

ИЗОЛЯЦИЯ АБОРИГЕННЫХ МЕТИЛОТРОФНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ ИЗ АРКТИЧЕСКИХ ПОЧВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА ICHIP¹

ISOLATION OF NATIVE MICROORGANISMS FROM ARCTIC SOILS USING THE ICHIP METHOD

V. Kadutskii
A. Detsura
S. Evgrafova
A. Shatalov
E. Sideleva

Summary: The problem of uncultivated forms of microorganisms has existed for a long time and is a challenge for modern microbiology, despite significant advances in molecular biology and understanding of many complex biochemical processes.

Modern biotechnology is in dire need of identifying and obtaining new highly effective strains of bacteria and archaea capable of producing such useful substances as antibiotics, biodegradable polymers, polyunsaturated fatty acids, psychrotolerant enzymes; Another important task of biotechnology is the use of strains of microorganisms in the bioremediation of polluted environmental objects with various pollutants. Researchers using non-standard methods and cultivation parameters, which are sometimes quite complex, manage to obtain a pure viable culture of any microorganism.

It is widely known that microorganisms with unique biochemical characteristics, enzymes, proteins and other beneficial substances often live in extreme conditions, hydrothermal vents, frozen soils and heavily polluted environmental objects. Such microorganisms often require special substrates and growth factors. In this work, we used the method of isolation chips (iChip) to isolate methylotrophic strains from the soils of the permafrost ecosystem, Meduza Bay, near the village of Dikson, Krasnoyarsk Territory. And compared this method with the classical approach. The obtained strains of methylotrophic bacteria were identified by analyzing the primary structure of the 16s rRNA gene. A total of 8 strains were isolated. The morphology of cells and colonies of the obtained cultures was studied, species identification was carried out using the obtained sequences during sequencing of the 16s rRNA gene.

Keywords: Arctic, methylotrophic microorganisms, arctic soils, methanol, isolation chip.

Кадуцкий Валерий Каранетович

Младший научный сотрудник,
Институт леса им. В.Н. Сукачева ФИЦ КНЦ СО РАН,
г. Красноярск;
Сахалинский государственный университет,
г. Южно-Сахалинск
kvkarr@yandex.ru

Децура Анна Евгеньевна

Инженер, Институт леса им. В.Н. Сукачева
ФИЦ КНЦ СО РАН, г. Красноярск
annadetsura@gmail.com

Евграфова Светлана Юрьевна

Кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник, доцент,
Институт леса им. В.Н. Сукачева ФИЦ КНЦ СО РАН,
г. Красноярск;
Сахалинский государственный университет,
г. Южно-Сахалинск
esj@yandex.ru

Шаталов Александр

Сибирский федеральный университет, г. Красноярск
qqhiroehal@yandex.ru

Сиделева Елизавета Викторовна

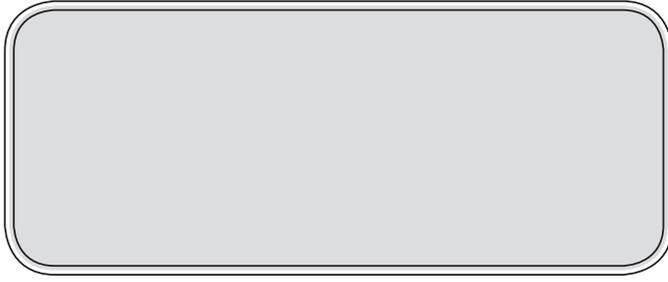
Сибирский федеральный университет, г. Красноярск
ms.cd.eva@mail.ru

Аннотация. Проблема некультивируемых форм микроорганизмов существует давно и является вызовом для современной микробиологии, не смотря на значительные достижения в области молекулярной биологии и понимание многих сложных биохимических процессов.

Современная биотехнология остро нуждается в выявлении и получении новых высокоэффективных штаммов бактерий и архей, способных к продуцированию таких полезных веществ как антибиотики, биоразлагаемые полимеры, полиненасыщенные жирные кислоты, психротолерантные ферменты; так же как важной задачей биотехнологии является использование штаммов микроорганизмов при биоремедиации загрязнённых объектов окружающей среды различными поллютантами. Исследователям, применяющим нестандартные методы и параметры культивирования, которые порой являющиеся весьма сложными, удаётся получить чистую жизнеспособную культуру какого-либо микроорганизма.

Широко известно, что микроорганизмы, обладающие уникальными биохимическими особенностями, ферментами, белками и другими полезными веществами, часто обитают в экстремальных условиях, гидротермах, мерзлотных почвах и сильно загрязнённых объектах окружающей среды. Такие микроорганизмы часто нуждаются в особых субстратах и факторах роста. В данной работе мы использовали методику изоляционных чипов (iChip), для изоляции метилотрофных штаммов из почв мерзлотной экосистемы, бухты Медуза, окрестности посёлка Диксон, Красноярский край. И сравни-

¹ Работа выполнена при поддержке «Красноярский краевой фонд поддержки научной и научно-технической деятельности» (проект № 2022110108995).



Введение

По разным оценкам около 1 % микроорганизмов являются культивируемыми, большая же часть архей и бактерий до сих пор являются неизученными, в силу того, что их невозможно культивировать в лабораторных условиях. Среди таких некультивируемых микроорганизмов могут встречаться представители, имеющие потенциал в использовании в биотехнологической промышленности, медицине, биоремедиации загрязненных почв благодаря особенностям их биохимических процессов и продуцируемым веществам [5,6].

Обнаружение и характеристика микробных сообществ, обитающих в определённом месте обитания, является сложной задачей. Это вызвано сложностями при использовании обычных методов культивирования, большинство применяемых синтетических и натуральных сред являются специфичными для определённых групп микроорганизмов, так, например, быстрый рост одних бактерий на более подходящей для них среде препятствует росту других, характеризующихся более медленным ростом на данной среде, и чувствительностью к метаболитам других микроорганизмов, выделяющихся во внешнюю среду [1, 2].

Однако не смотря на требовательность к составу среды, некультивируемые формы микроорганизмов играют огромную роль в составе микробных сообществ, при взаимодействии с доминирующими микроорганизмами в среде они могут усиливать утилизацию основного субстрата [3].

Поиск новых подходов для культивирования некультивируемых микроорганизмов является центральной фундаментальной задачей современной классической микробиологии. Для достижения результатов используются разные методы, добавление восстановителей, использование воды при приготовлении сред, отобранной из мест обитания целевых бактерий, добавление особых ростовых факторов, культивирование одиночных клеток, моделирование газовой среды и увеличение время культивирования [4].

D. Nichols и соавторы [4] в своей работе продемонстрировали новую методику по культивации некуль-

ли данный метод с классическим подходом. Полученные штаммы метилотрофных бактерий были идентифицированы посредством анализа первичной структуры гена 16s рРНК. Всего было изолировано 8 штаммов. Была исследована морфология клеток и колоний полученных культур, проведена видовая идентификация с помощью полученных последовательностей при секвенировании гена 16s рРНК.

Ключевые слова: Арктика, метилотрофные микроорганизмы, арктические почвы, метанол, изоляционный чип.

тивируемых микроорганизмов, которая основывается на использовании изоляционного чипа (iChip), данная методика позволяет проводить культивирование единичных клеток, сам процесс культивирования осуществляется на границе двух сред — искусственной агаризованной среды специфичного состава, необходимой для роста требуемых бактерий, и естественной среды откуда выделяются микроорганизмы, это могут быть почва, вода и другие объекты, процесс культивирования может приводиться как в лабораторных условиях так и *in situ*. При культивировании каждая клетка находится отдельно в одной из пор планки iChip, где она закрыта от внешней среды мембранным фильтром, величина пор которого позволяет проникать в обоих направлениях метаболитам, веществам и уникальным факторам необходимым для роста микроорганизма, однако препятствует миграции клеток как наружу, так и во внутрь iChip [4].

В данной работе мы использовали методику iChip и сравнили её с классической методикой постановки накопительных сред и высевом на плотную питательную среду, для изоляции аборигенных метилотрофных бактерий из почв севера Красноярского края, Диксон.

Методы

Регион исследования. Образцы почвы были отобраны в биотопе резервации большого арктического заповедника, бухта Медуза, в 30 км от посёлка Диксон, Красноярского края. Со средней температурой июля 6 °С, января –28 °С. Биотоп является каменисто-осоковой тундрой, в меру уваженной, расположен на возвышенности, имеются выходы базальта с находящимся рядом обломочным материалом различной размерности. Мощность растительного покрова составляет 3–4 см, доминантными в растительном покрове являются представители рода *Carex*, среди которых произрастают немногочисленные злаки, мхи и лишайники. Мощность сезонно талого слоя составила 40 см.

Почвенный профиль представлял из себя:

Горизонт торфа 2–4 см; глеевый горизонт 10–18,20 см, без ровной границы перехода как с нижнего, так и верхнего горизонта, горизонт не имеет чёткой структуры,

разрывы, следы криотурбации; темно коричневый (глинистый) горизонт 20–50 см. Во всех горизонтах присутствуют литоморфы разного размера, преимущественно от 0,5 мм до 2–3 см.

Образцы почвы отбились с глубины 20 см стерильным пробоотборником в стерильные контейнеры, и в замороженном виде транспортировались в институт леса им. В.Н. Сукачева СО РАН, г. Красноярск.

Приготовление накопительных культур и изоляция мителотрофных штаммов

В качестве накопительной среды использовалась среда Гальченко [14], состава: (г/л) KH_2PO_4 — 2, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 2, NaCl — 0,5, $\text{MgSO}_4 \cdot 0,7\text{H}_2\text{O}$ — 0,025, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,002, вода дистиллированная

Среду разливали по 200 мл в колбы Эрленмейера (500 мл) и стерилизовали при 1 атм. 1 ч. После стерилизации в колбы в асептических условиях вносился метанол (0,5 % об. /об.).

После чего в колбы в асептических условиях помещались навески почвы весом 10 грамм.

Колбы инкубировались при 29°C на роторной качалке (180 об/мин), в течение 14 дней.

Полученная культуральная жидкость высевалась методом истощающего посева на чашки Петри на плотную питательную среду, основой которой являлась агаризованная среда К с добавлением метанола. Чашки инкубировались при температуре 29°C в течение 2–3 дней.

Закладка iChip и изоляция мителотрофных штаммов

Изоляционный чип представляет из себя 3 прямоугольные пластинки 80*20*5 мм, выполненные из ABS пластика с множественной перфорацией, между собой пластинки соединяются с помощью 6 болтов.

В качестве мембранного фильтра выполняющего функцию барьера между центральной пластинкой и внешней средой использовались мембранные фильтры изготовленные из полиэтилентерефталата, с размером пор 0,4 мкм.

Пластинки и фильтры перед началом работы были подвергнуты стерилизации методом автоклавирования при 121 °C в течение 15 минут.

Для приготовления iChip готовилась почвенная суспензия с отобранными образцами почвы: в 10 г навески почвы вносилось 100 мл стерилизованной водопро-

водной воды, суспензия подвергалась встряхиванию на роторной качалке в течение часа, после чего 10 мл суспензии вносилось в агаризованную среду Гальченко в расплавленном виде, температурой не выше 40°C, содержащую метанол (0,5 % об. /об.)

Далее расплавленная агаризованная среда, смешанная с почвенной суспензией, заполнялась в перфорацию одной из пластинок, после окончательного застывания пластинка, с заполненными агаризованной средой порами, покрывалась мембранными фильтрами, которые в свою очередь прижимались остальными двумя пластинками с обеих сторон, и фиксировались вместе болтами.

Собранный изоляционный чип помещался в почву, из которой была приготовленная исходная почвенная суспензия, далее почва увлажнялась водопроводной водой и помещалась в холодильник при 10 °C в течение шести недель.

По прошествии установленного времени изоляционные чипы изымались из почвы, подвергались очистке от следов почвы с помощью промывания в водопроводной воде. Далее в асептических условиях изоляционные чипы разбирались, осторожно удалялись боковые пластинки и мембранные фильтры, фрагменты плотной агаризованной среды из пор переносились с помощью бактериальной иглы на чашки Петри с агаризованной средой Гальченко с метанолом. Чашки инкубировались при 20 °C, в течение 7 дней.

Исследование первичной структуры гена 16S рРНК

Видовая принадлежность выделенных штаммов проводилась в ЦКП «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» ФГБНУ ВНИИСХМ» методом исследования первичной структуры участка гена 16S прокариот методом Сэнгера.

Результаты

Было выделено и идентифицировано 8 штаммов, 3 из которых изолированы из накопительных культур, остальные 5 получены с помощью применения изоляционного чипа.

В таблице 1 даны характеристики морфологии клеток и колоний, приведены ближайшие гомологи изолированных штаммов, определённых на основании полученных последовательностей 16S рРНК и их анализа с использованием базы данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

Характеристика изолированных штаммов

Штамм	Характеристика	Ближайшей гомолог в базе данных NCBI	Степень гомологии	Метод выделения штамма
1	Колонии круглые, края ровные, размер 1–2 мм, цвет кремовый, колонии выступают над средой. Клетки короткие палочки, одиночные и группы, неподвижные. Без спор. Грам положительные. Обладает хорошим ростом на МПА и минеральной среде с метанолом.	<i>Frigoribacterium sp.</i>	92,47 %	iChip
2	Колонии круглые, края ровные, размер 2–3 мм, цвет кремовый, колонии выступают над средой. Клетки бобовидные палочки, одиночные и группы, неподвижные. Грам положительные. Без спор. Обладают хорошим ростом на МПА и минеральной среде с метанолом.	<i>Pseudomonas palleroniana strain SC15</i>	92 %	iChip
3	Колонии круглые, края ровные, размер 2–3 мм, цвет белый матовый, колонии выступают над средой. Клетки короткие палочки, одиночные и группы, неподвижные. Без спор. Грам отрицательные. Обладают хорошим ростом на МПА и минеральной среде с метанолом.	<i>Pseudomonas tolaasii strain A-W5-5</i>	95 %	Накопительная культура
4	Колонии круглые, края ровные, размер 2–5 мм, цвет красный, колонии выступают над средой. Клетки палочковидные, с утолщением на полюсах, одиночные и группы, подвижные. Грам отрицательные. Обладают хорошим ростом на МПА и минеральной среде с метанолом.	<i>Williamsia serinedens strain EV1</i>	88 %	iChip
5	Колонии круглые, края ровные, размер 2–3 мм, цвет кремовый, колонии выступают над средой. Клетки палочковидные, одиночные и группы, неподвижные. Грам отрицательные. Без спор. Обладают хорошим ростом на МПА и минеральной среде с метанолом.	<i>Pseudomonas simiae strain B2-P3</i>	99 %	iChip
6	Колонии круглые, края ровные, размер 2–3 мм, цвет желтый, колонии выступают над средой, склонны к слиянию. Клетки палочковидные, одиночные и группы, неподвижные. Без спор. Грам отрицательные. Обладают хорошим ростом на МПА и минеральной среде с метанолом.	<i>Pseudomonas sp.</i>	99 %	iChip
7	Колонии круглые, края ровные, размер 3–4 мм, цвет кремовый, колонии выступают над средой. Клетки палочковидные, одиночные и группы, неподвижные. Без спор. Грам отрицательные. Обладают хорошим ростом на МПА и минеральной среде с метанолом.	<i>Pseudomonas sp. strain SWFU12</i>	97 %	Накопительная культура
8	Колонии круглые, края ровные, размер 2 мм, цвет кремовый, колонии выступают над средой. Клетки короткие палочки, одиночные и группы, неподвижные. Без спор. Грам положительные. Обладают хорошим ростом на МПА и минеральной среде с метанолом.	<i>Lacisediminihabitans sp</i>	95 %	Накопительная культура

Обсуждение

При использовании метода iChip были выделены 5 штаммов — *Frigoribacterium sp.*, *Pseudomonas palleroniana*, *Williamsia serinedens*, *Pseudomonas simiae*, *Pseudomonas sp.*, необходимо отметить, что некоторые штаммы имеют низкий процент гомологии со штаммами представленными в системе Genbank — это *Frigoribacterium sp.* с 92,47 % и *Pseudomonas palleroniana* с 92 %, что может говорить о том, что данные изоляты являются ранее неизвестными видами. При использовании классического подхода с получением накопительных культур было выделено всего 3 штамма — *Pseudomonas tolaasii*,

Pseudomonas sp., *Lacisediminihabitans s.* Меньшее количество выделенных штаммов с накопительных культур вероятно связано с недостатком определённых микроэлементов, которые по различным причинам отсутствуют в минеральной среде. При изоляции с помощью iChip было получено большее количество культур, благодаря возможности проникновения необходимых микроэлементов через мембрану изоляционного чипа.

Биотехнологический потенциал полученных штаммов

Представители рода *Frigoribacterium* ранее были описаны как одни из доминирующих бактерий, которые свя-

заны с усиленной деградацией нефтяных углеводов в антарктической почве [7,8]. Выделенный нами штамм нельзя с полной уверенностью отнести к данным представителем, однако присутствие данного рода бактерии в антарктических условиях может свидетельствовать о биохимических особенностях данного штамма, позволяющих существование в психрофильных условиях и использование различных производных нефти в качестве субстрата, что повышает биотехнологический интерес к данному штамму при устранении отрицательного влияния нефтедобывающей промышленности на окружающую среду северных широт.

Особенности биодеградации углеводов нефти бактериями родов *Pseudomonas* описаны в большом количестве исследований [прим. 9]. Выделенный в данной работе штамм *Pseudomonas palleroniana* является продуцентом полезных биотехнологических ферментов, стабильных в условиях низких температур и при широком диапазоне pH, что позволяет их применение в качестве агента биоремедиации в условиях пониженных температур [10]. Выделенный штамм *Pseudomonas simiae* может найти другое применение в биотехнологии — данный штамм благоприятно влияет на растения и повышает их засухоустойчивость [11]. Другой выделенный в работе штамм *Pseudomonas tolaasii* является продуцентом высоко биологически активных органических соединений,

обладающих фунгицидными свойствами, которые представляют интерес для работ по фумигации почвы [12].

Штамм *Williamsia serinedens* ранее уже был выделен из почв, загрязненных нефтью, поэтому наиболее вероятно, что данный штамм эффективен в процессе биоразложения промышленных и нефтяных отходов, попадающих в почву [13].

Описанные выше штаммы обладают полезными свойствами и несут повышенный интерес для дальнейшего изучения и применения в биотехнологических целях.

Заключение

Обобщая вышеизложенные результаты, можно говорить о том, что методика iChip имеет потенциал при поиске и выделении нативных микроорганизмов из объектов окружающей среды, значимых как в экологическом, так и биотехнологическом плане. Нельзя не отметить трудоёмкость применения метода iChip, время инкубации от 6 до 8 недель, а также повышенное внимание к соблюдению антисептики из-за разнообразных манипуляций при сборке изоляционного чипа. По мнению авторов, использование данной методики позволяет увеличить число выделенных штаммов, а также получить трудно культивируемые микроорганизмы, представляющие интерес как в классической микробиологии, так и в биотехнологии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Eilers H. et al. Culturability and in situ abundance of pelagic bacteria from the North Sea // *Applied and environmental microbiology*. — 2000. — Т. 66. — № 7. — С. 3044–3051.
2. Epstein S.S. The phenomenon of microbial uncultivability // *Current opinion in microbiology*. — 2013. — Т. 16. — №. 5. — С. 636–642.
3. Hu B. et al. Metabolic exchange with non-alkane-consuming *Pseudomonas stutzeri* SLG510A3-8 improves n-alkane biodegradation by the alkane degrader *Dietzia* sp. strain DQ12-45-1b // *Applied and Environmental Microbiology*. — 2020. — Т. 86. — №. 8. — С. e02931-19.
4. Nichols D. et al. Use of ichip for high-throughput in situ cultivation of “uncultivable” microbial species // *Applied and environmental microbiology*. — 2010. — Т. 76. — №. 8. — С. 2445–2450.
5. Rappé M.S., Giovannoni S. J. The uncultured microbial majority // *Annual Reviews in Microbiology*. — 2003. — Т. 57. — №. 1. — С. 369–394.
6. Staley J.T., Konopka A. Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats // *Annual review of microbiology*. — 1985. — Т. 39. — №. 1. — С. 321–346.
7. Saul D.J. et al. Hydrocarbon contamination changes the bacterial diversity of soil from around Scott Base, Antarctica // *FEMS Microbiology Ecology*. — 2005. — Т. 53. — №. 1. — С. 141–155.
8. Kauppi S., Sinkkonen A., Romantschuk M. Enhancing bioremediation of diesel-fuel-contaminated soil in a boreal climate: comparison of biostimulation and bioaugmentation // *International Biodeterioration & Biodegradation*. — 2011. — Т. 65. — №. 2. — С. 359–368.
9. Varjani S.J., Upasani V.N. Biodegradation of petroleum hydrocarbons by oleophilic strain of *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 5514 // *Bioresource technology*. — 2016. — Т. 222. — С. 195–201.
10. Jain R., Pandey N., Pandey A. Aggregation properties of cold-active lipase produced by a psychrotolerant strain of *Pseudomonas palleroniana* (GBPI_508) // *Biocatalysis and Biotransformation*. — 2020. — Т. 38. — №. 4. — С. 263–273.
11. Kumari S. et al. Induced drought tolerance through wild and mutant bacterial strain *Pseudomonas simiae* in mung bean (*Vigna radiata* L.) // *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. — 2016. — Т. 32. — С. 1–10.
12. Lo Cantore P., Giorgio A., Iacobellis N. S. Bioactivity of volatile organic compounds produced by *Pseudomonas tolaasii* // *Frontiers in microbiology*. — 2015. — Т. 6. — С. 1082.
13. Keikha M. *Williamsia* spp. are emerging opportunistic bacteria // *New microbes and new infections*. — 2018. — Т. 21. — С. 88.

© Кадуцкий Валерий Карапетович (kvkarr@yandex.ru); Децура Анна Евгеньевна (annadetsura@gmail.com); Евграфова Светлана Юрьевна (esj@yandex.ru); Шаталов Александр (qghipoehal@yandex.ru); Сиделева Елизавета Викторовна (ms.cd.eva@mail.ru).

Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»