ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ ПОЧВ. СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ПОЧВ И ЭКОСИСТЕМ РОССИИ И СОПРЕДЕЛЬНЫХ ТЕРРИТОРИЙ

DOI [dx.doi.org/10.24866/7444-4707-6/227-235](https://doi.org/10.24866/7444-4707-6/227-235)

М.Л. Сидоренко, Н.А. Слепцова

РАЗНООБРАЗИЕ И ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ СВОЙСТВА ПСИХРОФИЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ ПОЧВ МОРСКОГО ПОБЕРЕЖЬЯ ПРИМОРСКОГО КРАЯ

Почва как полифункциональная гетерогенная открытая четырехфазная структурная система, характеризующаяся широким разнообразием экологических условий, обуславливает множество сред обитания. Применительно к миру микроорганизмов понятие о почве как множестве сред обитания микроорганизмов введено Д.Г. Звягинцевым (1987). Большинство распространенных в почве микроорганизмов, а также большинство микроорганизмов, участвующих в процессах биологического превращения веществ, относится к мезофилам с температурным оптимумом +25+40⁰С. Психрофильные микроорганизмы обитают, в основном, в почвах северных регионов и предпочитают температуры не выше 10⁰С. При низкой температуре снижаются питательные потребности бактерий, расширяется круг потребляемых субстратов, бактерии не нуждаются в добавочных факторах роста. Все эти особенности низкотемпературного метаболизма микроорганизмов позволяют им длительно размножаться в окружающей среде при низкой температуре.

Психрофильные бактерии стали активно изучать (Feller, Gerday, 2003) из-за наличия у них холодоактивных ферментов, с потенциальной возможностью применения в широком диапазоне промышленных, сельскохозяйственных и медицинских производств. Ферментные системы психрофильных микроорганизмов продуцируют биологически активные вещества обладающие активностью в более широком диапазоне температур, по сравнению с мезофильными микроорганизмами, поэтому имеют особое

значение для биотехнологии (Нетрусов и др., 2004). Психрофилы являются также цепным источником генов, обеспечивающих возможность создания рекомбинантных суперпродуцентов с расширенными возможностями (Bell et. al., 2002; Robertson, Steer, 2004). Микроорганизмы, присутствующие в районах с постоянно низкими температурами, являются богатыми источниками ферментов (Kennedy et. al., 2008), фармацевтических препаратов (Guider, Moore, 2009; Haygood et. al., 1999), биотоплива, антимикробных соединений (Newman, Hill, 2006) и т.д.

Географическое положение Приморского края, уникальные геологические особенности и климат обеспечивают богатые источники разнообразия психрофильных микроорганизмов.

Цель исследования – выделение и изучение психрофильных бактерий из почв Приморского края.

В качестве объектов исследования служили образцы почв, отобранные на морском побережье Приморского края, отличающиеся природными особенностями, характером и степенью антропогенной нагрузки. Район работ включал побережье бухт Золотой Рог (г. Владивосток), Находка (г. Находка), Троицы (Хасанский район) испытывающих значительное влияние промышленных, бытовых и речных стоков, а также бухты Круглая (о. Русский), не обремененная значительными нагрузками антропогенного характера.

Образцы почвы, каждый весом около 30г (без содержания льда) отбирались в течение марта 2018г. До отбора образца 1-2 см поверхности почвы удаляли стерильным шпателем, затем использовали другой стерильный шпатель, с помощью которого почву собирали, переносили в стерильные полипропиленовые пакеты. Пакеты транспортировали в лабораторию в стерильных сумках-холодильниках и хранили до исследования при -16°C не более 2-х суток.

Для выделения культивируемых бактерий проводили посев почвы на пептонный агар (ПА) (1% пептона ("Микроген" ФГУП НПО МЗ РФ), 0,5% NaCl на дистиллированной воде с 2%-ным агаром, pH 7,4). Примерно 1 г образца почвы суспендировали в 0,9% NaCl и встряхивали в течение 2 ч при 15°C . Для изоляции бактерий, 100 мкл образца почвенной суспензии высевали на поверхность плотной питательной среды (ПА) и инкубировали при 4°C в течение 15 дней (Reddy et. al., 2008). Регистри-

ровали количество колоний и разные морфотипы очищали и поддерживали на агаровой среде ПА.

Рост при разных температурах (4, 18, 30, 37⁰С) Проверяли с использованием питательного бульона (ПБ) (1% пептона ("Микроген" ФГУП НПО МЗ РФ), 0,5% NaCl на дистиллированной воде, pH 7,4)

Внеклеточные ферментативные активности, такие как липазу (Booth, 1978), амилазу и протеазу (Priest, 1977) проверяли путем инкубации на агаровых пластинах АВМ, дополненных либо 0,2% растворимыми крахмал, 1% Твин-60 вместе с 0,01% CaCl₂, 0,3% казеина, соответственно, и инкубировали при 4 и 18⁰С в течение 5-10 дней.

Изучение морфологических признаков и физиолого-биохимических свойств выделенных бактерий учитывали в соответствии с классическими микробиологическими методами (Винникова и др., 2011). Идентификацию проводили с помощью определителя Берджи (Brenner et al., 2004) и также были использованы наборы для идентификации API (BioMerieux, Франция). Некоторые штаммы, вызывающие затруднения при идентификации, были определены амплификацией гена 16S rRNA с помощью ПЦР с использованием праймеров 968F (5'-AAC GCG AAG AAC CTT AC-3') с GC clamp (5'-CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G-3') (Heuer et al., 1997) и 1392R (5'-ACG GGC GGT GTG TAC-3') (Ferris et al., 1996). Окончательная идентификация проведена с использованием базы данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (Ferris et. al., 1996; Heuer et. al., 1997)

В ходе исследования было выделено 89 изолятов бактерий из почв морского побережья: 30 – побережье Золотого Рога, 19 – побережье бухты Троица, 24 – побережье бухты Находка и 16 – побережье бухты Круглая. Для дальнейших исследований все изоляты были сгруппированы в 19 морфотипов на основе морфологии их колонии.

Для определения таксономической принадлежности полученных микроорганизмов проводилось изучение их культуральных и физиолого-биохимических свойств с помощью классических микробиологических методов.

Таксономический анализ всех 19 штаммов различного морфотипа, выделенных из образцов почвы, показал, что 4 штамма были грамотрицательными и 15 были грамположительными. Результаты биохимических исследований и API-тестов показали, что пять штаммов принадлежали к

роду *Kocuria*, шесть штаммов – к роду *Staphylococcus*, по два штамма – к родам *Bacillus* и *Pseudomonas*, и по одному штамму принадлежали к родам *Carnobacterium*, *Escherichia*, *Serratia*, *Agrococcus* (таблица 1).

По результатам таксономического исследования обнаружено присутствие бактерий рода *Staphylococcus* в почвах прибрежных территорий трех бухт (Троицы, Золотой рог, Находка). Бактерии рода *Kocuria* также обнаружены в почвах прибрежных территорий трех бухт (Троицы, Находка и Круглая).

Отобранные 19 штаммов были исследованы на психрофильность. В результате установлена психротолерантность всех 19 изолятов, все они могли расти в диапазоне 4- 30⁰С или 4-37⁰С (табл. 1).

Активность амилазы была обнаружена у большинства штаммов (11 из 19), при этом она не зависела от температурного режима (таблица 1). Активность липазы обнаруживалась у всех штаммов при 4⁰С, а при 20⁰С таким свойством обладали только 9 из 19 штаммов. Протеазная активность при 4⁰С обнаруживалась только у двух штаммов: *Pseudomonas japonica* sK18 и *Serratia liquefaciens* sGB11, при этом при 20⁰С протеазную активность показали 12 штаммов (рис. 1).

Таблица 1

Характеристики и ферментативная активность бактериальных штаммов, выделенных из образцов почвы морского побережья Приморского края

Район выделения	Номер штамма	Родовая принадлежность	Принадлежность по Граму	Диапазон ростовых температур, °С	Ферментативная активность					
					амилаза		протеаза		липаза	
					4 ⁰ С	20 ⁰ С	4 ⁰ С	20 ⁰ С	4 ⁰ С	20 ⁰ С
Бухта Троицы	sT14	<i>Carnobacterium</i>	+	4-30	+	+	-	-	+	-
	sT16	<i>Kocuria</i> ,	+	4-30	+	+	-	-	+	-
	sT12	<i>Staphylococcus</i>	+	4-37	-	-	-	+	+	+
	sT13	<i>Staphylococcus</i>	+	4-37	-	-	-	+	+	+
	sT24	<i>Staphylococcus</i>	+	4-37	-	-	-	+	+	+

Бухта Круглая	sK13	<i>Kocuria</i>	+	4-30	+	+	-	-	+	-
	sK16	<i>Kocuria</i>	+	4-30	+	+	-	-	+	-
	sK18	<i>Pseudomonas</i>	-	4-30	+	+	+	+	+	+
	sK17	<i>Kocuria</i>	+	4-30	+	+	-	-	+	-
	sK15	<i>Bacillus</i>	+	4-30	-	-	-	+	+	+
	sK26	<i>Bacillus</i>	+	4-30	-	-	-	+	+	+
Бухта Золотой рог	sGB18	<i>Escherichia</i>	-	4-37	-	+	-	-	+	-
	sGB19	<i>Pseudomonas</i>	-	4-30	+	+	-	+	+	-
	sGB11	<i>Serratia</i>	-	4-30	+	+	+	-	+	-
	sGB16	<i>Staphylococcus</i>	+	4-37	-	-	-	+	+	+
Бухта Находка	sN13	<i>Staphylococcus</i>	+	4-37	-	-	-	+	+	+
	sN24	<i>Staphylococcus</i>	+	4-37	-	-	-	+	+	+
	sN25	<i>Agrococcus</i>	+	4-30	+	+	-	+	+	-
	sN11	<i>Kocuria</i>	+	4-30	+	+	-	+	+	-

Рис. 1. Ферментативная активность выделенных штаммов
в отношении органических субстратов:
а) липолитическая активность; б) протеолитическая активность

В результате исследований выделяются два штамма, обладающие наилучшей ферментативной активностью. Штамм и *S. liquefaciens* sGB11, выделенный из прибрежных почв бухты Золотой рог, обладает амилазной, протеазной и липазной активностью при 4⁰С, при 20⁰С показывает только амилазную активность. Штамм *P. japonica*. sK18 выделенный из прибрежных почв бухты Круглая обладает полным набором исследованных активностей не зависимо от температуры.

Бактерии рода *Pseudomonas*, по литературным данным, выделяются из активного ила на муниципальных очистных сооружениях в Японии, с возможностью использования алкилфенола с прямой цепью от 1 до 9 атомов углерода (Pungrasmi et. al., 2008). В питательном бульоне штамм может расти на 30 и 37⁰С, но не могут расти при температуре 4⁰С или 42⁰С. Другая исследовательская группа опубликовала результаты своих исследований штамма *P. japonica*, выделенного из активного ила и способного вырабатывать сигнальные молекулы и образовывать биопленку в мембранном реакторе (Lade et. al., 2014). В нашем предварительном исследовании штамм *P. japonica* sK18, выделенный из почвы морского побережья б. Круглая, обладает способностью продуцировать ферменты, разрушающие крахмал, Твин-60 и казеин, а активность не зависит от температуры культивирования (рис. 2).

Бактерии рода *Serratia* являются факультативными анаэробами, которые могут быть обнаружены в окружающей среде и способны колонизировать в почве, воде и пищеварительных трактах грызунов, насекомых, рыб, людей и на растениях (Labbate et. al., 2004). Было доказано, что эта бактерия обладает противогрибковыми свойствами в ризосфере растений (Kalbe et. al., 1996). Мы выделили штамм *S. liquefaciens* sGB11 из почвы морского побережья б. Золотой Рог, который показывает активность широкого спектра гидролитических ферментов в диапазоне 4⁰С (рис. 3).

Рис. 2. Ферментативная активность изолированного нами штамма *Pseudomonas japonica* sK18, выделенный из почвы морского побережья б. Круглая (усредненные данные трехкратного эксперимента)

Рис. 3. Ферментативная активность изолированного нами штамма *Serratia liquefaciens* sGB11 из почвы морского побережья б. Золотой Рог (усредненные данные трехкратного эксперимента)

Таким образом, из почв морского побережья выделено 19 психротолерантных штаммов. Холодоактивные ферменты психротолерантных бактериальных штаммов *S. liquefaciens* sGB11 и *P. japonica* sK18, выделенных из почв морского побережья Приморского края могут дать новые возможности для биотехнологического использования.

Исследование поддержано Президиумом ДВО РАН (проект 18-МНТ-010).

Литература

1. Винникова О.И. Выделение и идентификация бактерий: методические рекомендации для студентов биологического факультета специализации "Микробиология и вирусология" / О.И. Винникова, А.М. Самойлов, Ю.В. Попова. – Х.: ХНУ имени В. Н. Каразина. 2011. 60 с.
2. Звягинцев Д.Г. Почва и микроорганизмы. / Д.Г. Звягинцев. – М.: Изд-во Московск. ун-та. 1987. 355 с.
3. Нетрусов А.И. Экология микроорганизмов: Учеб. для студ. вузов. Под ред. А.И. Нетрусова / А.И. Нетрусов, Е.А. Бонч-Осмоловская, В.М. Горленко. – М.: Академия, 2004. 272 с.
4. Bell N. Methyl iodide: Atmospheric budget and use as a tracer of marine convection in global models. / N. Bell, L. Hsu, D.J. Jacob, M.G. Schultz, D.R. Blake, J.H. Butler, D.B. King, J.M. Lobert, E. Maier-Reimer // Journal of

Geophysical Research: Atmospheres. 2002. T. 107. №. D17. C. ACH 8-1-ACH 8-12. doi:10.1029/2001JD001151.

5. Booth C. Introduction to general methods. In: *Methods Microbiology*. / C. Booth (ed.). New York: Academic Press. 1978. C. 57 – 91.

6. Garrity G.M. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 2: The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria*. / G.M. Garrity, D.J. Brenner, N.R. Krieg, J.R. Staley. Springer Science & Business Media. 2004. C. 1136. ISBN: 978-0-387-95040-2.

7. Feller G. Psychrophilic enzymes: hot topics in cold adaptation. / G. Feller, C. Gerday // *Nature reviews microbiology*. 2003. T. 1. №. 3. C. 200.

8. Ferris M. J. Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community. / M.J. Ferris, G. Muyzer, D.M. Ward // *Appl. Environ. Microbiol.* 1996. T. 62. №. 2. C. 340 – 346.

9. Gomes J. The biocatalytic potential of extremophiles and extremozymes. / J. Gomes, W. Steiner // *Food technology and Biotechnology*. 2004. T. 42. №. 4. C. 223 – 225.

10. Gulder T. A. M. Chasing the treasures of the sea—bacterial marine natural products. / T.A.M. Gulder, B.S. Moore // *Current opinion in microbiology*. 2009. T. 12. №. 3. C. 252 – 260.

11. Haygood M. G. Microbial symbionts of marine invertebrates: opportunities for microbial biotechnology. / M.G. Haygood, E.W. Schmidt, S.K. Davidson, D.J. Faulkner // *Journal of molecular microbiology and biotechnology*. 1999. T. 1. №. 1. C. 33 – 43.

12. Heuer H. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. / H. Heuer, M. Krsek, P. Baker, K. Smalla, E.M. Wellington // *Appl. Environ. Microbiol.* 1997. T. 63. №. 8. C. 3233 – 3241.

13. Kalbe C. Strains of the genus *Serratia* as beneficial rhizobacteria of oilseed rape with antifungal properties. / C. Kalbe, P. Marten, G. Berg // *Microbiological research*. 1996. T. 151. №. 4. C. 433 – 439.

14. Kennedy J. Marine metagenomics: strategies for the discovery of novel enzymes with biotechnological applications from marine environments. / J. Kennedy, J.R. Marchesi, A.D.W. Dobson // *Microbial cell factories*. 2008. T. 7. №. 1. C. 27.

15. Labbate M. Quorum sensing-controlled biofilm development in *Serratia liquefaciens* MG1. / M. Labbate, S.Y. Queck, K.S. Koh, S.A. Rice, M. Givskov, S. Kjelleberg // *Journal of bacteriology*. 2004. T. 186. №. 3. C. 692 – 698.
16. Lade H. Isolation and molecular characterization of biofouling bacteria and profiling of quorum sensing signal molecules from membrane bioreactor activated sludge. / H. Lade, D. Paul, J. Kweon // *International journal of molecular sciences*. 2014. T. 15. №. 2. C. 2255 – 2273.
17. Newman D. J., Hill R. T. New drugs from marine microbes: the tide is turning. / D.J. Newman, R.T. Hill // *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2006. T. 33. №. 7. C. 539 – 544.
18. Priest F. G. Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. / F.G. Priest // *Bacteriological reviews*. 1977. T. 41. №. 3. C. 711.
19. Pungrasmi W. *Pseudomonas japonica* sp. nov., a novel species that assimilates straight chain alkylphenols. / W. Pungrasmi, H.S. Lee, A. Yokota, A. Ohta // *The Journal of general and applied microbiology*. 2008. T. 54. №. 1. C. 61- 69.
20. Reddy G. S. N. *Leifsonia pindariensis* sp. nov., isolated from the Pindari glacier of the Indian Himalayas, and emended description of the genus *Leifsonia*. / G.S.N. Reddy, S.R. Prabakaran, S. Shivaji // *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 2008. T. 58. №. 9. C. 2229 – 2234.
21. Robertson D. E. Recent progress in biocatalyst discovery and optimization. / D.E. Robertson, B.A. Steer // *Current opinion in chemical biology*. 2004. T. 8. №. 2. C. 141 – 149.
22. Russell N. J. Molecular adaptations in psychrophilic bacteria: potential for biotechnological applications. / N.J. Russell // *Biotechnology of Extremophiles*. – Springer, Berlin, Heidelberg, 1998. C. 1 – 21.