

A new highly productive *Rhizobium leguminosarum* strain 34 has been determined in similar experiments with pea. It exceeded the other strains for nodule number and nodule weight. The inoculation with this strain resulted in more intensive shoot growth.

*Keywords: nitrogen fixation ability, nodulating bacteria strains, soybean, pea, chickpea, symbiosis characters, breeding*

Рекомендує до друку

Надійшла 08.04.2014

С.В. Пίδα

УДК 579.22+579.26

<sup>1</sup>А.Б. ТАШИРЕВ, <sup>1</sup>О.С. СУСЛОВА, <sup>1</sup>П.В. РОКИТКО, <sup>2</sup>К.М. БОНДАРЬ, <sup>3</sup>В.В. ПОКАЛЮК

<sup>1</sup>Інститут мікробіології і вірусології імені Д.К.Заболотного НАН України

ул. Академика Заболотного, 154, Київ ДСП, Д03680

<sup>2</sup>Київський національний університет імені Тараса Шевченка

ул. Васильковська, 90, Київ, 03022

<sup>3</sup>Інститут геохімії оточуючої середовища НАН України і МЧС України

просп. Академика Палладина, 34 а, Київ, 03680

## **ЭКОФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА АЗОФИКСАТФИКСИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ КАРСТОВЫХ ПОЛОСТЕЙ МУШКАРОВА ЯМА И КУЙБЫШЕВСКАЯ**

З глинистих відкладів двох карстових порожнин Мушкарова Яма (Поділля, Україна) та Куйбишевська (Західний Кавказ, Абхазія) були виділені шість штамів азотфіксуючих бактерій. Встановлено, що штами здатні рости як в копію-, так і в олігокарботрофних умовах, утилізувати широкий спектр органічних речовин (цукри, органічні кислоти, спирти, ароматичні сполуки), в тому числі центральні метаболіти циклу вуглецю. Показано, що всі штами мають широкий температурний діапазон росту. Вони представлені мезотермофілами та психлотолерантами. За температури 5°C лаг-фаза штамів подовжується в 4 рази і складає 20-25 діб.

*Ключевые слова: азотфиксирующие бактерии, карстовые полости*

Наряду с хорошо известными наземными и водными экосистемами на нашей планете существуют уникальные и малоизученные сообщества живых организмов. Некоторые из них формируются в подземных полостях различного происхождения. Наиболее распространенными являются карстовые полости, образующиеся в результате растворения и механического разрушения проницаемых растворимых (карстующихся) карбонатных и сульфатных горных пород. Их возраст, как правило, измеряется миллионами лет. По оценкам разных авторов [7, 8], открыто и описано лишь 0,1% – 10% карстовых полостей. Особенности карстовых полостей как среды обитания являются полное отсутствие света, относительная стабильность физико-химических параметров (постоянная температура, влажность, низкая концентрация органических соединений) на протяжении сотен лет. В карстовых полостях можно обнаружить редкие и экстремальные виды микроорганизмов, являющиеся реликтами прошлых геологических эпох.

Как правило, микроорганизмы экстремальных экосистем устойчивы к токсичным соединениям (например, металлы или органические ксенобиотики) и способны взаимодействовать с ними. Таким образом, данные экосистемы могут служить полигоном для биоразведки – скрининга промышленно перспективных микроорганизмов. Большой интерес к пещерным экосистемам проявляет NASA, рассматривая карстовые полости в качестве модельных объектов для отработки технологий поиска жизни на других планетах [5]. Принимая во внимание масштабы распространения и объемы карстовых полостей, микробные сообщества в них могут существенно

влиять на глобальные циклы элементов. Исследования карстовых полостей показали наличие в этих экосистемах микроорганизмов циклов азота [3, 8]. Эти микроорганизмы играют важнейшую роль в процессах образования органических соединений, их деструкции и минерализации. Азотфиксирующие микроорганизмы – ключевая физиологическая группа микроорганизмов цикла азота. Азотфиксирующие бактерии трансформируют молекулярный азот в органический. При освоении новых экониш (например, поверхности скал после извержения вулканов) они подготавливают условия для заселения почв другими группами микроорганизмов. Эта физиологическая группа также является индикатором загрязнения почв, поскольку именно азотфиксирующие микроорганизмы наиболее неустойчивы к воздействию экстремальных факторов (токсичные металлы и т.д.). Изучение физиологических особенностей азотфиксирующих микроорганизмов дает возможность оценить закономерности функционирования бактерий цикла азота в экосистеме карстовых полостей и их роль в биогеохимических циклах элементов.

Целью нашей работы была экофизиологическая характеристика азотфиксирующих бактерий из рыхлых глинистых отложений горизонтальной карстовой полости Мушкарова Яма и вертикальной пещеры-шахты Куйбышевская.

### Материал и методы исследований

*Объектами исследования* выступили азотфиксирующие бактерии, выделенные нами из отложений глин двух пещер. Одна проба была отобрана в максимально удаленной от входа точке лабиринтовой пещеры Мушкарова Яма, заложенной в гипсах неогенового возраста на Подолье Украины, другая – в донном зале вертикальной полости пещеры Куйбышевская, образованной в юрских известняках Западного Кавказа, на глубине 1 км от входа (отбор О.Ткачевой, Украинская спелеологическая ассоциация, август 2013 г.). После отбора образцы хранились в холодильнике при температуре +4°C в герметично закрытых полиэтиленовых пакетах. Для последующего пересчета количества клеток в 1 г глины учитывали коэффициент влажности почвы.

*Выделение азотфиксирующих бактерий* проводили на жидкой и агаризованной среде Эшби [4]. Состав среды, г/л:  $K_2HPO_4$  — 0.2,  $MgSO_4$  — 0.2,  $NaCl$  — 0.2,  $K_2SO_4$  — 0.1,  $CaCO_3$  — 5, pH среды – 7.2-7.4. Источник углерода (сахароза) вносили в «копикоцентрации» — 20 г/л (8,4 мг С/л ) и в «олигоконцентрации» – 0.02 г/л (0,084 мг С/л). Копикокарботрофные условия – это условия, при которых концентрация углерода в среде не менее 0.5 г/л, а олигокарботрофные – не более 0.09 г/л углерода [6].

*Штаммы выделяли* на жидкой и агаризованной среде Эшби с сахарозой. Полученные на агаризованной среде колонии, отличающиеся по морфологическим признакам (морфотипы), пересеивали последовательно трижды на жидкую среду Эшби. Морфотипы, выросшие после трехкратной реинкуляции в жидкой среде, рассевали на агаризованную среду для получения единичных колоний и проверки чистоты культуры. Далее штаммы проверяли на способность фиксировать молекулярный азот. Для этого их высевали в жидкую среду Эшби (100 мл) во флаконы (500 мл) с герметичным затвором. В закрытые инокулированные флаконы добавляли стерильный воздух (100 мл) для создания избыточного давления. Далее штаммы выращивали на качалке (145 об/мин, 7 суток, температура 22°C), ежедневно анализируя состав газовой фазы. Фиксацию  $N_2$  оценивали по снижению его концентрации в газовой фазе.

*Температурный диапазон роста определяли* на агаризованной среде Эшби с сахарозой при экспозиции инокулированных чашек при температурах – 5, 18, 25, 30, 37°C. Контролируемыми параметрами были наличие роста штаммов по штриху и длительность лаг-фазы.

*Способность использовать субстраты* устанавливали на жидкой среде Эшби в четырех вариантах – с сахарозой, этанолом, натрия ацетатом, натрия бензоатом. В пробирки (16Ч120 мм, объемом 20 мл) со средой (10 мл) каждого варианта вносили инокулят (0.1 мл) и культивировали при температуре 25°C в течение 10 суток под ватно-марлевой пробкой. Прирост биомассы определяли фотокolorиметрически на КФК-2МП, оптический путь кюветы 0.5 см,  $\lambda=540$  нм.

### Результаты исследований и их обсуждение

Нами установлено, что в глинах карстовых пещер Мушкарова яма и Куйбышевская присутствуют азотфиксирующие микроорганизмы. Они могут фиксировать молекулярный азот, как при

высоких, так и при малых концентрациях органических соединений. В глинах Мушкаровой Ямы количество копиокарботрофных азотфиксирующих бактерий на один-два порядка превышало количество олиготрофных –  $nЧ10^6$ - $nЧ10^8$  и  $nЧ10^5$ - $nЧ10^6$  кл/г глины, соответственно. В глинах шахты Куйбышевская доминируют олигокарботрофные азотфиксирующие микроорганизмы. Количество олигокарботрофных на два порядка превышает количество копиокарботрофных -  $nЧ10^4$  и  $nЧ10^2$  кл/г глины, соответственно.

Следует отметить высокую концентрацию олигокарботрофных азотфиксирующих микроорганизмов в исследуемых экосистемах. Известно, что для фиксации 1 молекулы молекулярного азота, т.е. восстановления тройной ковалентной связи, бактерии используют большое количество АТФ – 16 молекул [1]. Именно этим и объясняется необходимость внесения в среду источника углерода и энергии в высокой концентрации. При культивировании азотфиксирующих бактерий карстовых полостей в среду вносят органические соединения в концентрации в 100 раз ниже той, что используется для выделения и культивирования копиотрофных азотфиксаторов на среде Эшби. Отсюда следует, что олиготрофные микроорганизмы карстовых полостей могут играть существенную роль в фиксации молекулярного азота в пещерных глинах при малых концентрациях органических соединений.

При количественном учете было выделено 14 морфотипов колоний, потенциально относящихся к азотфиксирующим бактериям. Из них 6 морфотипов выросли в жидкой среде Эшби с сахарозой после третьего пересева, что свидетельствует об их способности расти на безазотистой среде и фиксировать молекулярный азот. Все штаммы представлены бактериями (№ – кокки; N1, N2, N7, N8, N10 – палочки), непигментированы, либо слабо пигментированы, не образуют спор.

Азотфиксирующие микроорганизмы являются гетеротрофами и окисляют широкий спектр органических соединений. Они являются поставщиками органического азота, и участвуют в аккумуляции органических соединений азота в глинах карстовых полостей. Поэтому выявление спектра доступных субстратов и их концентраций для азотфиксирующих бактерий имеет общебиологическое значение.

Для всех штаммов определяли спектр доступных субстратов и температурный диапазон роста (табл.). В качестве источников углерода и энергии использовали *центральные метаболиты*<sup>1</sup> цикла углерода – ацетат и этанол. Согласно данным литературы [7, 8], в глинах почв содержатся ароматические соединения. Поэтому в спектр субстратов был включен бензоат натрия как нетоксичное ароматическое соединение.

Таблица

Экофизиологическая характеристика штаммов азотфиксирующих бактерий карстовых полостей Мушкарова Яма и Куйбышевская

Экосистема	№ штамма	Утилизация субстратов*				Температурный диапазон роста, °С
		сахароза	этанол	натрия ацетат	натрия бензоат	
Мушкарова Яма	N1	+	-	+	-	18-37
	N2	+	+	+	-	5-30
	N6	+	+	+	+	5-30
Куйбышевская	N7	+	+	+	+	5-30
	N8	+	+	+	-	5-30
	N10	+	+	+	-	18-30

\* “+” – использует в качестве источника углерода, “-” – не использует в качестве источника углерода

<sup>1</sup> Под центральными метаболитами мы понимаем простые соединения, образующиеся в результате микробной деструкции белковых и растительных полимеров в биохимических циклах. Наиболее распространённые центральные метаболиты – этанол, ацетат, углекислый газ (Заварзин Г.А., 2003).

Азотфиксирующие бактерии способны использовать в качестве субстратов широкий диапазон органических соединений [1]. Однако вопрос использования этими микроорганизмами органических соединений в малых концентрациях не изучался. Нами показано, что все изоляты утилизировали субстраты в олиго- и копиокарбоконтрациях – 84 и 8400 мг С/л. По приросту биомассы мы провели разделение на «копио» и «олиго» штаммы, т.е. штаммы, дающие больший прирост биомассы в среде с высоким содержанием органических соединений (сахарозы), мы отнесли к копиокарботрофным. Остальные отнесены к олигокарботрофным. Таким образом, штаммы N1, N6 были отнесены к копиокарботрофам, N2 – к олигокарботрофам, а N7, N8, N10 растут в широком концентрационном диапазоне субстратов, что позволяет отнести их как к олиго-, так и к копиокарботрофам. Длительность лаг-фазы при культивировании на сахарозе, манните и натрия бензоате у большинства штаммов составляла 7 суток. При культивировании с натрием ацетатом и этанолом – 10 суток.

При культивировании штаммов в копиокарботрофных условиях наибольший прирост биомассы отмечен на таких источниках углерода и энергии как сахароза и маннит (рис. 1). Меньший прирост биомассы (30-45%) наблюдали на этаноле и совсем незначительный – на бензоате.

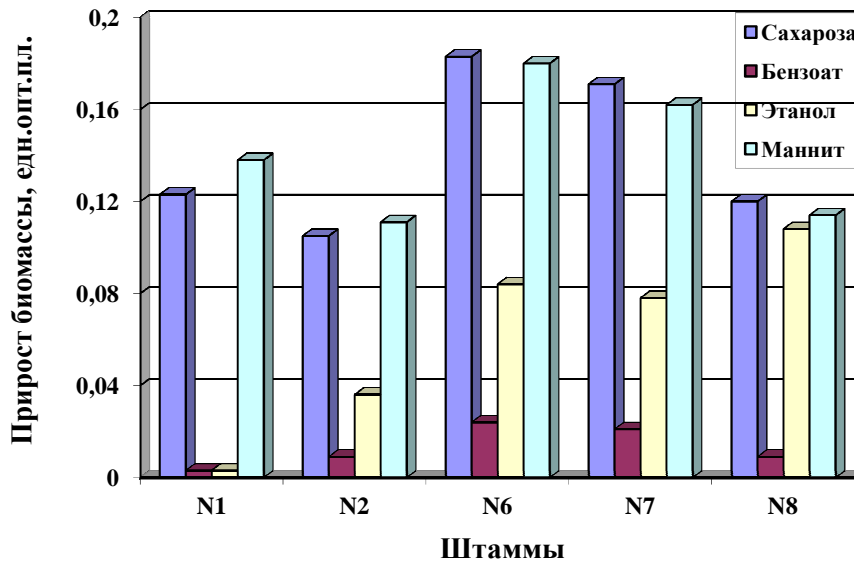


Рис. 1. Прирост биомассы штаммов азотфиксирующих бактерий на жидкой среде Эшби в зависимости от источника углерода (копиокарботрофные условия)

При культивировании же в олигокарботрофных условиях наибольший прирост биомассы (90-100%) также наблюдали на сахарозе и манните (рис. 2). На ацетате прирост биомассы варьировался в диапазоне 55-90%, а на этаноле – 30-80% в зависимости от штамма. В олиготрофных условиях только один штамм (N7) давал сопоставимый с контрольным прирост биомассы на бензоате – 60%.

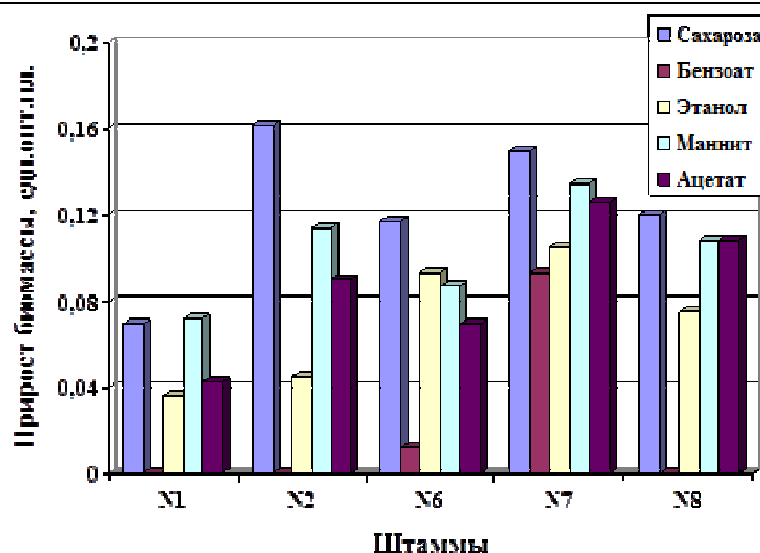


Рис. 2. Прирост биомассы штаммов азотфиксирующих бактерий на жидкой среде Эшби в зависимости от источника углерода (олигокарботрофные условия)

Ранее было показано, что азотфиксирующие микроорганизмы карстовых полостей способны расти при пониженных температурах – 4-5°C [3]. Мы установили, что все выделенные штаммы способны расти в широком температурном диапазоне (табл.). По отношению к температуре штаммы были разделены таким образом: N1, N10 – мезотермофилы, N2, N6, N7, N8 – психротолеранты и мезотермофилы. В мезотермальных условиях лаг-фаза у всех штаммов длилась 6-8 суток. А при 5°C лаг-фаза у психротолерантных штаммов увеличивалась до 20-25 суток.

### Выводы

Азотфиксирующие бактерии карстовых полостей Мушкарова Яма и Куйбышевская растут в широком диапазоне концентраций органических соединений, субстратов и температур. Это свидетельствует об их высоком адаптационном потенциале. Способность фиксировать молекулярный азот и расти в олигокарботрофных условиях способствует дальнейшей колонизации глин карстовых полостей полноценными микробными сообществами. Способность азотфиксирующих бактерий данных экосистем расти в неблагоприятных условиях (пониженная температура, малые концентрации источников углерода) может быть использована в перспективе в природоохранных биотехнологиях, например для биоремедиации промышленных отвалов.

1. Заварзін Г.А. Лекції з природознавчої мікробіології / Г.А. Заварзін. — М.: Наука. — 2003. — 348 с.
2. Практикум по микробиологии: Учеб. пособие / А.И. Нетрусов, М.А. Егорова, Л.М. Захарчук и др.; Под ред. А.И. Нетрусова. — М.: Академия. — 2005. — 608 с.
3. Хижняк С.В. Численность и качественный состав микрофлоры карстовых пещер Красноярского края / С.В. Хижняк, И.В. Таушева, А.А. Березикова, Е.В. Нестеренко // Проблемы экологии Сибири: Сб. науч. трудов. Красноярск. — 2001. — С. 69—77.
4. Ashby S. F. Some Observations on the Assimilation of Atmospheric Nitrogen by a Free Living Soil Organism // The Journal of Agricultural Science. — 1907. — Vol.2. — P. 35—51.
5. Boston P.J., Spilde M.N., Northup D.E. Cave biosignature suites: microbes, minerals, and Mars// Astrobiology. — 2001. — Vol. 1(1). — P. 25—55.
6. Laiz L. Isolation bacteria of caves and substrate using in different temperature/ L. Laiz, M. Gonzalez-Delvalle, B. Hermosin et. al. // Cave and Study Karst. — 1997. — P. 7—11.
7. Maltsev V.A. Cave chemolithotrophic soils / V.A. Maltsev, V.V. Korshunov, A.A. Semikolennykh // Proc. of 12th Cong. of Speleology.- La-Chaux-de-Fonds. Switzerland. — 1997. — Vol. 1. — P. 29—32.
8. Northup D.E. Geomicrobiology of caves: A review/ D.E. Northup, K.H. Lavoie // Geomicrobiology Journal. — 2001. — Vol 18. — № 3. — P. 199—220.

*О.Б. Таширеві, О.С. Сусліва, П.В. Рокітко, К.М. Бондарь, В.В. Покалюк*  
Інститут мікробіології та вірусології імені Д.К. Заболотного НАНУ України  
Київський національний університет імені Тараса Шевченка  
Інститут геохімії навколишнього середовища НАН України і МНС України

#### ЕКОФІЗІОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА АЗОТФІКСУЮЧИХ БАКТЕРІЙ КАРСТОВИХ ПОРОЖНИН МУШКАРОВА ЯМА І КУЙБИШЕВСЬКА

З глинистих відкладів двох карстових порожнин Мушкарова Яма (Поділля, Україна) та Куйбишевська (Західний Кавказ, Абхазія) були виділені шість штамів азотфіксуючих бактерій. Встановлено, що штами здатні рости як в копіо-, так і в олігокарботрофних умовах, утилізувати широкий спектр органічних речовин (цукри, органічні кислоти, спирти, ароматичні сполуки), в тому числі центральні метаболіти циклу вуглецю. Показано, що всі штами мають широкий температурний діапазон росту. Вони представлені мезотермофілами та психротолерантами. За температури 5°C лаг-фаза штамів подовжується в 4 рази і складає 20-25 діб. Здатність фіксувати молекулярний азот і рости в олігокарботрофних умовах сприяє подальшій колонізації глини карстових порожнин повноцінними мікробними угрупованнями. Здатність азотфіксуючих бактерій даних екосистем рости в несприятливих умовах (понижена температура, малі концентрації джерел вуглецю) може бути використана в перспективі в природоохоронних біотехнологіях, наприклад для біоремедіації промислових відвалів.

*Ключові слова: азотфіксуючі бактерії, карстові порожнини*

*O.B. Tashyrev, O.S. Suslova, P.V. Rokitko, K.M. Bondar, V.V. Pokalyuk*  
Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of the NASU, Ukraine  
National Taras Shevchenko University of Kyiv, The Faculty of Geology, Ukraine  
Institute of Environmental Geochemistry of the NAS and MES of Ukraine

#### NITROGEN-FIXING BACTERIA ECOPHYSIOLOGICAL CHARACTERISTIC OF MUSHKAROVA YAMA AND KUYBUSHEVSKAYA KARST CAVES

From clay deposits of two karst caves Mushkarova Yama (Podillya, Ukraine) and Kuibyshevskaya (Western Caucasus, Abkhazia) were isolated six strains of nitrogen-fixing bacteria. It has been established that the strains are able to grow in kopio- and oligocarbotrophic conditions, utilize a wide range of organic compounds (sugars, organic acids, alcohols, aromatic compounds), including central metabolites of carbon cycle. It was shown that all strains grow in a wide temperature range. They are characterized as mezotermophilic and psychrotolerant. At 5 °C strains lag phase increased in 4 times and lasted 20-25 days. Ability to fix atmospheric nitrogen and grow in oligocarbotrophic conditions helps to further colonization of cave clays by complex microbial communities. The ability of cave nitrogen-fixing bacteria grow in unfavorable conditions (low temperature, low concentrations of carbon sources) can be used in future in environmental biotechnologies, e.g. for bioremediation of industrial waste dumps.

*Keywords: nitrogen-fixing bacteria, karst caves*

Рекомендує до друку  
В.В. Грубінко

Надійшла 09.04.2014