообществ, сформировавшихся на поверхности пластиков и стали в водоеме на полигоне ТБО, обитали бактерии, потенциально способные к деградации широкого круга ароматических соединений и ксенобиотиков.

Потенциальный вклад бактерий в процессы деградации материалов образцов, ксенобиотиков и других субстратов. Модуль "Local Mapper" программы iVikodac позволяет также оценить потенциальный вклад бактерий различных родов в осуществление анализируемых путей метаболизма. Состав основных родов бактерий потенциальных деструкторов материалов образцов, ксенобиотиков и других субстратов в обрастаниях на разных этапах экспозиции приведен в табл. S4.

Согласно полученным результатам на начальном этапе экспозиции на образцах полимеров, ПЭТ и ПС, наиболее представленными в процессах биодеградации как продуктов деполимеризации са-

мих полимеров, так и различных ксенобиотиков, предположительно являлись бактерии родов *Aquabacterium* и *Planomicrobium*, а для стального образца — родов *Desulfobulbus* и *Paracoccus*. Несмотря на сходство в составе предположительно активной микрофлоры между образцами полимеров, только для обрастаний на образце ПС и, в основном, в конце экспозиции были характерны бактерии рода *Alkanindiges*. На конечном этапе аналогичную роль для пластиков играли бактерии родов *Polaromonas* и *Rhodococcus*, а для стали — родов *Sphingobium* и *Pseudomonas* (табл. S4).

Многие представители этих родов способны разлагать ряд ароматических и полициклических соединений, в том числе, бензол, катехол и различные ароматические соединения, а также н-алканы нефти (Labuzek et al., 2003; Aburto, Peimbert, 2010; Verma et al., 2014; Nogales et al., 2017; Kim, 2018). Бактерии родов Aquabacterium и Polaromonas были выявлены как потенциальные деструкторы углеводородов в пресноводных водоемах (Reves-Sosa et al., 2018). Известно, что некоторые штаммы бактерий рода Pseudomonas, обладающие генами alkB, способны к деградации низкомолекулярного полиэтилена (Jeon, Kim, 2016). Штаммы родов Sphingobium, Pseudomonas и Rhodococcus способны к деградации стирола (Thischler, 2015). Штаммы. способные к деградации бифенилов, встречаются среди бактерий родов Rhodococcus, Pseudomonas и Sphingobium (Furukawa, 2000; Hu et al., 2015). Ранее был показано участие СВБ класса Deltaproteobacteria в интегрированных процессах восстановления сульфатов, автотрофной денитрификации и нитрификации, используемых для биологической очистки сточных вод от азотистых соединений (Hao et al., 2013).

Диссимиляционное восстановление сульфата, представленное преимущественно на начальном этапе экспозиции, вероятно, осуществляла доминирующая популяция СВБ родов Desufomicrobium и Desulfobulbus (табл. S4). На начальном этапе в процессе деградации н-алканов на образцах ПЭТ предположительно участвовали бактерии рода Aquabacterium, на образцах ПС к ним добавились бактерии родов *Planomicrobium* и *Rhodococcus*, а на образцах стали — бактерии рода Desulfobulbus. Отметим, что у бактерий рода Desulfobulbus за окисление н-алканов отвечают ферменты, отличные от ферментов аэробных бактерий. В конце экспозиции потенциальными деструкторами н-алканов на образцах ПЭТ были бактерии родов *Polaromonas*, Rhodococcus и Acidovorax, на образцах  $\Pi C$  — бактерии родов Aquabacterium, Rhodococcus и Alkanindiges, а на образцах стали – бактерии родов Sphingobium, Pseudomonas и Aquabacterium. Таким образом, несмотря на смену анаэробных условий на аэробные в водоеме в процессе экспозиции образцов, в бактериальных сообществах на поверхности полимеров и стали поддерживались популяции бактерий, обладающих генами, детерминирующими алкан-1-монооксигеназу, и способных к деградации  $\mu$ -алканов нефти.

Можно отметить, что, несмотря на изменение таксономического состава микрофлоры в течение экспозиции, представленность наборов ферментов осуществляемых процессов катаболизма ксенобиотиков оставалась высокой.

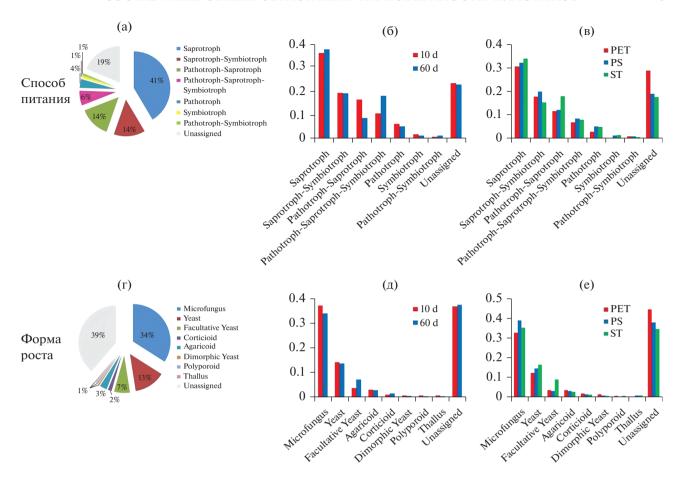
Предсказанные экологические характеристики грибов в исследуемых сообществах. Результаты определения таксономической структуры сообщества грибов, полученные методом высокопроизводительного секвенирования ITS регионов рибосомных оперонов, были проанализированы с помощью программы FunGuild, что позволило оценить первичные экологические характеристики членов сообщества (рис. 5).

По способу питания основная часть грибов в обрастаниях относилась к сапротрофному типу (41%) и к смешанным типам (сапротрофному, паразитическому и симбиотическому в различных сочетаниях) (35%). Грибы с паразитическим и симбиотическим типами питания были минорными членами сообществ (1-4%). При сравнении способов питания представителей грибных сообществ как в зависимости от времени экспозиции, так и материала образцов, различия были минимальными. В конце экспозиции снизилась доля грибов с патотрофным-сапротрофным типом питания (с 15 до 8%) и выросла доля патотрофов-сапротрофов-симбиотрофов (с 9 до 16%). При этом большая доля патотрофов-сапротрофов была выявлена в сообществах на стальных образцах (18% против 12% на образцах пластика).

По форме роста в анализируемых сообществах доминировали микроскопические грибы (34%), дрожжи (14%) и факультативные дрожжи (7%) (рис. 5). Грибы с другими формами роста были минорными членами сообществ (1–3%). Увеличение их доли в конце экспозиции было выявлено только для факультативных дрожжей (3.9–7.4%), и при этом в основном для сообществ на стальных образцах (9% против 3–4% для пластиков).

Экологические и ростовые характеристики коррелировали с составом доминирующих в сообществах видов грибов. Из 20 доминирующих видов, 10 видов относились к сапротрофам, и по 4 вида к патотрофам-сапротрофам и патотрофам-сапротрофам-симбиотрофам. По форме роста 10 видов относились к микроскопическим грибам, 6 видов — к дрожжам, 2 вида — к факультативным дрожжам и 1 вид — к диморфным дрожжам (табл. S3).

Обращает на себя внимание наличие в составе обрастаний грибов, способных к патотрофному типу питания. Недавно было показано, что грибыпатогены животных и растений концентрируются на микропластике в наземных бытовых отходах (Gkoutselis et al., 2021). Среди них обнаружены виды



**Рис. 5.** Распределение родов грибов по способу питания (а—в) и форме роста (г—е) согласно результатам программы FunGuild для общей суммы состава всех библиотек (а, г); при сравнении библиотек по времени экспозиции (б, д); при сравнении библиотек по материалу образцов (в, е).

Cladosporium cladosporioides и Didymella glomerata, которые относятся к доминирующим видам так же и в исследуемых нами сообществах. Авторы полагают, что микропластик в наземных бытовых отходах может служить селективной средой для накопления грибных патогенов и заражения ими почвы и водных сред.

В то же время, среди сапротрофных грибов были представлены потенциальные биодеструкторы полимеров, ксенобиотиков и металлов. К числу самых распространенных групп грибов-биодеструкторов пластических материалов относятся представители родов Cladosporium, Penicillium и Alternaria (Zeghal et al., 2021; Srikanth et al., 2022). C. cladosporioides способен к деградации детергентов и пестицидов (Chen et al., 2012; Jakovljević, Vrvić, 2018). Cladosporium sp. и Penicillium chrysogeпит способны к деградации 2,4-дихлорфенола (Nikolaivits et al., 2020), а также к биокоррозии металлов (Okorie, Chukwudi, 2021). Aureobasidium pullulans способны разрушать ПС и участвовать в коррозии металлов (Okorie, Chukwudi, 2021; Castiglia, Kuhar, 2015). Отметим, что в нашем исследовании последовательности грибов этого рода были детектированы в заметных количествах в библиотеке из обрастаний только на поверхности образца ПС (табл. S3). Доминирующие в сообществах виды дрожжей относятся к родам Mrakia, Glaciozyma и Leucosporidium, включающим психрофилов, обладающих широким набором ферментов, таких как липазы, гликозидазы, протеазы, хитиназы и эстеразы. Известно, что эстеразы играют важную роль в деградации промышленных загрязнителей, пластмасс и ряда токсичных химических веществ (Martorell et al., 2019). Таким образом, можно предположить, что многие виды грибов, доминирующих в исследуемых сообществах, могут участвовать в процессах деградации органических, химических и пластмассовых загрязнителей в водоеме.

Выделение чистых культур бактерий из обрастаний на исследуемых образцах. Обрастания с поверхности образцов каждого материала, экспонированных в водоеме 10 сут, были использованы для получения накопительных культур аэробных бактерий, разлагающих терефталат натрия, про-

межуточный метаболит одного из приоритетных загрязнителей — полиэтилентерефталата. Методом последовательных пересевов с жидкой на агаризованную среду из накопительных культур было выделено три штамма бактерий (табл. S5, рис. S15). Сходство последовательностей гена 16S рРНК изолятов составляло 100% с аналогичными генами типовых штаммов известных видов бактерий, представленных в GenBank. Это позволило отнести штаммы L4-1 и L12-1, выделенные с поверхности образцов пластика, к виду Bacillus thuringiensis, а штамм L13-2, выделенный с поверхности стального образца, к виду Brevundimonas bullata. Исследована способность выделенных штаммов к росту на различных субстратах, включая продукты деградации ПЭТ: терефталат и этиленгликоль. Несмотря на то, что накопительные культуры были получены на терефталате, выделенные чистые культуры не росли на этом субстрате. В то же время, все штаммы росли на н-алканах нефти, летучих жирных кислотах (ацетате и бутирате), B. bullata L13-2 рос еще на бензоате, а штаммы *B. thuringien*sis — на феноле.

Сравнение генов 16S рРНК выделенных чистых культур с последовательностями в библиотеках фрагментов гена 16S рРНК обрастаний на полимерах и стали подтвердило присутствие филотипов, близких *Bacillus thuringiensis* и *Brevundimonas bullata*, во всех исследованных библиотеках (99—100% сходства последовательностей). Бактерии рода *Bacillus* присутствовали в исследуемых сообществах, хотя и составляли небольшую часть популяции (0.1—3.6%).

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Небольшой водоем, расположенный непосредственно в зоне полигона ТБО, можно рассматривать как модельный объект по изучению таксономического состава микробных сообществ и их функционирования в природных поверхностных водных объектах, подверженных сильной антропогенной нагрузке. В связи с расширением площадей как официальных полигонов ТБО, так и нелегальных свалок, такие исследования могут стать весьма актуальными для оценки потенциальной возможности естественной биоремедиации таких водоемов.

В настоящей работе исследован состав прокариот и микроскопических грибов в обрастаниях на образцах пластиков (ПС и ПЭТ) и стали, экспонированных в водоеме на полигоне ТБО в течение 10 и 60 сут. В водоем поступают фильтраты деградации твердых бытовых отходов. Приведенные результаты свидетельствуют о том, что в водоеме обитает богатое и разнообразное сообщество бактерий и грибов. В наших предыдущих исследованиях микробных обрастаний на поверхности полимеров и стали в различных водных средах

(Турова и соавт., 2021) было показано, что состав микробных сообществ в обрастаниях в большей степени зависит от типа водной среды, чем от природы материала. Особенно значительными были различия в составе сообществ в морских и пресноводных местообитаниях. Но при этом состав сообществ различался и в пресных водах различного происхождения. В частности, в промышленной (оборотной) воде на образцах полимеров и стали прослеживалось накопление в сообществах бактерий рода Pseudomonas (Gammaproteobacteria), которые признаются модельным объектом для изучения биодеградации ряда ароматических и полициклических соединений, в том числе, бензола, катехола и других. В природной воде Можайского водохранилища эта тенденция не прослеживалась, так же, как и в исследуемом в настоящей работе водоеме. При этом основным различием между ними было полное отсутствие среди таксонов, доминирующих в водоеме на ТБО, представителей цианобактерий, хотя при экспонировании аналогичных образцов в воде Можайского водохранилища они составляли значительную часть бактериального сообщества. В то же время, во всех пресноводных местообитаниях среди доминирующих родов присутствовали бактерии рода Aquabacteruum, типичные обитатели пресных вод.

Основные изменения в составе исследуемых в настоящей работе микробных сообществ были связаны с длительностью экспозиции в водной среде, а не с природой материалов исследуемых образцов. При этом для бактерий зависимость состава сообществ от времени экспозиции была выражена более четко, чем для грибов. Вероятно, различия в таксономическом составе бактерий на разных этапах экспозиции были обусловлены изменением условий среды с анаэробных на аэробные из-за пересыхания водоема. Результатом этих изменений явилось уменьшение сульфатредуширующих дельтапротеобактерий, доминирующих в составе сообщества на начальном этапе экспозиции. Такая динамика особенно заметна для обрастаний на стальных образцах.

Микробные сообщества, сформировавшиеся на образцах полимеров и стали, экспонированных в водоеме, потенциально способны осуществлять биодеградацию как продуктов деполимеризации самих полимеров (ПС и ПЭТ), так и различных ксенобиотиков. Потенциальная активность ферментов, которыми обладают бактериальные и грибные компоненты сообщества, предсказанная с помощью биоинформатических методов, свидетельствует о способности микроорганизмов деградировать ксенобиотики, углеводороды и другие органические поллютанты, в также осуществлять коррозию металлов. Деструкция полимеров с образованием локальных, но глубоких повреждений, а также довольно значительная

коррозия стали отмечены на микрофотографиях, что подтверждало биоинформатические данные. Кроме нитчатых грибов родов *Cladosporium* и *Penicillum*, для которых показано участие в биокоррозии стали (Okorie, Chukwudi, 2021), именно на начальном этапе экспозиции в бактериальном сообществе на стальном образце доминировали СВБ, которые считаются основными агентами биокоррозии стали (Anandkumar et al., 2016; Loto, 2017).

Таким образом, в водоемах, подвергающихся значительным загрязнениям бытовыми отходами, формируются микробные сообщества сложного состава, в которых возможен отбор микроорганизмов-деструкторов полимерных и металлических отходов, а также токсичных ксенобиотиков. Микробные сообщества, сформировавшиеся в водоемах на полигонах ТБО и в прилегающих водных объектах, могут осуществлять процессы их биоремедиации после рекультивации территорий полигонов.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при частичной поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (грант  $\mathbb{N}$  18-29-05033).

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Вайсман Я.И. Управление отходами. Сточные воды и биогаз полигонов захоронения твердых бытовых отходов. Пермь: Изд-во ПНИПУ, 2012. 259 с.

Турова Т.П., Соколова Д.Ш., Назина Т.Н., Груздев Д.С., Лаптев А.Б. Филогенетическое разнообразие микробных сообществ с поверхности полиэтилентерефталатных материалов при экспозиции в водных средах // Микробиология. 2020. Т. 89. С. 99—110. https://doi.org/10.31857/S0026365620010152

*Tourova T.P., Sokolova D.S., Nazina T.N., Grouzdev D.S., Laptev A.B.* Phylogenetic diversity of microbial communities from the surface of polyethylene terephthalate materials exposed to different water environments // Microbiology (Moscow). 2020. V. 89. P. 96–106.

https://doi.org/10.1134/S0026261720010154

Турова Т.П., Соколова Д.Ш., Назина Т.Н., Лаптев А.Б. Сравнение таксономического состава бактериальных обрастаний, развивающихся на поверхности различных материалов, экспонированных в водных средах // Микробиология. 2021. Т. 90. С. 400—412. https://doi.org/10.31857/S0026365621040182

Tourova T.P., Sokolova D.Sh., Nazina T.N., Laptev A.B. Comparative analysis of the taxonomic composition of bacterial fouling developing on various materials exposed to aqueous environments // Microbiology. 2021. V. 90. P. 416–427.

https://doi.org/10.1134/S0026261721040159

*Aburto A., Peimbert M.* Degradation of a benzene—toluene mixture by hydrocarbon-adapted bacterial communities // Ann. Microbiol. 2010. V. 61. P. 553–562. https://doi.org/10.1007/s13213-010-0173-6

Anandkumar B., George R.P., Maruthamuthu S., Parvathavarthini N., Mudali U.K. Corrosion characteristics of sulfate-reducing bacteria (SRB) and the role of molecular biology in SRB studies: an overview // Corros. Rev. 2016. V. 34. P. 41–63.

https://doi.org/10.1515/corrrev-2015-0055

*Bokulich N.A., David A. Mills D.A.* Improved selection of internal transcribed spacer-specific primers enables quantitative, ultra-high-throughput profiling of fungal communities // Appl. Environ. Microbiol. 2013. V. 79. P. 2519—2526. https://doi.org/10.1128/AEM.03870-12

Castiglia V.C., Kuhar F. Deterioration of expanded polystyrene caused by Aureobasidium pullulans var. melanogenum // Rev. Argent. Microbiol. 2015. V. 47. P. 256–260. https://doi.org/10.1016/j.ram.2015.05.001

Chen S., Liu C., Peng C., Liu H., Hu M., Zhong G. Biodegradation of chlorpyrifos and its hydrolysis product 3,5,6-trichloro-2-pyridinol by a new fungal strain *Cladosporium cladosporioides* Hu-01 // PLoS One. 2012. V. 7. e47205. https://doi.org/10.1371/journal.pone.004720

Christensen T., Cossu R., Stiegmann R. Landfilling of Waste: Leachate. Boca Raton: CRC Press, 2019. 540 p. https://doi.org/10.1201/9781482288933

*Furukawa K*. Biochemical and genetic bases of microbial degradation of polychlorinated biphenyls (PCBs) // J. Gen. Appl. Microbiol. 2000. V. 46. P. 283–296.

https://doi.org/10.2323/jgam.46.283

*Gieg L.M., Jack T.R., Foght J.M.* Biological souring and mitigation in oil reservoirs // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2011. V. 92. P. 263–282.

https://doi.org/10.1007/s00253-011-3542-6

Gkoutselis G., Rohrbach S., Harjes J., Obst M., Brachmann A., Horn M.A., Rambold G. Microplastics accumulate fungal pathogens in terrestrial ecosystems // Sci. Rep. 2021. V. 11. 13214.

https://doi.org/10.1038/s41598-021-92405-7

Hu J., Qian M., Zhang Q., Cui J., Yu C., Su X., Shen C., Hashmi M.Z., Shi J. Sphingobium fuliginis HC3: a novel and robust isolated biphenyl- and polychlorinated biphenyls-degrading bacterium without dead-end intermediates accumulation // PLoS One. 2015. V. 10. e0122740.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122740

*Huang L.-N., Zhu S., Zhou H., Qu L.-H.* Molecular phylogenetic diversity of bacteria associated with the leachate of a closed municipal solid waste landfill // FEMS Microbiol. Let. 2005. V. 242. P. 297–303.

https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.11.021

Hugerth L.W., Wefer H.A., Lundin S., Jakobsson H.E., Lindberg M., Rodin S., Engstrand L., Andersson A.F. DegePrime, a program for degenerate primer design for broad-taxo-

nomic-range PCR in microbial ecology studies // Appl. Environ. Microbiol. 2014. V. 80. P. 5116-5123.

https://doi.org/10.1128/AEM.01403-14

Hugo V., Mendes dos Santos J., de Medeiros Engelmann P., Marconatto L., Luiz dos Anjos Borge L.G., de Lara Palhano P., Augustin A.H., Rodrigues L.F., Ketzer J.M.M., Giongo A. Exploratory analysis of the microbial community profile of the municipal solid waste leachate treatment system: A case study // Waste Manage. 2022. V. 141. P. 125-135. https://doi.org/10.1016/j.wasman.2022.01.014

Jakovljević V.D., Vrvić M.M. Potential of pure and mixed cultures of Cladosporium cladosporioides and Geotrichum candidum for application in bioremediation and detergent industry // Saudi J. Biol. Sci. 2018. V. 25. P. 529-536. https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.01.020

Jeon H.J., Kim M.N. Comparison of the functional characterization between alkane monooxygenases for low-molecular-weight polyethylene biodegradation // Int. Biodeter. Biodegr. 2016. V. 114. P. 202-208.

https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.06.012

Kanehisa M., Goto S. KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes // Nucleic Acids Res. 2000. V. 28. P. 27-30. https://doi.org/10.1093/nar/28.1.27

Ke H., Li J., Zhang X., Hu J. Bacterial community structure and predicted metabolic function of landfilled municipal solid waste in China // Sustainability. 2022. V. 14. 3144. https://doi.org/10.3390/su14063144

Kim D., Choi K.Y., Yoo M., Zylstra G.J., Kim E. Biotechnological potential of *Rhodococcus* biodegradative pathways // J. Microbiol. Biotechnol. 2018. V. 28. P. 1037–1051. https://doi.org/10.4014/jmb.1712.12017

Labuzek S., Hupert-Kocurek K.T., Skurnik M. Isolation and characterisation of new *Planococcus* sp. strain able for aromatic hydrocarbons degradation // Acta Microbiol. Pol. 2003. V. 52. P. 395-404. PMID: 15095927

Laptev A., Poltarukha O., Tourova T., Sokolova D., Golubev A., Golubev I. Specific features of biocorrosion of the circulation cooling system in the petrochemical industry // E3S Web of Conferences. 2021. V. 225. 01006. https://doi.org/10.1051/e3sconf/202122501006

Loto C.A. Microbiological corrosion: mechanism, control and impact – a review // Int. J. Adv. Manuf. Technol. 2017. V. 92. P. 4241–4252.

https://doi.org/10.1007/s00170-017-0494-8

Martorell M.M., Ruberto L.A.M., de Figueroa L.I.C., Mac Cormack W.P. Antarctic yeasts as a source of enzymes for biotechnological applications // Fungi of Antarctica: Diversity, Ecology and Biotechnological Applications / Ed. Rosa L.H., Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2019. P. 285-304.

https://doi.org/10.1007/978-3-030-18367-7\_13

Merkel A.Yu., Tarnovetskii I.Yu., Podosokorskaya O.A., Toshchakov S.V. Analysis of 16S rRNA primer systems for profiling of thermophilic microbial communities // Microbiology (Russian). 2019. V. 88. P. 671–680. https://doi.org/10.1134/S0026261719060110

Milyutina N.O., Smyatskaya Y.A., Politaeva N.A., Zelenkovsky P.S. MSW landfill leachate: formation, characterization and treatment // Butlerov Communications. 2020.

V. 61. P. 79-85.

https://doi.org/10.37952/ROI-jbc-01/20-61-3-79

Nagpal S., Haque M.M., Singh R., Mande S.S. iVikodak – A Platform and standard workflow for inferring, analyzing, comparing, and visualizing the functional potential of microbial communities // Front. Microbiol. 2019. V. 9. 3336. eCollection 2018.

https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03336

Nikolaivits E., Agrafiotis A., Baira E., Le Goff G., Tsafantakis N., Chavanich S.A., Benayahu Y., Ouazzani J., Fokialakis N., Topakas E. Degradation mechanism of 2,4-dichlorophenol by fungi isolated from marine invertebrates // Int. J. Mol. Sci. 2020. V. 21. 3317.

https://doi.org/10.3390/ijms21093317

Nguyen N.H., Song Z., Bates S.T., Branco S., Tedersoo L., Menke J., Schilling J.S., Kennedy P.G. FUNGuild: an open annotation tool for parsing fungal community datasets by ecological guild // Fungal Ecol. 2016. V. 20. P. 241–248. https://doi.org/10.1016/j.funeco.2015.06.006

Nogales J., García J.L., Díaz E. Degradation of aromatic compounds in *Pseudomonas*: A systems biology view // Aerobic Utilization of Hydrocarbons, Oils and Lipids Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. / Ed. Rojo F. Springer, Cham., 2017. P. 1-49. https://doi.org/10.1007/978-3-319-39782-5 32-1

Okorie I.E., Chukwudi N.R. A review of fungal influenced corrosion of metals // Zastita Materijala. 2021. V. 62. P. 333-339.

https://doi.org/10.5937/zasmat2104333O

Reyes-Sosa M.B., Apodaca-Hernández J.E., Arena-Ortiz M.L. Bioprospecting for microbes with potential hydrocarbon remediation activity on the northwest coast of the Yucatan Peninsula, Mexico, using DNA sequencing // Sci. Total Environ. 2018. V. 642. P. 1060-1074. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.097

Srikanth M., Sandeep T.S.R.S., Sucharitha K., Godi S. Biodegradation of plastic polymers by fungi: a brief review // Bioresour. Bioprocess. 2022. V. 9. 42.

https://doi.org/10.1186/s40643-022-00532-4

Stamps B.W., Lyles C.N., Suflita J.M., Masoner J.R., Cozzarelli I.M., Kolpin D.W., Stevenson B.S. Municipal solid waste landfills harbor distinct microbiomes // Front. Microbiol. 2016. V. 7. 00534.

https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00534

Tischler D., Kermer R., Gröning J.A.D., Kaschabek S.R., van Berkel W.J.H., Schlömann M. StyA1 and StyA2B from Rhodococcus opacus 1CP: a multifunctional styrene monooxygenase system // J. Bacteriol. 2010. V. 192. P. 5220-5227.

https://doi.org/10.1128/JB.00723-10

Tourova T., Sokolova D., Nazina T., Grouzdev D., Kurshev E., Laptev A. Biodiversity of microorganisms colonizing the surface of polystyrene samples exposed to different aqueous environments // Sustainability. 2020. V. 12. 3624. https://doi.org/10.3390/su12093624

Verma H., Kumar R., Oldach P., Sangwan N., Khurana J.P., Jack A Gilbert J.A., Lal R. Comparative genomic analysis of nine Sphingobium strains: insights into their evolution and hexachlorocyclohexane (HCH) degradation pathways // BMC Genomics. 2014. V. 15. 1014.

https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-1014

Yoshida S., Hiraga K., Takehana T. Taniguchi I., Yamaji H., Maeda Y., Toyohara K., Miyamoto K., Kimura Y., Oda K. A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate) // Science. 2016. V. 353. P. 759–759. https://doi.org/10.1126/science.aad6359

Zeghal E., Vaksmaa A., Vielfaure H., Boekhout T., Niemann H. The potential role of marine fungi in plastic degradation —

A review // Front. Mar. Sci. 2021. V. 8. 738877. https://doi.org/10.3389/fmars.2021.738877

Zhuang L., Tang Z., Ma J., Yu Z., Wang Y., Tang J. Enhanced anaerobic biodegradation of benzoate under sulfate-reducing conditions with conductive iron-oxides in sediment of Pearl River estuary // Front Microbiol. 2019. V. 10. 374.

https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00374

# Composition of Microbial Fouling on the Surface of Plastics and Steel Exposed in a Pond at a Solid Waste Landfill

T. P. Tourova<sup>1</sup>, D. S. Sokolova<sup>1</sup>, E. M. Semenova<sup>1</sup>, D. M. Kireev<sup>2</sup>, A. B. Laptev<sup>3</sup>, and T. N. Nazina<sup>1</sup>, \*

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

<sup>2</sup>Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Ufa State Petroleum Technological University", Ufa, 450064 Russia

<sup>3</sup>All-Russian Scientific Research Institute of Aviation Materials, NRC "Kurchatov Institute", Moscow, 105005 Russia \*e-mail: nazina@inmi.ru

Received June 9, 2022; revised July 5, 2022; accepted July 7, 2022

**Abstract**—The work was aimed at investigation of the composition of microbial communities formed on the surface of samples of polyethylene terephthalate (PET), polystyrene (PS) and steel (ST) materials that were exposed in a small pond located at the territory of a solid waste landfill. The taxonomic composition of bacteria and fungi was determined by high-throughput sequencing of the V4 region of the 16S rRNA gene and of the ITS ribosomal operon, respectively. Bioinformatic analysis revealed predominance of bacteria of the phyla Pseudomonadota, Actinomycetota, Bacteroidota, and Bacillota in the biofilms formed on all samples. The observed quantitative changes in the composition of the dominant bacterial taxa were associated mainly with the exposure time, rather than the material of the samples. The iVikodak program was used to predict the functional characteristics of bacteria in the biofilms. The studied bacterial communities were shown to be potentially able to cause the degradation of polymer materials and xenobiotics and corrosion of steel. The fungal communities were dominated by saprotrophic representatives of the phyla Ascomycota and Basidiomycota. The effect of the conditions of the aquatic environment on the overall composition of the fungal community during exposure turned out to be less significant than that observed for bacteria; similar to the effect of the sample material, it could be traced for certain fungal genera. Among the dominant fungi, species potentially capable of biodegradation of polymers and corrosion of metals were identified. Microscopy confirmed the local degradation of the initial samples of materials as a result of exposure to the aquatic environment. Pure bacterial cultures of the genera Bacillus and Brevundimonas were isolated, which degraded alkanes, fatty acids, and phenols.

**Keywords:** solid waste landfills, high-throughput sequencing, the 16S rRNA gene, ITS, bacteria, fungi, polyethylene terephthalate, polystyrene, steel, xenobiotics, functional activity, biodegradation