

Таким образом, использование серосодержащего антиоксиданта нового поколения «Тиофан» позволяет оптимизировать расход собственных антиоксидантных соединений, запасенных в яйце. Возможность их рационального использования должно обеспечить стабильность метаболических процессов, направленных на рост, развитие и дальнейший переход развития эмбрионов от гастрюляции к органогенезу. Полученные результаты позволяют считать, что антиоксидант «Тиофан» не является стимулятором роста, а лишь тонким инструментом настройки метаболических процессов. Использование разработанной технологии позволила увеличить выживаемость эмбрионов в опытной группе через 7 ч после оплодотворения на 12,87 % по сравнению с контролем.

Литература

1. Дудкин С.И., Колесникова Л.В., Цема Н.И. Окислительный стресс и проблемы эмбриональной смертности ихтиофауны: неучтенный фактор ущерба естественному воспроизводству природных популяций в условиях хронического загрязнения водных экосистем // Мат-лы Междунар. науч. конф. – Ростов н/Д, 2004. – С. 49–51.
2. Лужин Б.Г. Зародышевое развитие карпа // Рыбоводство и рыболовство. – 1977. – № 2. – С. 11–12.
3. Макеева А.П. Эмбриология рыб. – М., 1992. – 216 с.
4. Меньщикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К. Окислительный стресс. – М., 2006. – 553 с.
5. Определение химических элементов в биологических средах и препаратах методами атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой: метод. указания. – М.: Федеральный центр Россанэпиднадзора Минздрава России, 2003. – 56 с.
6. Ромейс Б. Микроскопическая техника. – М.: Иностранная лит-ра, 1954. – 719 с.
7. Скулачев В.П. Эволюция, митохондрии и кислород // Соросовский образов. журн. – 1999. – № 9. – С. 1–7.
8. Скулачев В.П. Явления запрограммированной смерти. Митохондрии, клетки и органы: роль активных форм кислорода // Соросовский образов. журн. – 2001. – Т. 7. – № 6. – С. 4–10.
9. Стратегия развития аквакультуры в Российской Федерации на период до 2020 года. – М., 2007. URL: www.mscx.ru.
10. Черномашенцев А.И., Мильштейн В.В. Рыбоводство. – М., 1983. – 272 с.



УДК 579.2

С.В. Воробьева, С.В. Хижняк, Л.Т. Харламова

ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ НА РОСТ ПСИХРОФИЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПЕЩЕР ДАЛЬНЕГО ВОСТОКА, СРЕДНЕЙ СИБИРИ И ЗАПАДНОГО КАВКАЗА

Статья посвящена сравнительному анализу температурных диапазонов роста психотропных бактерий, выделенных из пещер различных регионов бывшего СССР.

Ключевые слова: пещеры, микробные сообщества пещер, психрофильные и психротолерантные бактерии.

S.V. Vorobyeva, S.V. Hizhnyak, L.T. Kharlamova

INFLUENCE OF TEMPERATURE ON GROWTH OF PSYCHROPHILIC BACTERIA ISOLATED FROM THE CAVES OF FAR EAST, MIDDLE SIBERIA AND WESTERN CAUCASUS

The article is devoted to the comparative analysis of temperature range of psychotropic bacteria growth isolated from the caves of former USSR different regions.

Key words: caves, cave microbial communities, psychrophilic and psychrotolerant bacteria.

В настоящее время в мире наблюдается растущий интерес к использованию психрофильных и психротолерантных микроорганизмов в биотехнологии [10,13–16,18]. Показано, что психрофильные и психротолерантные микроорганизмы представляют интерес с точки зрения защиты растений [20], биоремедиации почвы и водных объектов в условиях низких температур [11], поиска низкотемпературных ферментов для биотехнологических процессов [10,19].

До сих пор основными источниками психрофильных и психротолерантных изолятов остаются Антарктика и Арктика [9, 21], в отдельных случаях – альпийские почвы [22]. Исследования, проведенные в Красноярском государственном аграрном университете, показали, что карстовые пещеры Средней Сибири являются уникальным природным источником психрофильных и психротолерантных бактерий и грибов [5, 6]. Было показано, что психрофильные и психротолерантные бактерии сибирских пещер представляют большой практический интерес для сельскохозяйственной биотехнологии, в качестве безопасного для теплокровных биологического средства защиты растений от болезней при низких температурах начала вегетационного периода [2, 3, 7].

Карстовые пещеры, сходные по своим физико-химическим, микроклиматическим и геологическим характеристикам с пещерами Сибири, широко распространены практически по всей территории бывшего Советского Союза. В этой связи представляется актуальным оценить возможность использования карстовых пещер других регионов в качестве источника психрофильных и психротолерантных штаммов бактерий. Ранее было установлено, что психрофильные и психротолерантные бактерии присутствуют не только в пещерах Средней Сибири, но и в пещерах Западного Кавказа [1]. Настоящая работа посвящена сравнительному анализу температурных диапазонов роста психрофильных бактерий, выделенных из пещер различных регионов бывшего СССР.

Объекты и методы. Объектом исследования служили 36 психрофильных и психротолерантных бактериальных изолятов, ранее выделенных нами из микробных сообществ пещеры Сарма (карстовый массив Арабика, Западный Кавказ), пещер Кузнецовская и Лисья (Дальний Восток), и пещер Ледяная, Караульная-2, Женевская, Гондурас (Средняя Сибирь). Суспензии бактериальных клеток из молодых культур, находящихся в экспоненциальной фазе роста, высевали на агаризованные питательные среды и инкубировали в течение 5...76 часов при различных температурах в диапазоне от плюс 2 до плюс 35°C. Время генерации (g) бактерий при разной температуре определяли как отношение \log_2 среднего числа клеток в микроколониях ко времени культивирования (рис. 1).

Удельную скорость роста (μ) вычисляли как $1/g$. Для построения теоретических кривых зависимости скорости роста от температуры использовали типовую модель [8]

$$\mu = (b \cdot (T - T_{\min}) \cdot \{1 - \exp[c \cdot (T - T_{\max})]\})^2.$$

где T_{\min} и T_{\max} – соответственно минимальная и максимальная температуры роста;
 μ – удельная скорость роста;
 b и c – константы.

Родовую принадлежность изучаемых изолятов определяли по нуклеотидным последовательностям гена 16S рРНК. Секвенирование генов 16S рРНК выполнено в Институте экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН (г. Пермь) и во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (г. Москва).

Были идентифицированы представители следующих родов: *Flavobacterium*, *Janthinobacteriu*, *Pseudomonas*, *Pedobacter*, *Arthrobacter*, *Sphingopyxis*, *Pseudochrobactrum*, *Paenibacillus*, *Bacillus*, *Sporosarcina*.

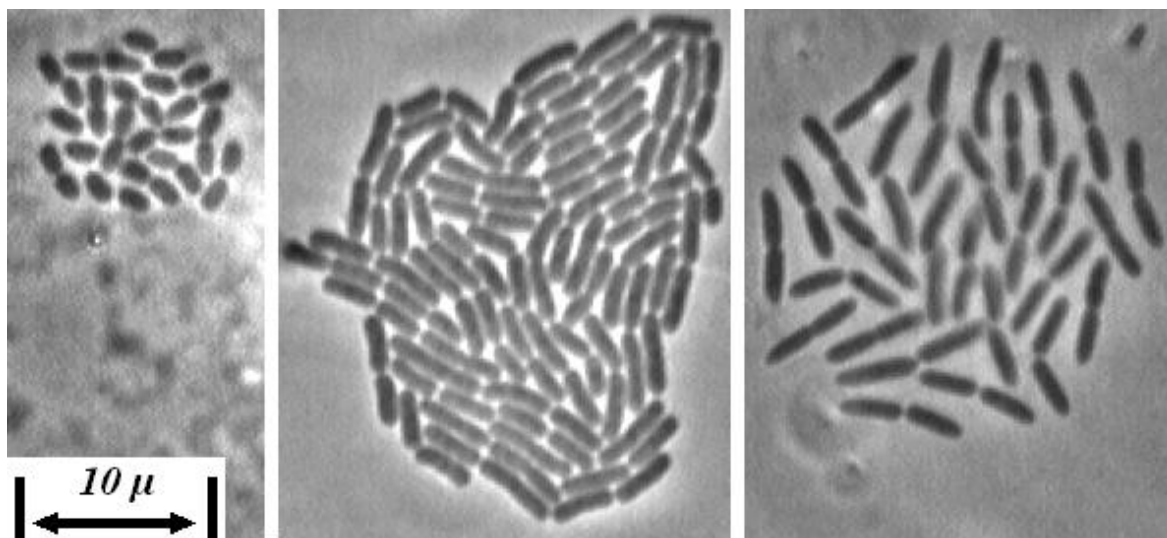


Рис. 1. Примеры микроколоний изучаемых изолятов на агаризованных питательных средах

Результаты и их обсуждение. Анализ температурных кривых роста бактерий, выделенных из пещер Кавказа и Дальнего Востока, показал их высокое сходство с аналогичными кривыми бактерий, выделенных из пещер Средней Сибири (рис. 2).

Обращает на себя внимание уход теоретических температурных кривых роста в область отрицательных температур. Ранее подобный феномен был отмечен для бактерий из антарктических и арктических местообитаний [8]. Можно предположить, что это отражает реальную способность ферментативных систем психрофильных бактерий к функционированию при отрицательных температурах. Такое предположение согласуется с зафиксированной в модельных экспериментах микробной активностью в тундровых почвах при температуре до минус 39°C [17].

В таблице представлены обобщенные данные по температурным характеристикам бактерий, выделенных из изучаемых сообществ.

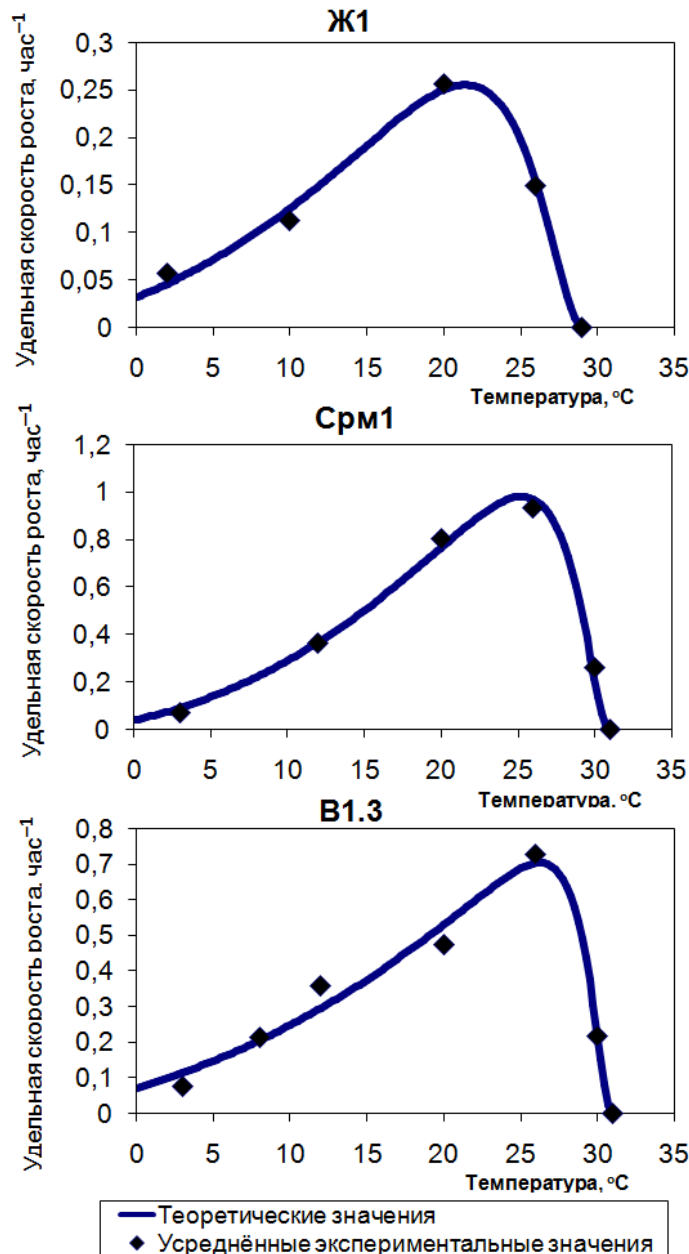


Рис. 2. Типичные температурные кривые роста психрофильных бактерий, выделенных из пещер Средней Сибири (на примере штамма Ж1), Кавказа (на примере штамма Срм1), Дальнего Востока (на примере штамма В1.3)

Температурные характеристики психрофильных бактерий, выделенных из изучаемых сообществ

Показатель	Средняя Сибирь	Западный Кавказ	Дальний Восток
Время генерации при +4 °С, ч	9,0...41,7	9,0...18,0	7,7...38,5
Теоретическая минимальная температура, °С	-10,2...-3,1	-11,5...+0,3	-11,7...-1,7
Верхний температурный предел, °С	+29...+32	+31...+35	+30...+34
Диапазон оптимальных температур, °С	+21...+29	+20...+30	+25... +29
Время генерации при оптимальной температуре, ч	2,2...3,9	1,0...1,9	1,3...2,5

Следует отметить сходство температурных характеристик бактерий, выделенных из географически удаленных пещер. Указанное сходство можно объяснить сходством экологических условий в данных пещерах. Все пещеры залегают в известняках, характеризуются постоянной температурой, близкой к плюс 4°С, и одинаковой стадией геологического развития (водно-галерейная, сухо-галерейная и грото-камерная стадии спелеогенеза). В этой связи следует ожидать одинаковой направленности эволюционных процессов в микробных сообществах этих пещерах.

В то же время таксономический состав психрофильных бактерий в изучаемых сообществах различается. Так, в сообществах сибирских пещер широко представлены спорообразующие бактерии р. *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Sporosarcina*, которые в сумме составляют 40% изолятов, в то время как в сообществах пещер Кавказа и Дальнего Востока психрофильные спорообразующие бактерии не выявлены. В то же время в пещере Сарма присутствуют психрофильные представители р. *Sphingopyxis*, не обнаруженные в пещерах Средней Сибири и Дальнего Востока. Психрофильные представители р. *Pseudomonas* и *Arthrobacter* обнаружены во всех изучаемых пещерах. Однако если психрофильные бактерии р. *Pseudomonas*, выделенные в пещерах Сибири, Дальнего Востока и Кавказа, демонстрируют сходство по гену 16S рПНК с одним и тем же набором видов (*Pseudomonas jessenii*, *P. moorei*, *P. fragi*), то спектр бактерий р. *Arthrobacter* в пещерах разных регионов различается. Так, для представителей данного рода, выделенных из пещер Сибири, характерно сходство с недавно описанным антарктическим видом *Arthrobacter antarcticus*. В то же время выделенные из пещер Дальнего Востока изоляты р. *Arthrobacter* генетически близки к почвенному виду *A. globiformis*, а выделенные из пещеры Сарма – к недавно описанному альпийскому виду *A. alpinus*. Отмеченные различия в таксономическом составе психрофильных бактерий в пещерных сообществах разных регионов согласуются с предположением о том, что сообщества пещер формируются на основе местной почвенной и водной микробиоты, проникающей в пещеры и адаптирующейся к низкотемпературным условиям подземной полости [4,7].

Выводы

1. В карстовых пещерах Западного Кавказа и Дальнего Востока присутствуют психрофильные и психротолерантные бактерии, аналогичные по своим температурным кривым роста бактериям, выделяемым из пещер Средней Сибири.

2. Таксономический состав бактерий в пещерных микробных сообществах Дальнего Востока, Средней Сибири и Западного Кавказа различается.

3. Карстовые пещеры Дальнего Востока и Западного Кавказа, наряду с пещерами Средней Сибири, могут служить источником психрофильных и психротолерантных бактериальных штаммов для осуществления низкотемпературных биотехнологических процессов.

Литература

1. Воробьева С.В., Илиенц И.Р., Хижняк С.В. Психрофильные и психротолерантные микроорганизмы пещеры Сарма // Вестн. КрасГАУ. – Красноярск, 2011. – Вып. 7. – С. 112–118.
2. Илиенц И.Р. Сообщества микромицетов пещер как источник штаммов для сельскохозяйственной и экологической биотехнологии: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.02.08. – Красноярск, 2011. – 19 с.

3. Ланкина Е.П. Бактериальные сообщества пещер как источник штаммов для биологической защиты растений от болезней: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.02.08. – Красноярск, 2010. – 18 с.
4. Нестеренко Е.В. Микромикеты карстовых полостей Средней Сибири: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 3.00.16. – Красноярск, 2007. – 19 с.
5. Хижняк С.В., Таушева И.В., Маящих И.Н. Микрофлора пещер окрестностей г. Красноярска // Вестн. КрасГАУ. – Красноярск, 1999. – Вып. 5. – С.80–84.
6. Психрофильные и психротолерантные гетеротрофные микроорганизмы карстовых полостей Средней Сибири / С.В. Хижняк [и др.] // Экология. – 2003. – № 4. – С.261–266.
7. Хижняк С.В. Микробные сообщества карстовых пещер Средней Сибири: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – Красноярск, 2009. – 32 с.
8. *Methanogenium frigidum* sp. nov., a Psychrophilic, H₂-Using Methanogen from Ace Lake, Antarctica / D.P. Franzmann [et. al.] // International Journal of Systematic Bacteriology. – 1997. – Vol.47. – № 4. – P. 1068–1072.
9. *Arthrobacter livingstonensis* sp. nov. and *Arthrobacter cryotolerans* sp. nov., salt-tolerant and psychrotolerant species from Antarctic soil / L. Ganzert [et. al.] // Int J Syst Evol Microbiol. – 2011. – 61(Pt 4). – P. 979–984.
10. Cold-adapted enzymes: from fundamentals to biotechnology / C. Gerday [et. al.] // Trends Biotechnol. – 2000. – 18(3). – P. 103–107.
11. Selection of a cold-adapted bacterium for bioremediation of wastewater at low temperatures / E. Gratia [et. al.] // Extremophiles. – 2009. – Vol. 13. – P. 763–768.
12. Kotsyurbenko O.R. Trophic interactions in the methanogenic microbial community of low-temperature terrestrial ecosystems // FEMS Microbiology Ecology. – 2005. – 53 (1). – P. 3–13.
13. Lettinga G., Rebac S., Zeeman G. Challenge of psychrophilic anaerobic wastewater treatment // Trends in Biotechnology Volume 19, Issue 9, 1 September. – 2001. – P. 363–370.
14. Production of Cold-Adapted Amylase by Marine Bacterium *Wangia* sp. C52: Optimization, Modeling, and Partial Characterization / J. Liu [et. al.] // Marine Biotechnology. – 2011. – 13 (5). – P. 837–844.
15. Margesin R., Schinner F. Properties of cold-adapted microorganisms and their potential role in biotechnology // Journal of Biotechnology. – 1994. – Vol. 33. – Issue 1. – P. 1–14.
16. Hydrocarbon degradation and enzyme activities of cold-adapted bacteria and yeasts / R. Margesin [et. al.] // Extremophiles. – 2003. Vol. 7. – № 6. – P. 451–458.
17. Panikov, N.S. Microbial activity in soils frozen to below –39°C / N.S. Panikov [et. al.] // Soil Biology and Biochemistry. – 2006. – Volume: 38, Issue: 4. – P. 785–794.
18. Russell N.J. Molecular adaptations in psychrophilic Bacteria: potential for biotechnological applications. Advances in Biochemical Engineering // Biotechnology. – 1998. – № 61– P. 1–21.
19. Siddiqui K.S., Cavicchioli R. Cold-adapted enzymes // Annual Review of Biochemistry. – 2006. – Vol. 75. – P. 403–433.
20. Psychrotolerance Mechanisms in Cold-Adapted Bacteria and their Perspectives as Plant Growth-Promoting Bacteria in Temperate Agriculture / P. Subramanian [et.al.] // Korean J. Soil Sci. Fert. – 2011. – 44(4). – P. 625–636.
21. *Arthrobacter psychrochitiniphilus* sp. nov., a psychrotrophic bacterium isolated from Antarctica / F. Wang [et. al.] // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology – 2009. – 59. – P. 2759–2762.
22. *Arthrobacter alpinus* sp. nov., a psychrophilic bacterium isolated from alpine soil / D.C. Zhang [et. al.] // Int J Syst Evol Microbiol. – 2010. – 60(9). – P. 2149–2153.

