ЭКОБИОТЕХ

ISSN 2618-964X

<http://ecobiotech-journal.ru>

НОВЫЙ ШТАММ *PARARHIZOBIUM* SP. IB ST 1-4, ВЫДЕЛЕННЫЙ ИЗ ВТОРИЧНОГО МИНЕРАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ ПЕЩЕРЫ ШУЛЬГАН-ТАШ

Рябова А.С.*, Ясаков Т.Р., Гильванова Е.А.,
Кузьмина Л.Ю.

Уфимский Институт биологии Уфимского федерального
исследовательского центра РАН, Уфа (Россия)

*E-mail: alenarya@rambler.ru

Впервые из вторичного минерального образования (субаквальных сталактоидов) пещеры Шульган-Таш, расположенной на территории Южного Урала, был выделен представитель бактерий рода *Pararhizobium* (штамм IB St 1-4). Представители рода *Pararhizobium* являются почвенными азотфиксирующими бактериями, ассоциированными с корневой системой бобовых растений. Клетки штамма IB St 1-4 представляют собой прямые, грамтрицательные, палочки размером 0,5-0,7×2,0-2,5 мкм. Диапазон температуры роста бактерий составлял 4-28°C, оптимальное значение pH – 6-8. В лабораторных условиях данный штамм вызывал образование кристаллов кальцита на питательных средах, содержащих кальциевые соли яблочной кислоты. Анализ физиолого-биохимических особенностей штамма, а также филогенетический анализ последовательности гена 16S рПНК выявил его родство с представителями видов *Pararhizobium herbae*, *Pararhizobium giardinii* и *Pararhizobium polonicum*. Симбиотические гены *nifH* и *nodC*, ответственные за азотфиксацию и нодуляцию в симбиозе с бобовыми растениями, у штамма IB St 1-4 не были обнаружены.

Ключевые слова: род *Pararhizobium*, *Pararhizobium herbae*, субаквальные сталактоиды, бассейновые пальцы, пещерные микроорганизмы, кристаллообразование

NEW STRAIN OF *PARARHIZOBIUM* SP. IB ST 1-4 ISOLATED FROM POOL FINGERS OF SHULGAN-TASH CAVE

Ryabova A.S.*, Iasakov T.R., Gilvanova E.A.,
Kuzmina L.Y.

Ufa Institute of Biology of the Ufa Federal Research Centre of
the Russian Academy of Sciences, Ufa (Russia)

*E-mail: alenarya@rambler.ru

From the mineral formation (pool fingers) of the shulgan-Tash cave (Southern Urals) the first member of bacterial genus *Pararhizobium* was isolated (strain IB St 1-4). *Pararhizobium* is a genus of soil bacteria that fix nitrogen association with roots of legumes. Cells IB St 1-4 strain are Gram-negative straight rod-shaped bacterium (0,5-0,7×2,0-2,5µm). Growth is observed at 4-28°C with an optimum pH at 6-8. The strain precipitating of calcium carbonate on Ca-salts of malic acid *in vitro*. The relatedness of strain IB St 1-4 to members of *Pararhizobium herbae*, *Pararhizobium giardinii* and *Pararhizobium polonicum* species was revealed according physiological and biochemical features as well as phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene sequence. The genes *nifH* and *nodC* that responsible for nitrogen fixation and plant nodulation in the strain IB St 1-4 were not detected.

Keywords: genera *Pararhizobium*, *Pararhizobium herbae*, subaqueous stalactoids, pool fingers, cave microorganisms, biocrystallization

Поступила в редакцию: 23.10.2020

DOI: [10.31163/2618-964X-2020-3-4-706-711](https://doi.org/10.31163/2618-964X-2020-3-4-706-711)

ВВЕДЕНИЕ

Пещеры представляют собой уникальные экосистемы с экстремальными условиями обитания и специфичным сообществом микроорганизмов [Bastian et al., 2009]. В спелеосистеме Шульган-Таш было обнаружено ранее не описанное на территории России вторичное минеральное образование, известное как субаквальные сталактоиды [Chervyatsova et al., 2018]. Спелеотемы представляют собой вертикально ориентированные удлиненные

цилиндры в водных объектах пещер [Queen et al., 2006]. При исследовании субаквальных сталактоидов была выдвинута теория их биогенного происхождения, согласно которой их образование происходит в несколько этапов. В пещере происходит быстрый рост гетеротрофных микроорганизмов за счет периодически поступающих с поверхности воды и питательных веществ, под воздействием бактерий увеличивается выпадение кристаллов кальцита. Микробный рост замедляется при истощении резервов органического вещества, происходит погребение колоний под минеральной коркой [Melim et al., 2001]. Выделение из минеральных субстратов микроорганизмов и определение их физиологических свойств представляет интерес для понимания значимости микробной жизни в преобразовании соединений кальция.

Целью данной работы являлось таксономическое и физиолого-биохимическое описание штамма IB St 1-4, выделенного из субаквальных сталактоидов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Пещера Шульган-Таш (Капова) расположена на территории Южного Урала (53°02'40" с.ш. и 57°03'50" в.д.). Полость залегает в известняках визейского яруса верхнего карбона (C1V) и представляет собой трехэтажную слабоветвленную систему крупных залов и галерей, нижний уровень занят подземной рекой Шульган. Образец минерального образования был отобран с северной стены ниже уреза воды Дальнего озера. Выделение микроорганизмов осуществляли путем посева суспензии измельченных кристаллов на плотную питательную среду Gran (вариант 3 с изменениями) и мясопептонный агар (ГМФ агар). Состав среды Gran (вариант 3) с изменениями (г/л): KNO_3 – 0,5; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ – 0,25; янтарная кислота – 3,54; CaCl_2 – 3,3; агар – 15 [Danielli, Edington, 1983]. Инкубирование проводили при комнатной температуре в течение 3 недель.

Морфологию колоний и клеток изучали в 24-48 часовой культуре на мясопептонном, бобовом и картофельном агарах. Наличие оксидазы определяли с помощью 1% (в/об) раствора тетраметил-п-фенилендиамин дигидрохлорида, каталазы – 3% раствора пероксида водорода. Способность изолята к редукции нитрата и денитрификации нитрита определяли при культивировании на мясопептонном бульоне [Neyra et al., 1977]. Уреазу определяли на агаре Кристенсена с мочевиной [Christensen, 1946]. Наличие аргинин- и орнитиндекарбоксилазы, способность гидролизовать крахмал и эскулин определяли по Герхарду [Gerhardt et al., 1981]. Изучение способности изолята использовать органические соединения в качестве источника углерода и энергии проводили на жидкой среде Козера, при внесении 0,1% источника углерода и красителя бромтимоловый синий (0,06%). Рост штамма в диапазоне значений pH 4,5-10,0 изучали в жидкой среде Козера. Галотолерантность изолята определяли в бульоне Хотингера.

Идентификацию бактерий проводили на основании анализа частичной последовательности гена 16S рРНК. Амплификацию фрагмента гена 16S рРНК проводили с использованием универсальных бактериальных праймеров 27F на амплификаторе «My Cycler» («Bio-Rad Laboratories», США). Полимеразную цепную реакцию выполняли в 25 мкл смеси, состоящей из 10 х буфера для *Taq*-полимеразы, 0,25 мМ дНТФ, 1,5 мМ MgCl_2 , 0,4 мкМ каждого праймера, 5 ед. акт. *Taq*-полимеразы и 10 нг геномной ДНК в следующих условиях: 95°C – 5 минут, далее 30 секунд при 94°C, 30 секунд при 55°C и 1 минута 20 секунд при 72°C – 30 циклов, 5 минут при 72°C в амплификаторе «My Cycler» («Bio-Rad», США).

Последующую секвенирующую ПЦР проводили с применением набора реактивов Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit («Applied Biosystems», США) согласно инструкциям производителя. Секвенирование частичной последовательности гена 16S рРНК осуществляли с применением набора реактивов Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit на автоматическом секвенаторе Genetic Analyser 3500XL («Applied Biosystems», США).

Филогенетический анализ проводили с помощью баз данных и методик, описанных ранее [Korobov et al., 2017; Iasakov et al., 2019]. Частичная последовательность гена 16S рРНК штамма IB St 1-4 длиной 1355 п.н. депонирована в базу данных GenBank под номером MN173866.

В качестве генов-маркеров, участвующих в становлении азотфиксирующего симбиоза с растением, были выбраны симбиотические гены, являющиеся элементами аксессуарной части генома ризобий: ген *nifH* (ответственный за фиксацию азота) и ген *nodC* (отвечающий за нодуляцию). ПЦР-амплификации генов *nodC* и *nifH* были выполнены с использованием праймеров и протокола, как описано в работе [Laguerre et al., 2001].

РЕЗУЛЬТАТЫ

На среде Gran был обнаружен рост округлых, слизистых, выпуклых, полупрозрачных бактериальных колоний, в биомассе которых происходило образование кристаллов кальцита. Эти колонии были выделены в чистую культуру. Рост штамма на бобовом агаре и средах с солями органических кислот на 2 сутки был представлен выпуклыми, округлой формы с ровными краями, полупрозрачными, слизистыми колониями. Рост на МПА и картофельном агаре замедлен (5-7 сутки), колонии прозрачные. При росте на использованных средах бактерии выделяли большое количество экзополимерного вещества.

Клетки штамма IB St 1-4 представляют собой прямые, грамотрицательные, строго аэробные, подвижные палочки размером 0,5-0,7×2,0-2,5 мкм. Оксидазоположительные и каталазоотрицательные. Уреазаположительные, аммонифицируют белки. Денитрификация нитрата проходит до азота. Штамм не гидролизует желатин и крахмал, но гидролизует эскулин. По аргинин- и орнитиндекарбоксилазе положительный. Штамм IB St 1-4 растет на следующих углеводах с образованием кислоты: D- и L-арабинозе, D-ксилозе, D-ликозе, D-рибозе, галактите, D-галактозе, D-глюкозе, D-манните, D-маннозе, сорбите, L-сорбозе, D-фруктозе, L-рамнозе, лактозе, мальтозе, мелибиозе, D-раффинозе, сахарозе, α-трегалозе, целлюлозе, но не использует инулин и мелицитозу. Из аминокислот растет на аспарагиновой кислоте и DL-фенилаланине, но не культивируется на аланине, аспарагине, L-валине, DL-глутаминовых кислотах, лейцине, DL-серине, DL-тирозине. Из органических кислот потребляет: яблочную, янтарную, уксусную и пировиноградную, но не использует лимонную, малоновую, молочную, пропионовую и муравьиную кислоты. В качестве источника углерода может использовать инозит, глицерин, мио-инозитол, арбутин. Не использует инозин и уридин.

Бактерии растут при температуре 4-28°C и pH 6-8 с оптимумом – 7,0. Рост штамма происходит при концентрации NaCl 0,5-1,0%, свыше 1,5% – отсутствует.

Идентификация штамма IB St 1-4 проводилась на основании результатов сравнительного анализа его частичной последовательности гена 16S рРНК (1355 п.н.) и близких ему последовательностей других типовых видов бактерий родов *Pararhizobium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Ensifer*, *Ciceribacter*. Уровень идентичности между ними находился в диапазоне 94,69-99,62%. При этом наиболее близкими к исследуемому были

типовые штаммы *Rhizobium herbae* CCBAU 83011 (99,62%), *Rhizobium giardinii* H152 (99,4%) и *Pararhizobium polonicum* F5.1 (99,22%). Следует отметить, что согласно современным представлениям, ряд видов бактерий рода *Rhizobium* выделены в отдельный род *Pararhizobium*. Среди них, в том числе, и бывшие *Rhizobium herbae*, *Rhizobium giardinii* и *Rhizobium sphaerophysae*, которые теперь обозначаются как *Pararhizobium herbae*, *Pararhizobium giardinii* и *Pararhizobium sphaerophysae*, соответственно [Mousavi et al., 2015]. Таким образом, наиболее близкими к исследуемому штамму были типовые представители бактерий рода *Pararhizobium*. На основе строения филогенетического дерева (рисунок) можно предположить, что исследуемый штамм дивергировал от общего предка с неизвестным видом, от которого позже дивергировали *Pararhizobium herbae* CCBAU 83011 и *Pararhizobium polonicum* F5.1.

Рисунок. Филогенетическое дерево на основе сравнительного анализа частичной последовательности гена 16S рРНК (1355 п.н.) штамма IB St 1-4 и гомологичных ему последовательностей типовых видов бактерий родов *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Ensifer*. Достоверность ветвления, рассчитанная с помощью «bootstrap»-анализа (значимыми признаются величины больше 50), указана цифрами. Масштаб отражает эволюционное расстояние, соответствующее 5 нуклеотидным заменам на каждые 1000 нуклеотидов. Номера, под которыми последовательности зарегистрированы в базе данных GenBank, указаны в скобках.

Наш штамм, протестированный в ПЦР с праймерами, комплементарными генам *nifH* и *nodC*, которые обычно локализованы в симбиотических плазмидах, не проявил положительной реакции. Отсутствие симбиотических плазмид частое явление среди свободноживущих ризобий, так как плазмиды *pSym*s не важны для выживания штаммов *Rhizobium* в почве в гетеротрофном состоянии. Полученные результаты позволяют предположить, что наш штамм не обладает генами, ответственными за азотфиксирующую и нодулирующую активность, и эта особенность отличает его от близкородственных *P. herbae* и *P. giardinii*, известных как микросимбионты растений [Zhao et al., 2008].

Изучаемый штамм в отличие от наиболее близких к нему типовых *Pararhizobium herbae* ССВАУ 83011^T [Ren et al., 2011] и *Pararhizobium polonicum* F5.1 [Puławska et al., 2016] является свободноживущим, выделен из минерального образования, а не из ризосферы или клубеньков растений. Так же ранее бактерии рода *Rhizobium* выделялись с каменных субстратов, погруженных в воду [Sukhanova et al., 2019]. Общим для трех штаммов является потребление глюкозы, мальтозы, раффинозы, сахарозы, трегалозы, фруктозы, рамнозы, маннозы, маннита, сорбита и лактозы. Отличительной чертой является способность потреблять аргинин, но не – глутаминовую кислоту.

Сродство штамма IB St 1-4 и *Pararhizobium herbae* заключается в потреблении аргинина, а с *Pararhizobium polonicum* в использовании в качестве источника углерода мелибиозы и отсутствии роста на аланине и лимонной кислоте.

В лабораторных условиях рост *Pararhizobium* sp. IB St 1-4 на средах с органическими кислотами и соединениями кальция приводил к образованию кристаллов кальцита, повышая pH среды до 8,40 [Leonova et al., 2016]. Известно, что представители ризобий способны в большом количестве выделять липополисахариды [Carlson, 1982] и экзополисахариды [Mukherjee et al., 2011]. Фактором пассивной минерализации в нашем случае может служить синтез ЭПС.

Таким образом, штамм IB St 1-4, выделенный из минерального образования пещеры Шульган-Таш, относится к роду *Pararhizobium* и близок к *Pararhizobium herbae* и *Pararhizobium polonicum*.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

При проведении исследований использовали оборудование ЦКП «Агидель» УФИЦ РАН. Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России № 075-00326-19-00 по теме № АААА-А18-118022190098-9 и при частичной финансовой поддержке РФФИ и Правительства Республики Башкортостан в рамках гранта № 17-44-020091 p_a.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. 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. N. 7. P. 863–868. DOI: 10.1007/s00114-009-0540-y
2. Carlson R.W. Surface chemistry. In Broughton (Editor), *Nitrogen Fixation II: Biology of the nitrogen-fixing organisms*. Vol. 2. Oxford: Oxford University Press, 1982. P. 199–234.
3. Chervyatsova O.Ya., Potapov S.S., Kuz'mina L.Y., Leonova L.V. Subaqueous stalactoids in the Dal'nee Verkhnee lake of the Shulgan-Tash cave (Southern Urals) // *News of the Ural State Mining University*. 2018. № 22(50). С. 20–25. DOI:10.21440/2307-2091-2018-2-20-25

4. Christensen W.B. Urea decomposition as a means of differentiating *Proteus* and paracolon organisms from each other and from *Salmonella* and *Shigella* types // J. Bacteriol. 1946. V. 52. N. 4. P. 461–455. DOI: [10.1128/jb.52.4.461-466.1946](https://doi.org/10.1128/jb.52.4.461-466.1946)
5. Danielli H.M.C., Edington M.A. Bacterial calcification in limestone caves // Geomicrobiol. J. 1983. V. 3. N. 1. P. 1–16. DOI: [10.1080/01490458309377780](https://doi.org/10.1080/01490458309377780)
6. Gerhardt P. Manual of Methods for General Bacteriology. Washington: American society for microbiology, 1981. 524 p.
7. Iasakov T.R., Anisimova L.G., Zharikova N.V., et al. Evolution and comparative genomic of the pSM22 plasmid of the IncF/MOB_{F12} group // Mol. Biol. 2019. V. 53. N. 4. P. 600–612. DOI: [10.1134/S0026893319040162](https://doi.org/10.1134/S0026893319040162)
8. Korobov V.V., Zhurenko E.I., Zharikova N.V., et al. Possibility of using phenol- and 2,4-dichlorophenol-degrading strain, *Rhodococcus erythropolis* 17S, for treatment of industrial wastewater // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2017. V. 72. N. 4. P. 201–205. DOI: [10.3103/S0096392517040083](https://doi.org/10.3103/S0096392517040083)
9. Laguerre G., Nour S.M., Macheret V., et al. Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts // Microbiology. 2001. V. 147. N. 4. P. 981–993. DOI: [10.1099/00221287-147-4-981](https://doi.org/10.1099/00221287-147-4-981)
10. Melim L.A., Shinglman K.M., Boston P.J., et al. Evidence for microbial involvement in pool finger precipitation, Hidden Cave, New Mexico // Geomicrobiol. J. 2001 V. 18. N. 3. P. 311–329. DOI: [10.1080/01490450152467813](https://doi.org/10.1080/01490450152467813)
11. Mousavi S.A., Willems A., Nesme X., et al. Revised phylogeny of *Rhizobiaceae*: Proposal of the delineation of *Pararhizobium* gen. nov. and thirteen new species combination // Syst. Appl. Microbial. 2015. V. 38. N. 2. P. 84–90. DOI: [10.1016/j.syapm.2014.12.003](https://doi.org/10.1016/j.syapm.2014.12.003)
12. Mukherjee S., Ghosh S., Sadhu S., et al. Extracellular polysaccharide production by a *Rhizobium* sp. isolated from legume herb *Crotalaria saltiana* Andr. // Indian Journal of Biotechnology. 2011. V. 10. N. 3. P. 340–345.
13. Neyra C.A., Döbereiner J., Lalande R., Knowles R. Denitrification by N₂-fixing *Spirillum lipoferum* // Can. J. Microbiol. 1977. V. 23. N. 3. P. 300–305.
14. Puławska J., Kuzmanović N., Willems A., Pothier J.F. *Pararhizobium polonicum* sp. nov. isolated from tumors on stone fruit rootstocks // Syst. Appl. Microbial. 2016. V. 39. N. 3. P. 164–169. DOI: [10.1016/j.syapm.2016.03.002](https://doi.org/10.1016/j.syapm.2016.03.002)
15. Queen L.M., Melim L.A. Biothems: biologically influenced speleothems in caves of the Guadalupe mountains, New Mexico, USA // Cave and Karst of Southeastern New Mexico. New Mexico Geological Society Guidebook, 57th Field conference, 2006. P. 167–174.
16. Ren D.W., Wang E.T., Chen W.F., et al. *Rhizobium herbae* sp. nov. and *Rhizobium giardinii*-related bacteria, minor microsymbionts of various wild legumes in China // Int. J. Sys. Evol. Micr. 2011. V. 61. N. 8. P. 1912–1920. DOI: [10.1099/ijss.0.024943-0](https://doi.org/10.1099/ijss.0.024943-0)
17. Sukhanova E.V., Shtykova Y.R., Suslova M.Y., et al. Diversity and physiological and biochemical properties of heterotrophic bacteria isolated from lake Baikal epilithic biofilms // Microbiology. 2019. V. 88. N. 3. P. 324–334. DOI: [10.1134/S0026261719030147](https://doi.org/10.1134/S0026261719030147)
18. Zhao C.T., Wang E.T., Chen W.F., Chen W.X. Diverse genomic species and evidences of symbiotic gene lateral transfer detected among the rhizobia associated with *Astragalus* species grown in the temperate regions of China // FEMS Microbiol. Lett. 2008. V. 286. N. 2. P. 263–273. DOI: [10.1111/j.1574-6968.2008.01282.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01282.x)