# БИОЛОГИЯ

## Микробиология и ботаника

УДК 57.083.18
DOI: 10.18101/2587-7143-2018-2-3-9

**ИДЕНТИФИКАЦИЯ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ ОРГАНОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ ПРИБРЕЖНО-СОРОВОЙ ЗОНЫ ОЗЕРА БАЙКАЛ**

**О. П. Дагурова, В. П. Гаранкина, Н. Л. Белькова**

**© Дагурова Ольга Павловна**
кандидат биологических наук, старший научный сотрудник,
Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН
670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6
E-mail: dagur-ol@mail.ru

**© Гаранкина Валентина Петровна**
кандидат биологических наук, ведущий инженер,
Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН
670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6
E-mail: G_val_82@mail.ru

**© Белькова Наталья Леонидовна**
кандидат биологических наук, доцент, старший научный сотрудник,
Лимнологический институт СО РАН
664033, г. Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3
E-mail: nlbelkova@gmail.com

Из воды прибережно-соровой зоны озера Байкал было выделено и идентифицировано 8 чистых культур органотрофных бактерий. Исследуемые штаммы отнесены к родам *Brevibacterium* (4 штамма), *Pseudomonas* (2 штамма), *Aeromicrobium* (1 штамм) и *Agrococcus* (1 штамм). Культуры обладали способностью использовать широкий спектр органических субстратов.
***Ключевые слова:*** органотрофные бактерии; идентификация; озеро Байкал; мелководная зона.

Олиготрофное озеро Байкал — одно из величайших пресных озер мира, характеризующееся разнообразием биотопов. Прибрежно-соровая зона озера Байкал включает мелководные заливы озера Байкал (соры). Мелководье соров отличается хорошей прогреваемостью в летний период и высокой продуктивностью (Кулагин, Помазкина, 1977). Одним из существенных компонентов биоты озер являются микроорганизмы, играющие важную роль в круговороте веществ и энергии. Деятельность микроорганизмов обеспечивает высокое качество байкальской воды, главным образом отвечая за процесс деструкции органического вещества, осуществляемый органотрофными бактериями. В водной экосистеме

прибрежно-соровой зоны органотрофные бактерии являются важным компонентом круговорота органических веществ, участвуя в процессах деструкции и минерализации органических соединений Органотрофные культивируемые бактерии озера Байкал изучались ранее — было определено видовое разнообразие и описаны факторы, влияющие на состав сообщества (Парфенова и др., 2006; Белых и др., 2013; Галачьянц и др., 2016). Органотрофные бактерии прибрежно-соровой зоны озера Байкал не изучались.

**Объекты и методы.** Пробы были отобраны в прибрежно-соровой зоне озера Байкал — мелководных заливах Провал, Посольский Сор и Истоминский Сор, а также участках открытого Байкала Боярск и Энхалук, расположенных вблизи заливов. Мелководные заливы Провал, Посольский Сор и Сор Черкалов находятся в придельтовом пространстве крупнейшего притока озера Байкал — реки Селенга. Отбор проб воды проводили с помощью батометра и переливали в стерильную посуду. Из воды изолировали в чистую культуру численно доминировавшие при посеве на твердую питательную среду РПА:10 (рыбо-пептонный агар, разведенный в 10 раз) колонии. Посевы культивировали аэробно в течение 2 суток при комнатной температуре. Для идентификации было отобрано 8 чистых культур органотрофных бактерий. Чистоту культур контролировали визуально и микроскопически. Морфологию бактерий изучали с помощью живых и окрашенных препаратов на микроскопе Axiostar Plus («ZEISS», Германия). Способность культур использовать ряд углеводов, спиртов и других органических соединений определяли на среде Пфеннига с добавлением 0,5-1% субстрата.

Для выделения ДНК биомассу, полученную из колонии культуры, суспендировали в безбактериальной воде и проводили выделение ДНК методом ферментативного лизиса (Белькова, Андреева, 2009). Секвенирование было произведено в ЦКП «Геномика» (Новосибирск). После секвенирования последовательности проверяли и корректировали с помощью программы Bioedit, поиск химерных структур вели с помощью пакета программ Pintail, сравнительный анализ — с помощью пакета программ FASTA (http://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/fasta/). Для выравнивания набора последовательностей использовали программу ClustalW, далее выровненные последовательности использовали для построения филогенетического древа в программе MEGA ver.5.01.

**Результаты и обсуждение.** Морфологическое описание колоний и клеток культур представлено в табл. 1. Культуры были преимущественно представлены грамположительными палочками и кокками. Грамотрицательные бактерии были представлены палочками: короткими или длинными тонкими.

Таблица 1

Морфологическое описание выделенных чистых культур органотрофных бактерий

| № | Название культуры | Описание колоний на твердой среде | d, мм | Форма клеток, размеры, окраска по Граму |
|---|---|---|---|---|
| 1 | LBPr5 | Кремовая, форма округлая, поверхность гладкая, профиль кратерообразный | 3 | Палочки 1,17х0,50мкм, Гр- |
| 2 | LBPr6 | Кремовая, форма округлая, поверхность гладкая, профиль каплевидный | 2 | Палочки 1,53х0,45мкм, Гр+ |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 3 | LBPr24 | Кремовая, форма округлая, поверхность гладкая, профиль кратерообразный | 4 | Палочки 1,44х0,69мкм, Гр+ |
| 4 | LBPr25 | Кремовая, форма округлая, поверхность гладкая, профиль кратерообразный | 4 | Палочки 2,10х0,80мкм, Гр+ |
| 5 | LBPS2 | Бесцветная, форма округлая, поверхность гладкая, профиль плоский, с фестончатым краем | 5 | Палочки 0,80х0,88мкм, Гр- |
| 6 | LBIst | Оранжевая, форма округлая, поверхность гладкая, профиль конусовидный, с фестончатым краем | 4 | Палочки 0,89х0,45мкм, Гр+ |
| 7 | LBB2 | Желтая, форма округлая, поверхность гладкая, профиль кратерообразный | 4 | Кокки 0,71мкм, Гр+ |
| 8 | LBChiv 2 | Кремовая, форма округлая, поверхность гладкая, профиль каплевидный | 2 | Палочки 1,69х0,54мкм, Гр+ |

Была проведена идентификация культур по анализу гена 16S рРНК. Полученные нуклеотидные последовательности зарегистрированы в международном банке данных, проведен их сравнительный (табл. 2) и филогенетический анализ (рис. 1).

Таблица 2

Результаты сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей чистых культур органотрофных бактерий

| № (п.н.) | Номер в банке данных | Ближайший родственник, гомология | Филум/класс, семейство |
|---|---|---|---|
| LBPr5 (886) | HE617668 | *Pseudomonas fluorescens,* 95% | Gammaproteobacteria, Pseudomonadaceae |
| LBPr6 (1443) | HE617669 | *Brevibacterium casei*, 99% | Actinobacteria, Brevibacteriaceae |
| LBPr24 (1090) | HE617663 | *Brevibacterium* sp., 97% | Actinobacteria, Brevibacteriaceae |
| LBPr25 (1447) | HE617664 | *Brevibacterium* sp., 99% | Actinobacteria, Brevibacteriaceae |
| LBPS2 (1451) | HE617670 | *Pseudomonas fluorescens*, 98% | Gammaproteobacteria, Pseudomonadaceae |
| LBIst (1434) | HE617667 | *Aeromicrobium* sp., 96% | Actinobacteria, Nocardioidaceae |
| LBB2 (1423) | HE617665 | *Agrococcus* sp., 99% | Actinobacteria, Microbacteriaceae |
| LBChiv 2 (1441) | HE617666 | *Brevibacterium sp., 99%* | Actinobacteria, Brevibacteriaceae |

Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей с ближайшими гомологами показал, что они являются представителями классов Actinobacteria и Gammaproteobacteria, относящимся к широко распространенным группам. Следует отметить, что представители этих классов доминируют в некультивируемом микробном сообществе озера Байкал по данным пиросеквенирования (Разнообразие …, 2016). Исследуемые штаммы могут быть отнесены к родам Brevibacterium (4 штамма), Pseudomonas (2 штамма), Aeromicrobium (1 штамм) и Agrococcus (1 штамм).

Грамотрицательные штаммы LBPr5 и LBPS2 имеют среди ближайших родственников представителей вида *Pseudomonas fluorescens*. Следует отметить, что в настоящее время невозможно провести идентификацию псевдомонад только по фрагменту гена малой субъединицы РНК, для корректного анализа необходимо использовать дополнительно либо фрагмент 23S рРНК, либо межгенный спейсер, поэтому эти штаммы корректно отнести к роду Pseudomonas sp. Высокий процент гомологии с ближайшими родственниками актинобактерий и филогенетический анализ с типовыми штаммами соответствующих родов позволяет идентифицировать штаммы LBPr24, LBPr25, LBChiv2, LBPr6 как Brevibacterium casei.

Штамм LBB2 на основании филогенетического анализа попадает в один кластер с видами Agrococcus jenensis DSM 9580T (X92492) и Agrococcus citreus IAM 15145T (AB279547).

Однако высокий процент гомологии только с последовательностями неидентифицированных штаммов, невысокая бутстреп поддержка кластеризации и наличие только двух зарегистрированных последовательностей этих видов не позволяют идентифицировать этот штамм до вида. Другой штамм LBIst кластеризуется с видами Aeromicrobium flavum TYLN1T (EF133690) и Aeromicrobium tamlense SSW1-57T (DQ411541). Однако, несмотря на невысокий процент гомологии с последовательностями ближайших родственников, филогенетический анализ выявил достаточно высокий уровень бутстреп поддержки кластеризации с типовым штаммом Aeromicrobium flavum TYLN1T (EF133690), поэтому этот штамм может быть отнесен к виду Aeromicrobium flavum.

Чистые культуры LBPr6 (Brevibacterium casei, 99%), LBPr25 (Brevibacterium sp., 99%) были проверены на способность к росту на различных органических субстратах.

Было установлено, что культуры обладали способностью использовать широкий спектр субстратов (табл. 2). Культура LBPr6 Brevibacterium casei активно потребляла дульцит, пируват, лактат, а также пептон и триптон. Наименьший рост наблюдался на субстратах галактоза и лактоза и в группе спиртов на маннite и сорбите. Отмечено интенсивное потребление карбоновых кислот культурой LBPr25 Brevibacterium sp.; также хороший рост отмечен на пептоне, триптоне и дрожжевом экстракте, входящих в состав сред при культивировании бактерий. Слабый рост у изученных культур замечен на сорбите и желатине.

Таким образом, из воды прибрежно-соровой зоны озера Байкал было выделено 8 чистых культур органотрофных бактерий, относящихся к представителям широко распространенных родов *Brevibacterium, Pseudomonas*, *Aeromicrobium* и *Agrococcus*. Сравнивая с разнообразием культивируемых органотрофных бактерий в глубоководной зоне (Парфенова), литоральной зоне (Белых) и нейстоне (Галачьянц) озера Байкал, можно отметить, что представители рода *Pseudomonas*

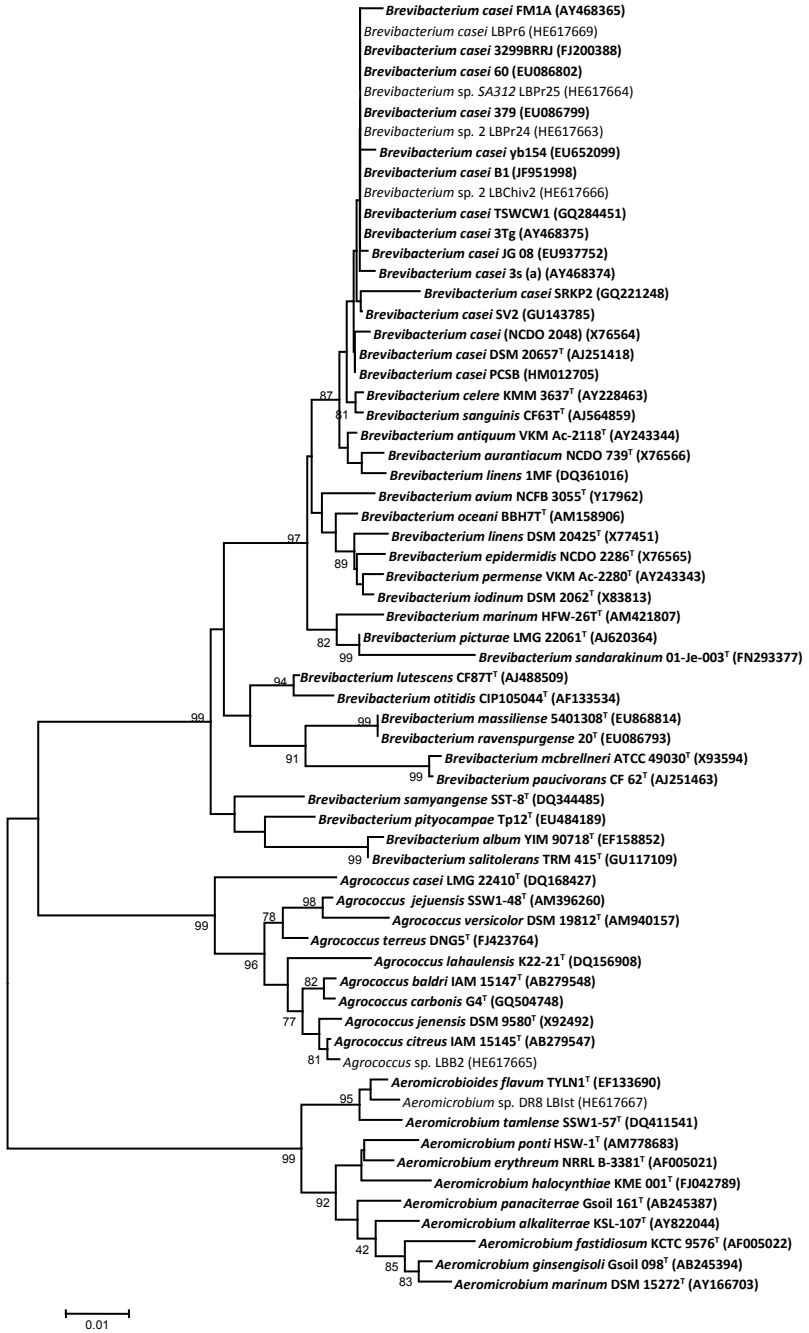


Рис. 1. Положение чистых культур органотрофных бактерий LBPr24, LBPr25, LBB2, LBChiv2, LBIst, LBPr6 на филогенетическом древе. Для построения филогенетических взаимоотношений использованы полноразмерные последовательности гена 16S рибосомной РНК зарегистрированных в EMBL банке данных как типовые штаммы родов *Aeromicrobium, Agrococcus* и *Brevibacterium*. Древо построено методом объединения ближайших соседей, бутстреп анализ проведен для 1000 реплик. Масштаб соответствует 1 замене на 100 п. н.

были выделены из всех биотопов озера Байкал, виды рода *Brevibacterium* были выделены только из прибрежно-соровой зоны. Бревибактерии являются коринеформными бактериями, обычными представителями микрофлоры воды и почвы, способными к деструкции различных органических соединений, в том числе и трудноокисляемых. Две выделенные культуры рода *Brevibacterium* были способны использовать широкий спектр органических субстратов.

*Работа выполнена в рамках реализации базового проекта ФАНО «Микробные сообщества экстремальных природных систем: биологическое и функциональное разнообразие, биотехнологический потенциал» № АААА-А17-117011810034-9 и при поддержке гранта РФФИ № 18-44-030028.*

**Литература**

Белых М. П., Суханова Е. В., Белькова Н. Л. Особенности культивируемых гетеротрофных микроорганизмов литоральной зоны озера Байкал // Известия ИГУ. Сер. Биология. Экология. 2013. Т. 6. № 3. С. 20–26.

Белькова Н. Л., Андреева А. М. Молекулярно-генетические методы анализа микробных сообществ // Разнообразие микробных сообществ внутренних водоемов России: учеб.-метод. пособие. Ярославль: Принтхаус, 2009. С. 53–63.

Галачьянц А. Д., Белькова Н. Л., Суханова Е. В., Романовская В. А., Гладка Г. В., Бедошвили Е. Д., Парфенова В. В. Разнообразие и физиолого-биохимические свойства гетеротрофных бактерий, выделенных из нейстона озера Байкал // Микробиология. 2016. Т. 85. № 5. С. 568–579.

Кулагин А. С., Помазкина Т. В. Первичная продукция водоемов. Лимнология прибрежно-соровой зоны Байкала / под ред. Н. А. Флоренсова. Новосибирск: Наука, 1977. С. 148–156.

Парфенова В. В., Белькова Н. Л., Денисова Л. Я., Зайчиков Е. Ф., Максименко С. Ю., Захарова Ю. Р., Поддубняк Н. Ю., Моложавая О. А., Никулина И. Г. Изучение видового состава культивируемых гетеротрофных микроорганизмов оз. Байкал // Биология внутренних вод. 2006. № 1. С. 8–15.

Разнообразие микробного сообщества прибрежных осадков озера Байкал, определенное методом пиросеквенирования / О. П. Дагурова [и др.] // Вестник БГУ. Биология. География. 2016. Вып. 4. С. 33–38.

## IDENTIFICATION OF CULTIVATED ORGANOTROPHIC BACTERIA FROM THE LITTORAL ZONE OF LAKE BAIKAL

**O. P. Dagurova, V. P. Garankina, N. L. Bel'kova**

**Olga P. Dagurova**
PhD (Bio), Institute of General and Experimental Biology SB RAS
6, Sakhyanovoy St., Ulan-Ude, 670047, Russia
E-mail: dagur-ol@mail.ru

**Valentina P. Garankina**
PhD (Bio), Institute of General and Experimental Biology SB RAS
6, Sakhyanovoy St., Ulan-Ude, 670047, Russia
E-mail: G_val_82@mail.ru

**Natalia L. Bel'kova**
PhD (Bio), assistant professor, Limnological Institute SB RAS
3, Ulan-Batorskaya St., Irkutsk, 664033
E-mail: nlbelkova@gmail.com

The pure cultures of organotrophic bacteria (8 strains) were isolated from the water of the coastal zone of Lake Baikal and identified. The strains are related to the genera *Brevibacterium* (4 strains), *Pseudomonas* (2 strains), *Aeromicrobium* (1 strain) and *Agrococcus* (1 strain). Cultures are able to use a wide range of organic substrates.
***Keywords:*** organotrophic bacteria; identification; Lake Baikal; shallow water zone.