ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРИАЛЬНЫХ ИЗОЛЯТОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПОЧВ ВОСТОЧНОЙ АНТАРКТИДЫ

Сауткина Н.В., Миронова А.С., Мямин В.Е.

*Белорусский государственный университет, Минск,
sovgirnv@gmail.com*

Антарктика, отличающаяся суровыми условиями обитания, охватывает континент Антарктиду, а также окружающие острова и морские воды. Наличие полярного дня и ночи, критически низкие температуры, интенсивная солнечная радиация, низкая влажность воздуха, слабое развитие вод суши, выветривание почв, угнетение почвообразовательных процессов и высокие концентрации солей – основные факторы, определяющие специфику и особенности жизни в этом регионе [1]. Большинство организмов Антарктики относят к экстремофилам, так как они могут выживать в наиболее неблагоприятных условиях. При этом в пробах антарктических почв, льда и водоемов найдены как виды «универсалы», широко распространённые по всей территории планеты, так и представители новых таксонов, обитающих только на этом континенте [4].

Эволюционные адаптации, обеспечивающие высокую выживаемость микроорганизмов в экстремальных условиях, являются объектом внимания исследователей, в том числе для использования адаптаций в практических целях. В экстремальных условиях Антарктики микроорганизмы занимают экологическую нишу в микротрещинах массивно-кристаллических пород (эндолитные сообщества) или под каменными мостовыми (гиполитные сообщества) [2]. Такие сообщества защищены от ветра и ультрафиолетового излучения, сложны по структуре и могут включать лишайники, грибы, водоросли, археобактерии и эубактерии [3].

Объектами исследования выступали микроорганизмы четырёх образцов почв, любезно предоставленных к.б.н., доцентом Мяминым Владиславом Евгеньевичем: почва №1 (ВВ61-032-2) – образец гиполитов Восточной Антарктиды, станция Молодёжная (сборщик Долгих А.В, 2016 г.); почва №2 (ВВ61-050-2) – образец эндолитов Восточной Антарктиды, станция Молодёжная (сборщик Долгих А.В, 2016 г.); почва №3 (СL-01-П1) – образец гиполитов Восточной Антарктиды, земля Мак-Робертсона, горы Принс-Чарльз (сборщик Андреев М.В., 2016 г.); почва №4 (ОВОС 2015-15) – образец гиполитов Восточной Антарктиды, полевая база "Гора Вечерняя" (сборщик Мямин В.Е., 2015 г.).

Целью работы являлось выделение изолятов эндолитных и гиполитных бактерий из образцов почв Восточной Антарктиды, изучение морфологических свойств клеток и влияния температуры культивирования на рост выделенных изолятов.

Для приготовления почвенных болтушек в стерильных условиях в колбу объемом 50 мл добавляли навеску исследуемой почвы весом 1 г и 5 мл физиологического раствора. Колбы инкубировали при 160 об/мин в хладотермостате при температуре 18 °С в течение 4 часов. При выделении чистых культур бактерий наряду со стандартной полноценной питательной средой, представленной рыбным агаром, использовали рыбный агар, приготовленный из рыбного бульона, разведенного дистиллированной водой в 2, 4 и 8 раз, а также минимальную глюкозо-солевую среду в целях выделения олиготрофов и определения оптимального состава питательной среды для культивирования антарктических микроорганизмов. Для ингибирования роста грибов в питательную среду добавляли антибиотик нистатин в конечной концентрации 500 мкг/мл. После посева бактерий методом Дригальского чашки Петри инкубировали в хладотермостате при температуре 18 °С в течение 2–8 дней до появления изолированных колоний, которые затем рассеивали на поверхность питательной среды в чашке Петри методом истощающего штриха для получения чистых культур.

В результате выявили, что подавляющее большинство бактериальных изолятов образовали колонии на стандартном по составу рыбном агаре, и гораздо меньше колоний зафиксировали на более бедных питательных средах. Для дальнейших исследований все выделенные изоляты культивировали на полноценном рыбном агаре, на котором они образовывали наибольшую биомассу. В результате проведенной работы выделены 45 изолятов: 8 – из почвы №1, 3 – из почвы №2, 24 – из почвы №3 и 10 – из почвы №4. Таким образом, выделены 42 бактериальных изолята гиполитов и 3 – эндолитов. Каждый изолят обозначили порядковым номером с учетом номера образца почвы. Например, номером 1.3 обозначен третий изолят, выделенный из почвы №1.

После получения чистых культур бактерий стандартными методами окрашивания клеток с использованием световой и фазово-контрастной микроскопии определяли форму клеток, их взаимное расположение, грампринадлежность, кислотоустойчивость, подвижность, образование капсул и эндоспор.

При исследовании морфологии клеток изолятов гиполитов под номерами 4.1, 4.8, 4.9 и 4.10, выделенных соответственно из почвы №4, выявили, что они грамположительные, неподвижные и образовывали гифы. На основе этих свойств данные изоляты предположительно отнесли к группе актинобактерий. Кроме того, в результате культивирования этих изолятов на овсяном агаре, оптимальном для выращивания актинобактерий, зафиксировали образование ими воздушного мицелия наряду с субстратным. Таким образом, в гиполитном сообществе микроорганизмов, выделенных из почвы №4, установлено наличие актинобактерий, которые в дальнейших исследованиях не участвовали. Кроме того изолят 3.21 оказался не жизнеспособным в процессе субкультивирования.

Среди остальных 37 изолятов гиполитных сообществ (образцы почв №1, №3, №4) преобладали подвижные (67,6 %) клетки палочковидной формы (86,5 %), при этом среди них примерно в равной степени встречались грамположительные (51,4 %) и грамотрицательные (48,6 %), образующие капсулу (51,4 %) и не образующие её (48,6 %). Что касается 3 изолятов эндолитов (образец почв №2), то все они являлись грамположительными и не образующими капсул, но среди них преобладали неподвижные (66,7 %) клетки кокковидной формы (66,7 %). Кислотоустойчивых и эндоспорообразующих бактерий среди изолятов исследуемых сообществ не обнаружено.

Далее определяли температурный диапазон и оптимум роста выделенных микроорганизмов, культивируя их при температуре 4 °С в течение 7 суток, при 10 °С и 18 °С – в течение 5 суток, при 28 °С, 37 °С и 42 °С – в течение 2 суток. Оценивали интенсивность роста изолятов баллами [4], а температурный оптимум определяли по максимальным баллам, отличающимся не больше, чем на одну единицу (табл. 1). Результаты исследования представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Температурный диапазон и оптимум роста бактерий, выделенных из почв Восточной Антарктиды.

№ изолята	Температура культивирования / балл						Температурный оптимум роста, °С
	4 °С	10 °С	18 °С	28 °С	37 °С	42 °С	
1.1	3	8	8	9	9	0	10–37
1.2	2	6	7	6	3	0	10–28
1.3	6	7	7	8	7	0	10–37
1.4	8	9	9	9	8	0	4–37
1.5	5	7	8	8	8	6	10–37
1.6	3	5	6	6	7	0	18–37
1.7	7	9	9	8	8	0	10–37
1.8	4	7	7	8	8	0	10–37
2.1	3	5	6	5	0	0	10–28
2.2	1	2	8	8	9	9	18–42
2.3	4	7	8	8	3	0	10–28
3.1	6	9	9	9	8	0	10–37
3.2	2	5	6	5	2	0	10–28
3.3	8	8	9	9	8	0	4–37
3.4	8	9	9	8	7	0	4–28
3.5	4	6	6	6	6	0	10–37
3.6	0	7	7	8	8	0	10–37
3.7	5	6	7	7	7	0	10–37
3.8	5	6	8	8	8	0	18–37
3.9	5	8	8	9	6	0	10–28
3.10	4	5	6	6	5	0	10–37
3.11	4	5	6	7	7	3	18–37
3.12	5	6	8	8	8	0	18–37

3.13	5	8	9	9	7	0	10–28
3.14	6	6	6	6	0	0	4–28
3.15	4	6	6	6	6	0	10–37
3.16	5	6	6	7	6	0	10–37
3.17	7	9	9	10	9	0	10–37
3.18	9	9	9	10	9	0	4–37
3.19	5	6	6	7	7	0	10–37
3.20	5	6	6	7	7	0	10–37
3.22	7	8	9	9	9	0	10–37
3.23	6	6	6	6	7	0	4–37
3.24	8	8	9	9	6	0	4–28
4.2	5	5	6	4	2	0	4–18
4.3	7	9	9	9	7	0	10–28
4.4	2	2	2	1	1	0	4–28
4.5	3	5	5	3	0	0	10–18
4.6	3	5	7	7	8	8	18–42
4.7	3	6	6	3	0	0	10–18

Примечание: «0» – отсутствие роста колоний; «1» – слабый рост колоний в начале первого штриха; «2» – рост колоний до середины первого штриха; «3» – слабый рост первого штриха; «4» – уверенный рост первого штриха; «5» – слабый рост с образованием мелких колоний диаметром 0,5–1,0 мм; «6» – уверенный рост с образованием мелких колоний диаметром 0,5–1,0 мм; «7» – слабый рост с образованием колоний диаметром 1,0–2,0 мм; «8» – уверенный рост с образованием колоний диаметром 1,0–2,0 мм; «9» – уверенный рост с образованием колоний диаметром 2,5 мм и более; «10» – обильный, плотный рост с образованием колоний диаметром 2,5 мм и более. Жирным шрифтом выделены максимальные баллы.

Большинство анализируемых бактериальных культур (80%) с разной степенью интенсивности росли в широком диапазоне температур от 4 °С до 37 °С, но только 4 изолята (1.5; 2.2; 3.11; 4.6) росли в диапазоне температур от 4 °С до 42 °С. Для 16 культур температурный оптимум роста составил 10–37 °С, семи – 10–28 °С, четырех – 18–37 °С, 4–28 °С, 4–37 °С, двух (2.2; 4.6) – 18–42 °С. Только для нескольких анализируемых изолятов оптимальная температура роста составила 4–18 °С (4.2) и 10–18 °С (4.5; 4.7). Исходя из полученных данных область толерантности (крайние границы изменения фактора, которые организм может еще перенести) изучаемых изолятов достаточно широкая, в связи с чем их можно отнести к эврибионтам [5].

Литература

1. Короткевич, Е. Полярные пустыни. Арктический и Антарктический научно-исследовательский институт / Е. Короткевич. – Ленинград: Гидрометеоздат, 1972. – 96 с.
2. Мергелов, Н.С. Почвоподобные эндолитные и гиполитные системы: от макро- до субмикростроения / Н.С. Мергелов // Всероссийская конференция с

международным участием и школа молодых ученых «Морфология почв: от макро- до субмикроразнообразия», 3–5 октября 2016 г. – Москва, 2016. – С.134–145.

3. Мямин, В. Некоторые характеристики микробиальных эндолитных и гиполитных сообществ участка Вечерний оазиса Холмы Тала (Восточная Антарктида) / В.Е. Мямин, А.В. Долгих, Л.В. Никитина // Мониторинг состояния природной среды Антарктики и обеспечение деятельности национальных экспедиций: сб. науч. трудов. – Минск, 2014. – С. 186–192.

4. Тригубович, А.М. Выделение и физиолого-биохимическая характеристика бактерий – контаминантов антропогенных материалов из антарктических местообитаний / А.М. Тригубович [и др.] // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты. – 2018. – Т. 10. – С. 158–171.

5. Экология микроорганизмов: Учеб. для студ. вузов / А.И. Нетрусов, Е.А. Бонч-Осмоловская, В.М. Горленко и др.; Под ред. А.И. Нетрусова. – М.: Издательский центр «Академия», – 2004. – 272 с.