Научное издание

Космические факторы эволюции биосферы и геосферы

Сборник статей

Ответственный редактор – В.Н. Обридко

Технический редактор Е.Л. Терёхина

Издательство ВВМ

190000, Санкт-Петербург, ул. Декабристов, д. 6, лит. А, пом. 10-н.

Подписано к печати 01.10.14 г. Бумага офсетная. Формат 60 x 84 $^{1}/_{16}$.

Печать цифровая. Уел. п. л. 13,48. Тираж 120 экз. Заказ 6100.

Отпечатано в отделе оперативной полиграфии Института химии СПбГУ.

198504, Санкт-Петербург, Старый Петергоф, Университетский пр. 26.

ОСОБЕННОСТИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЭКОСИСТЕМ В УСЛОВИЯХ АНТАРКТИДЫ

Якушев А.В.[1], Чурилин Н.[1], Соина В.С.[1], Воробьёва Е.А.[2], Мергелов Н.С.[3]

[1]*Факультет почвоведения, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия*
[2]*Институт космических исследований РАН, Москва, Россия*
[3]*Институт географии РАН, Москва, Россия*

Введение

Возможно, на древнем Марсе сформировалась биосфера. Почвы Антарктиды интересны для астробиологического моделирования условий раннего Марса, вследствие экстремальных условий формирования и существования экотопов. Солнечная радиация, холод, иссушение угнетают микроорганизмы. Для понимания функционирования подобных экосистем необходимо выяснить, способны ли бактерии выполнять биосферную функцию редуцентов – разложения биополимеров.

Цель исследования – изучение таксономического состава, физиологического разнообразия и физиологического состояния гидролитических бактерий, их экологической стратегии в примитивной антарктической почве.

Объекты и метод исследования

Объектами исследования были горизонты ранее не исследованной почвы влажной долины берегового оазиса Восточной Антарктиды «Холмы Ларсеманна», стерильно отобраны 55-ой Антарктической экспедицией в 2010 г. и хранились при –18°С. Исследовались: верхний горизонт **0–2 см** щебнистой «каменной мостовой (есть водоросли) нижележащий Торфянистый горизонт **2–4 см** с включениями мертвой биомассы и подстилающий его минеральный горизонт **4–10 см** – песок, с признаками мицелия грибов (рис. 1).

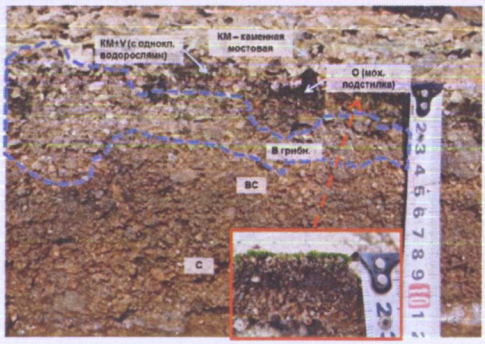

Рис. 1. Профиль исследуемой почвы.

Исследование проводилось комплексным структурно-функциональным методом характеристики микробных популяций [1–3]. Все процедуры проводились с соблюдением стерильности. Каждый раз при проведении анализа был предусмотрен контроль на стерильность. Схема проведения эксперимента представлена на рис. 2.

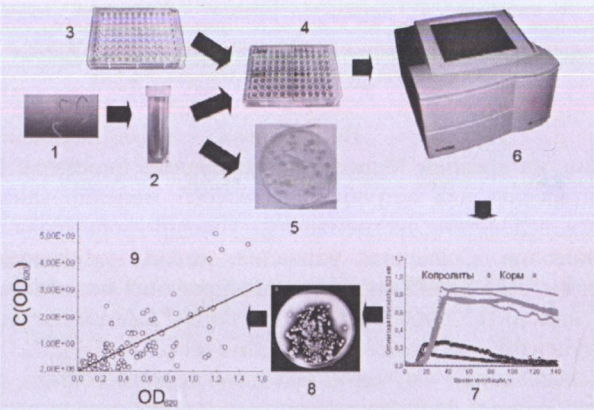

Рис. 2. Схема проведения исследования комплексным структурно-функциональным методом характеристики микробных популяций

Гомогенизация и десорбция микроорганизмов с твердых частиц проводилась в водной суспензии (1 : 1) в течение 20 мин при 2000 об./мин на встряхивателе “вортэкс” модель “Multi Reax” фирмы “Heidolph”. Рост грибов в суспензии подавляли, добавляя антибиотик нистатин 0.05%. Избыток частиц субстрата удаляли центрифугированием при 3200g 5 мин. Концентрацию и состав культивируемых микроорганизмов в исходном субстрате определяли высевом из супернатанта на агаризованную глюкозо-пептонно-дрожжевую среду общепринятым способом. Супернатант добавляли по 100 мкл в ячейки 96-луночной плоскодонной культуральной планшеты с крышкой, в которую уже внесен набор различных жидких питательных сред по 100 мкл. Подбор жидких сред обусловлен задачей исследования – полимеры: крахмал (запасном полисахариде глюкозы растений и зелёных водорослей), карбоксиметилцеллюлоза, хитин (аминополисахарид, входящий в состав клеточных стенок грибов и панцири членистоногих), пектин (метиловый эфир полигалактуроновой кислоты), выполняющий клеящую функцию в клеточных стенках растений), ксилан (самый распространённый полисахарид из группы гемицеллюлоз, входящих в состав наполнителя клеточной стенки растений, полимер ксилозы), декстран-500 (разветвлённый бактериальный полисахарид a-D-глюкопиранозы, входит в состав слизистых капсул микроорганизмов), твин-20 (водорастворимый аналог жиров), казеин (белок молока). Чтобы не принять за рост на органическом

веществе питательной среды рост за счет побочных веществ инокулируемой суспензии исследуемого образца, был предусмотрен контрольный вариант питательной среды без ростового субстрата. Питательные среды стерилизовались автоклавированием. Для предотвращения испарения воды из ячеек, планшет с боков закрывали лентой парафилм (parafilm). Планшет помещался в имуннoферментный анализатор "Sunrise" фирмы "Tecan", который автоматически регистрировал рост микроорганизмов по оптической плотности (длина света пропускания 405 нм) в динамике каждые 30 мин., с периодическим встряхиванием планшеты. Для поддержания температуры прибор помещался в комнату, где поддерживалась постоянная температура. Температура была выбрана стандартная [4] для почвенной микробиологии – 25°С. По окончании роста, который занял 215 ч., из ячеек был сделан высев на агаризованную глюкозо-пептонно-дрожжевую среду, чтобы выяснить таксономический состав возникших в ячейках ассоциаций на различных биополимерах. Идентификация микроорганизмов проводилась по культурально-морфологическим свойствам. По данным посева из ячеек строится калибровочное уравнение, позволяющее пересчитать оптическую плотность в концентрацию клеток микроорганизмов. Рост периодической смешанной культуры (ассоциации микроорганизмов) в ячейках в лаг-фазе и фазе не лимитированного роста описывался комплексной моделью роста периодической культуры микроорганизмов. Уравнение имеет вид

$$x(t) = x_0(1 - \rho_0 + \rho_0 e^{\mu_m t})$$

где $x(t)$ – концентрация микроорганизмов в культуре в момент времени t, x_0 – начальная концентрация микроорганизмов, μ_m – максимальная удельная скорость роста, $ч^{-1}$, ρ_0 – начальное значение (значение в почве) физиологического состояния растущей культуры.

Описание лаг-фаза (стадию подготовки микроорганизмов к росту) и фаза экспоненциального роста (фазу роста, когда пищи в избытке) комплексной моделью роста периодической культуры позволяет охарактеризовать исследуемые бактериальные ассоциации микроорганизмов кинетическими параметрами роста. В работе также используется параметр метаболической готовности к потреблению того или иного полимера возникающей микробной ассоциации $\gamma = -\ln(\rho_0) = \mu_m t_{лаг}$. Эта величина прямо пропорционально связана с $t_{лаг}$ – длительностью лаг-фазы.

Результаты и обсуждение

Феномен исследуемого бактериального сообщества состоит в том, что, в отличие от почв умеренных зон, в жидких ассоциациях доминируют не свободноплавающие планктонные формы, а плёнкообразователи (в частности, *Bacillus cereus* var. *mycoides*), образующие биопленки в минеральной матрице. Это привело к отсутствию корреляции между оптиче-

ской плотностью и концентрацией клеток в суспензии питательных сред (см. рис. 3.).

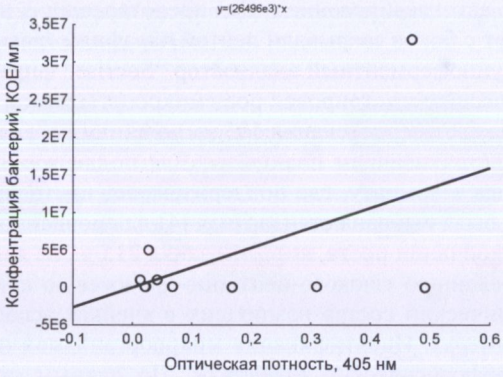

Рис. 3. Корреляционная зависимость концентрации бактерий в суспензии, от оптической плотности при высеве из лунок на глюкозо-пептонно-дрожжевую среду для ассоциаций, возникающих из микробного сообщества антарктической почвы.

Поэтому для перехода от оптической плотности к концентрации клеток в среде был взят коэффициент пересчёта, рассчитанный для почв умеренной зоны нашей страны (рис. 4).

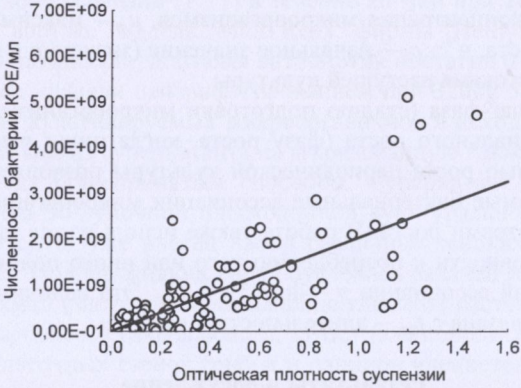

Рис. 4. Корреляционная зависимость концентрации бактерий в суспензии, от оптической плотности при высеве из лунок на глюкозо-пептонно-дрожжевую среду для ассоциаций возникающих из почв умеренной зоны нашей страны. Объем выборки 150.

Посев исходной почвенной суспензии показал закономерное резкое снижение обилия микроорганизмов вниз по профилю (рис. 5).

Физиологическое разнообразие бактерий гидролитиков оценивали по числу питательных сред с полимерами, на которых наблюдался рост после внесения почвенной суспензии. В данной модификации метода порог чувствительности метода >10 клеток способных расти на полимере на грамм почвы.

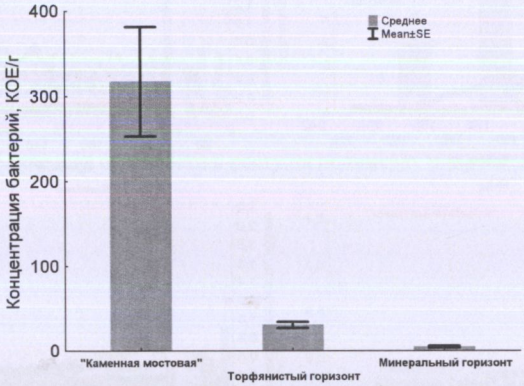

Рис. 5. Изменение обилия культивируемых бактерий (колоний образующих единиц (КОЕ/г)) вниз по профилю.

Физиологическое разнообразие предсказуемо снижается в глубину с 7 потребляемых полимеров в «каменной мостовой» (крахмал, пектин, декстран-500, казеин, карбоксиметилцеллюлоза (КМЦ), хитин, ксилан) до 5 в торфянистом горизонте (крахмал, пектин, декстран-500, казеин, хитин) и 3 (хитин, крахмал, казеин) в минеральном горизонте (рис. 6).

Это связано с уменьшением поступления растительных полимеров с остатками мхов, водорослей, лишайников от «каменной мостовой» к минеральному горизонту, где ассоциации формируют крайне малочисленные колонии бактерий. Хитин потребляется в нижнем горизонте из-за высокого обилия грибного мицелия, содержащего хитин и видимого невооруженным глазом. За гидролиз хитина в жидких средах отвечают бактерии рода *Bacillus*. Парадоксально отсутствие микроорганизмов, способных расти на твине-20 (аналоге жиров), обычно легко утилизируемом субстрате.

Физиологическое состояние бактерий в почве, оцененное по метаболической готовности к росту микробных ассоциаций (γ), свидетельствует о закономерно большей активности микроорганизмов в верхнем горизонте каменной мостовой (рис. 7). Интересно увеличение максимальной удельной скорости роста бактериальных ассоциаций на жидких питательных средах после инокуляции суспензии из нижнего горизонта (рис. 8), что указывает на увеличение доли в сообществе минерального горизонта быстрорастущих дорматных бактерий – по данным посева из казеина и крахмала это, возможно, *Bacillus*.

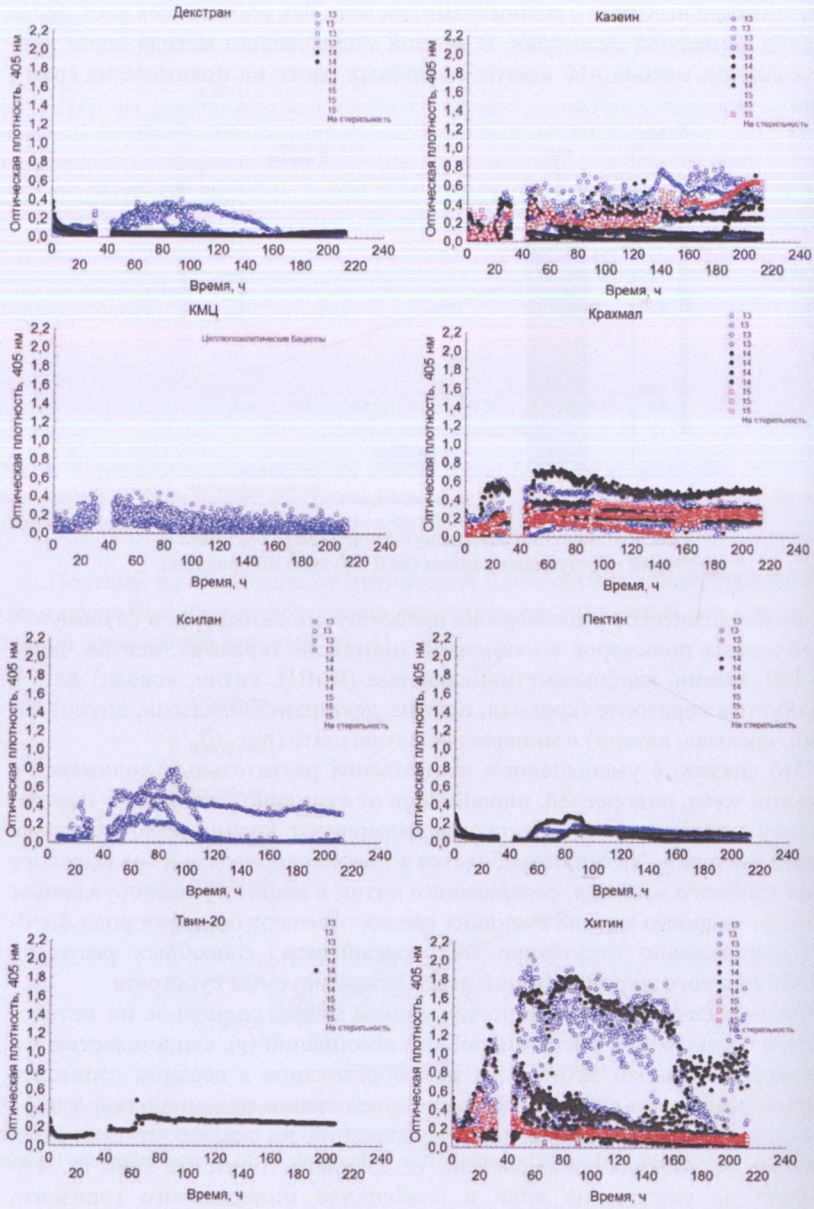

Рис. 6. Периодический рост бактериальных ассоциаций на полимерах.

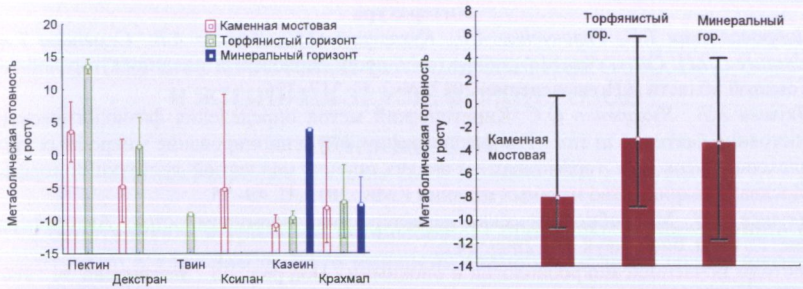

Рис. 7. Метаболической готовности к росту на полимерах микробных ассоциаций.

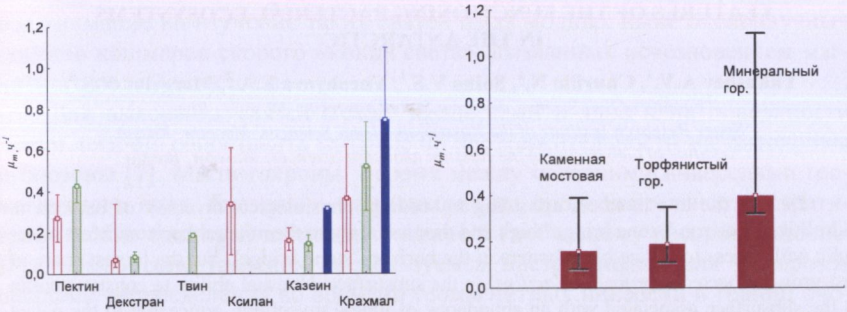

Рис. 8. Максимальная удельная скорость роста μ_m бактериальных ассоциаций на жидких питательных средах с полимерами.

Выводы

1. Не смотря на низкую численность по данным посева, физиологическое разнообразие бактерий гидролитиков в горизонте «каменной мостовой» велико и резко падает к минерального горизонту.

2. Наибольшая метаболическая готовность к утилизации биополимеров в горизонте «каменная мостовая», но наибольшая доля быстрорастущих бактерий (возможно *Bacillus*) в нижнем горизонте.

3. Необычная способность потреблять хитин в нижнем горизонте связана с обилием грибного мицелия, заметного невооруженным взглядом.

4. Неспособность потреблять твин-20 (водорастворимый аналог жиров) бактериальным сообществом арктической почвы не объяснима и нуждается в дальнейшей проверке.

5. Феномен исследуемого бактериального сообщества состоит в том, что, в отличие от почв умеренных зон, в жидких ассоциациях доминируют не свободноплавающие планктонные формы, а плёнкообразователи (например, *Bacillus cereus* var. *mycoides*), образующие биопленки в минеральной матрице.

Литература

1. *Добровольская Т.Г., Головченко А.В., Кухаренко О.С., Якушев А.В., Семенова Т.А., Инишева Л.И.* Структура микробных сообществ верховых и низинных торфяников Томской области // Почвоведение. 2012. № 3. С. 317–326.
2. *Якушев А.В., Кухаренко О.С.* Кинетический метод определения физиологического состояния бактерий *in situ* / Гл. в монографии «Функционирование микробных комплексов в верховых торфяниках — анализ причин медленной деструкции торфа». Москва: Товарищество научных изданий КМК. 2013. С. 49–55.
3. *Якушев А.В.* Микробиологическая характеристика вермикомпостов. Автореферат дис. … канд. биол. наук. М., 2009. 24 с.
4. Методы почвенной микробиологии и биохимии / Под ред. Д.Г. Звягинцева. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1991. 303 с.

FEATURES OF THE FUNCTIONING BACTERIAL ECOSYSTEMS IN THE ANTARCTIC

Yakushev A.V.[1], Churilin N.[1], Soina V.S.[1], Vorobyova E.A.[2], Mergelov N.S.[3]

[1]*Faculty of Soil Science, Moscow State University, Moscow, Russia*
[2]*Space Research Institute of the Russian akademii Sciences, Moscow, Russia*
[3]*Institute of Geography of the Russian akademii Sciences, Moscow, Russia*

Despite the low numbers according to seeding, physiological diversity of bacteria in gidrolitikov horizon "stone bridge" high and drops sharply to the mineral horizon. Most metabolic willingness to utilize biopolymers in the horizon "stone bridge", but the largest share of fast-growing bacteria (probably *Bacillus*) in the subsurface. Unusual ability to consume chitin in the subsurface associated with an abundance of fungal mycelium, noticeable to the naked eye. Not able to consume Tween-20 (a water-soluble analogue of fat) bacterial community of Arctic soils are not explained and needs further verification. The phenomenon is investigated microbial communities that, unlike soils in temperate zones, in liquid associations dominated not free-swimming planktonic forms but plënkoobrazovateli (e.g., *Bacillus cereus var. mycoides*), forming a mineral matrix of the biofilm.