

В. Е. МЯМИН¹, А. В. СИДОРЕНКО¹, Л. Н. ВАЛЕНТОВИЧ¹,
Ю. Г. ГИГИНЯК², Г. И. НОВИК¹, Э. И. КОЛОМИЕЦ¹

ХАРАКТЕРИСТИКА МИКРООРГАНИЗМОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ «ЗЕЛЕНОГО СНЕГА» ПРИБРЕЖНОЙ ЗОНЫ ВОСТОЧНОЙ АНТАРКТИДЫ

¹Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
vladmiamin@mail.ru, collection@mbio.bas-net.by

²ГНПО «НПЦ НАН Беларуси по биоресурсам», Минск, Беларусь

Исследованы морфологические и физиолого-биохимические свойства 46 культур микроорганизмов, изолированных из «зеленого снега» прибрежных областей Восточной Антарктиды. С помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии определена таксономическая принадлежность 16 выделенных культур, из которых 10 культур идентифицированы как представители класса *Actinobacteria*, родов *Arthrobacter* и *Rhodococcus*, 6 культур – класса *Gamma-proteobacteria*, рода *Pseudomonas*, 20 культур идентифицировать не удалось. Для анализируемых культур антарктических бактерий получены индивидуальные штаммоспецифичные белковые профили, на основании сходства которых выделено шесть кластеров, объединяющих представителей филогенетически близких таксонов. При изучении температурного диапазона роста выделенных культур установлено, что они растут в диапазоне температур 4–28 °С, оптимум роста 10–18 °С, и являются психротрофами. Проведен скрининг культур антарктических микроорганизмов на наличие биотехнологически важных ферментов, выявлены потенциальные продуценты протеаз, амилаз, целлюлаз, ДНКаз, липаз.

Введение. Живые организмы Антарктики относят к экстремофилам, поскольку они способны выживать в самых неблагоприятных условиях окружающей среды. Даже в прибрежных районах, характеризующихся более мягким климатом по сравнению с континентальной Антарктидой, значения температуры редко поднимаются выше 0 °С. В период короткого антарктического лета (декабрь–январь) животный и растительный мир этого региона подвержен довольно жесткому воздействию суммарной солнечной радиации, а в зимний период практически весь материк не получает солнечного тепла. Среди микроорганизмов-экс-

тремофилов Антарктики встречаются психрофилы, термофилы, алкалифилы, ацидофилы, барофилы, осмофилы, галофилы, ксерофилы, изучение которых представляет большой интерес для систематиков и экологов. Они также привлекают внимание биотехнологов, поскольку являются продуцентами ряда ферментов – липаз, протеаз, фосфатаз, эндонуклеаз рестрикции, активных в широком диапазоне температур и значений pH [1–3].

Первые работы по изучению микробиоты Антарктики и Антарктиды относятся к концу XIX – началу XX в. За более чем 100 лет исследования в этих экстремальных регионах обнаружены представители различных филогенетических групп: актинобактерии, протеобактерии, цианобактерии, спорообразующие бактерии, дрожжи и др. Из озер Антарктики выделены новые виды хемоорганотрофных и хемолитоавтотрофных микроорганизмов [4–6]. Накоплен значительный материал об особенностях распространения различных групп микроорганизмов в воздухе, грунтах и снеговом покрове Антарктиды. Наибольшее число видов, выделенных из почв и воздуха данного материка, относится к родам *Bacillus* и *Corynebacterium*, меньшим количеством видов представлены *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Flavobacterium*, *Achromobacterium*, *Cytophaga*. В 2000 г. опубликована одна из первых работ, описывающих разнообразие бактерий поверхностного снега на Южном полюсе Антарктиды. Согласно данным, полученным на основании анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК, около 20% сообщества микроорганизмов снега представлено бактериями из группы *Thermus–Deinococcus*, характеризующихся повышенной устойчивостью к радиации и засушливому климату. Также были обнаружены бактерии родов *Alcaligenes*, *Cytophaga* и *Bacteroides*. При анализе библиотек клонов фрагментов генов 16S рРНК в криоконитовых экосистемах на территории Сухих долин (западная часть Антарктики) найдены представители филумов *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia* и *Cyanobacteria*. Опубликованы сведения о составе микробного сообщества «красного снега» прибрежного района Восточной Антарктиды, характерная окраска которого обусловлена нали-

чием пигмента астаксантина, накапливающегося в результате роста на поверхности снега фототрофных бактерий. Анализ библиотек клонированных фрагментов генов 16S рРНК выявил несколько преобладающих таксономических групп бактерий: *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Cyanobacteria* [7–10]. Впервые данные о метаболической активности бактерий на поверхности антарктического снега были получены в 2000 г., когда в экспериментах *in situ* с использованием радиоактивно меченных тимидина и лейцина было показано, что при температуре окружающего воздуха до $-17\text{ }^{\circ}\text{C}$ микроорганизмы, находящиеся в снегу центральных областей Антарктиды, способны синтезировать белки и ДНК [8].

Несмотря на возрастающий интерес к изучению таксономического разнообразия и биотехнологического потенциала микроорганизмов, обитающих в экстремальных условиях Антарктиды, состав и функции микробценозов многих биотопов этого уникального материка остаются практически не исследованными. В частности, в литературе малочисленны сведения о микробиоте «зеленого снега», ярко выраженный зеленый оттенок которого обусловлен обильным развитием фототрофных бактерий и накоплением хлорофилла.

Цель работы – выделение, физиолого-биохимическая характеристика и идентификация микроорганизмов, обитающих в «зеленом снеге» прибрежных регионов Восточной Антарктиды.

Материалы и методы. Объектами исследований служили культуры микроорганизмов, выделенные из двух образцов «зеленого снега», отобранных в прибрежной части Восточной Антарктиды в районе базирования белорусской полевой базы «Гора Вечерняя». Для выделения и культивирования бактерий использовали мясопептонный агар (МПА) (г/л: пептон – 5,0; мясной экстракт – 1,5; дрожжевой экстракт – 1,5; NaCl – 5,0; агар – 20,0; pH $7,0 \pm 0,2$), культивирование проводили при $18\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 72–148 ч.

Морфологию колоний изучали визуально. Морфологию клеток исследовали методом световой микроскопии препаратов, окрашенных по Граму [11], используя микроскоп «Nikon Eclipse

Е2000» (Япония) при инструментальном увеличении $\times 400$. Наличие каталазы и оксидазы, способность к росту при разных температурах, продукцию ферментов (протеаз, дезоксирибонуклеаз, липаз, целлюлаз, пектиназ) определяли, применяя общепринятые методы [11]. Липазную активность исследовали на среде МПА, содержащей твин-80 или твин-20. Амилолитическую активность изучали на среде МПА с добавлением 0,2% растворимого крахмала. Для выявления целлюлолитических ферментов использовали среду МПА, содержащую 0,1% карбоксиметилцеллюлозы. Для обнаружения протеолитических ферментов применяли кальциево-казеиновый агар («Conda»), ДНКазной активности – DNase test agar («Conda»).

Идентификацию микроорганизмов осуществляли с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии. Подготовку образцов идентифицируемых бактерий для анализа проводили согласно стандартной методике, разработанной фирмой «Bruker Daltonics» [12]. Полученные белковые спектры сравнивали с референтными спектрами из базы данных Bruker Database Version 3.3.1.0 с помощью программного обеспечения MALDI Biotyper. Для выявления сходства белковых профилей анализируемых культур антарктических микроорганизмов применяли факториальный анализ, метод главных компонент [13], реализованный в виде конвейерного процесса в программной среде «R» [14].

Для выделения геномной ДНК бактерий использовали коммерческий набор Bacterial DNA Preparation Kit («Jena Biosciences») согласно прилагаемой инструкции. Амплификацию нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с универсальными эубактериальными праймерами 8f (5'-agagtttgatcctggctcag-3') и 1492g (5'-gggttacctgttacgactt-3') («Праймтех»), применяя следующий температурно-временной профиль: 98 °С – 5 мин (1 цикл); 98 °С – 20 с, 57 °С – 20 с, 72 °С – 90 с (30 циклов); 72 °С – 3 мин (1 цикл); охлаждение до 4 °С. В работе использовали набор реагентов для высокоточной ПЦР и Diamant ДНК-полимеразу (Институт микробиологии НАН Беларуси) согласно прилагаемой инструкции.

Нуклеотидную последовательность гена 16S рПНК определяли с помощью набора реагентов DNA Cycle Sequencing Kit («Jena Bioscience») согласно инструкции производителя. Разделение и анализ продуктов секвенирования проводили с помощью ДНК-анализатора Li-COR 4300 DNA Analyzer (Li-COR). Компьютерную обработку результатов секвенирования, их редактирование и предоставление в формате FASTA осуществляли, используя программу e-Seq™ Software V. 3.1.10.

Сравнительный анализ секвенированной нуклеотидной последовательности гена 16S рПНК и референтных последовательностей из базы данных ГенБанк выполняли с помощью программного обеспечения BLAST [15].

Результаты и обсуждение. В ходе работы 7-й Белорусской антарктической экспедиции (2014–2015 гг.) создана коллекция микроорганизмов, содержащая более 300 культур, выделенных из различных биотопов прибрежной части Восточной Антарктиды (участок Вечерний (S67°39' E46°10') оазис Холмы Тала, Земля Эндерби) – снежного покрова, воды и донных отложений пресных водоемов, мелкозема с повышенным содержанием нефтепродуктов, останков пингвинов и тюленей, панцирей морских звезд и ежей, эндолитных и гиполитных почв. Среди анализируемых биотопов одним из наиболее богатых по содержанию культивируемых микроорганизмов был «зеленый снег», из двух образцов которого изолировано 46 морфологически различающихся культур бактерий.

При изучении морфологических и физиолого-биохимических признаков выделенных бактериальных культур установлено, что они представляют собой кокки или короткие палочки, располагающиеся одиночно, в цепочках или группами (рис. 1).

Для большинства изолятов отмечено формирование многослойных структур, включающих агрегаты тесно контактирующих друг с другом адгезированных клеток, окруженных внеклеточным матриксом. Подобная микроскопическая картина может свидетельствовать об образовании биопленок – структурированных ассоциаций, которые в природных условиях являются естественной формой существования большинства ми-

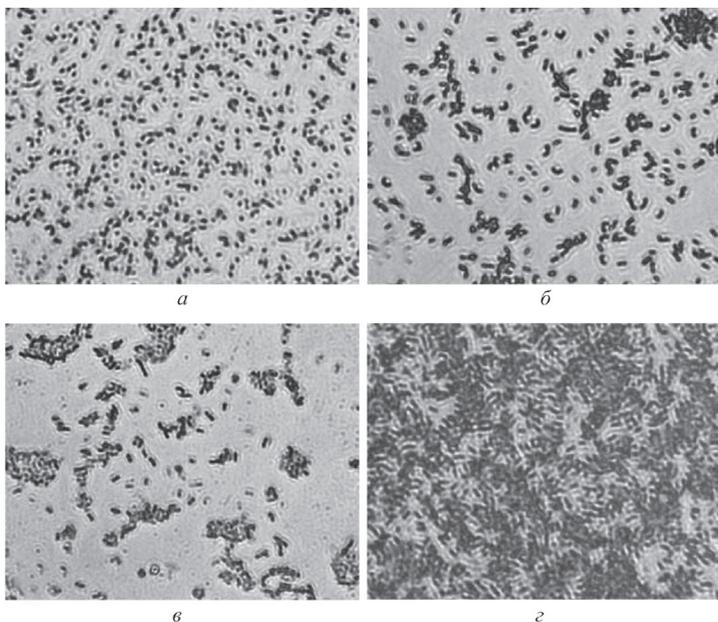


Рис. 1. Микрофотографии клеток бактерий, выделенных из «зеленого снега», 72 ч культивирования на среде МПА при 28 °С, световая микроскопия, $\times 400$: *a* – изолят З.С.2 (20°)-2; *б* – изолят З.С. Б 2 (P-1); *в* – изолят З.С.1-3; *г* – изолят З.С.1-26

кроорганизмов. Биопленки могут быть образованы бактериями одного или нескольких видов и состоять как из активно функционирующих клеток, так и из покоящихся или некультивируемых форм. Биопленки повышают устойчивость микроорганизмов к действию неблагоприятных абиотических факторов, в том числе низких температур, и играют важную роль в окружающей среде: принимают участие в поставке энергии и органического вещества в пищевые цепи экосистем, вовлекаются в биогеохимические пути [16]. Согласно литературным данным, большинство микроорганизмов, обитающих в экстремальных биотопах, в том числе криптогамных пустошах Восточной Антарктиды, формируют биопленки с развитым внеклеточным матриксом, функциональное значение которых заключается в первую оче-

редь в обеспечении регуляции роста и развития клеток, их защите от внешних воздействий за счет коммуникативных связей [17].

Первичная идентификация выделенных культур микроорганизмов показала, что 32 культуры относятся к группе грамположительных, оксидазоотрицательных, каталазоположительных бактерий, 2 культуры – грамположительных, оксидазоположительных, каталазоположительных бактерий, аэробы или факультативные анаэробы, хемотрофы, хорошо растущие на стандартных богатых питательных средах, нейтрофилы, наиболее схожие по совокупности фенотипических признаков с представителями филумов *Firmicutes* и *Actinobacteria*. Менее представительна группа грамотрицательных, оксидазоположительных, каталазоположительных бактерий, включающая 11 культур, и грамотрицательных, оксидазоотрицательных, каталазоположительных бактерий – 1 культура, объединяющие аэробов и факультативных анаэробов, хемотрофов, растущих при нейтральных значениях pH среды, наиболее вероятно относящихся к филуму *Proteobacteria*. Схожие результаты получены рядом российских исследователей, проанализировавших образцы поверхностного снега Восточной Антарктиды со станций Дружная и Ленинградская и показавших, что доминирующими представителями микробиоты являются бактерии филумов *Proteobacteria* (*Stenotrophomonas* sp., *Pseudomonas* sp., *Phyllobacterium* sp., *Roseococcus* sp.), *Actinobacteria* (*Rhodococcus* sp., *Microbacterium* sp.) и *Firmicutes* (*Bacillus* sp.).

Исследован температурный диапазон роста выделенных бактериальных культур, большинство из которых теоретически должно относиться к группе психрофильных микроорганизмов. Строгих психрофилов (криофилов), нормально существующих и размножающихся только при относительно низких температурах (обычно не выше 10 °C) среди изучаемых бактерий не обнаружено (табл. 1, рис. 2). Анализируемые культуры растут в диапазоне температур от 4 до 28 °C, не растут или характеризуются очень слабым ростом при 37 °C, что позволяет рассматривать их как психротрофов (факультативных психрофилов). Температурный оптимум роста для большинства выделенных бактериаль-

ных культур находится в диапазоне 10–18 °С, за исключением штаммов З.С.Б.1 (P-1), З.С.Б.1 (P-2), З.С.1-9, З.С.1-19 (P-2), З.С.2 (5°)-2), оптимальная температура роста которых 28 °С. Три анализируемых штамма – З.С.2 (20°)-1, З.С.2 (20°)-2, З.С.2 (5°)-1 – характеризовались одинаково хорошим ростом в диапазоне температур от 4 до 28 °С, но практически не росли при 37 °С.

Таблица 1. Температурный диапазон роста бактериальных культур, выделенных из «зеленого снега» Восточной Антарктиды

№	Культура	Температура (°С)				
		4	10	18	28	37
Грамположительные, оксидазоотрицательные, каталазоположительные						
1	З.С.1	5	6	9	1	0
2	З.С.2	5	6	9	1	0
3	З.С.3 (P-1)	5	6	8	0	0
4	З.С.3 (P-2)	5	6	9	3	0
5	З.С.5 (P-1)	8	9	10	4	0
6	З.С.5 (P-2)	8	9	10	1	0
7	З.С.1 (зеленый)	5	6	9	4	0
8	З.С.1 (желтый) (P-2)	8	9	10	1	0
9	З.С.1-1 (P-1)	6	8	9	5	0
10	З.С.1-1 (P-2)	6	8	9	4	0
11	З.С.1-2	6	8	10	1	0
12	З.С.1-3	7	8	9	1	0
13	З.С.1-5	5	6	9	5	0
14	З.С.1-6 (P-1)	5	6	8	1	0
15	З.С.1-6 (P-2)	5	6	8	1	0
16	З.С.1-7	6	6	8	5	0
17	З.С.1-8	5	6	8	3	0
18	З.С.1-11	5	6	9	4	0
19	З.С.1-12 (P-1)	5	6	8	4	0
20	З.С.1-12 (P-2)	5	6	8	4	0
21	З.С.1-13	5	6	9	4	0
22	З.С.1-15 (P-1)	5	6	8	4	0
23	З.С.1-15 (P-2)	5	6	8	4	0

№	Культура	Температура (°С)				
		4	10	18	28	37
24	З.С.1-20 (P-1)	6	6	8	6	0
25	З.С.1-21	7	8	10	4	0
26	З.С.1-23	6	7	8	5	0
27	З.С.1-24	6	8	9	1	0
28	З.С.Б.1 (P-1)	6	7	9	10	0
29	З.С.Б.1 (P-2)	6	7	9	10	0
30	З.С.Б.2 (P-1)	6	7	8	4	0
31	З.С.Б.2 (P-3)	3	4	7	0	0
32	З.С.Б.3	6	7	8	4	0
Грамположительные, оксидазоположительные, каталазоположительные						
1	З.С.1 (желтый) (P-1H)	8	9	10	0	0
2	З.С.1 (желтый) (P-1P)	8	9	10	5	0
Грамотрицательные, оксидазоположительные, каталазоположительные						
1	З.С.1-4	7	8	9	1	0
2	З.С.1-9	7	8	9	10	1
3	З.С.1-16	7	8	9	1	0
4	З.С.1-19 (P-1)	7	9	10	1	0
5	З.С.1-19 (P-2)	6	8	9	10	1
6	З.С.1-26	9	9	10	10	1
7	З.С.2 (20°)-1	8	10	10	10	1
8	З.С.2 (20°)-2	9	10	10	10	1
9	З.С.2 (5°)-1	8	10	10	10	1
10	З.С.2 (5°)-2	8	9	9	10	1
11	З.С.Б.2 (P-2)	4	6	4	0	0
Грамотрицательные, оксидазоотрицательные, каталазоположительные						
1	З.С.1-20 (P-2)	6	7	8	7	0

Примечание. Обозначения: «0» – отсутствие роста; «1–2» – слабый рост по штриху; «3–4» – уверенный рост по штриху без образования изолированных колоний; «5–6» – рост с образованием мелких колоний диаметром 0,5–1,0 мм; «7–8» – рост с образованием колоний диаметром 1,5–2,0 мм; «9–10» – рост с образованием колоний диаметром 2,5 мм и более.

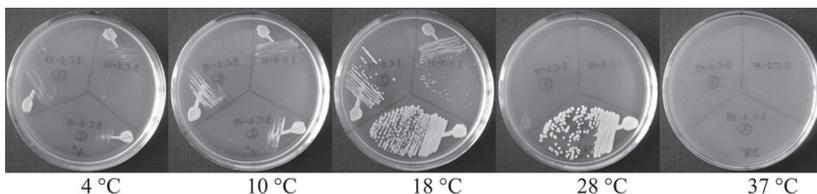


Рис. 2. Фотографии культур микроорганизмов, выделенных из «зеленого снега» Восточной Антарктиды, выращенных при различных температурах

Подобные результаты были ожидаемы, поскольку, согласно данным литературы, экологические ниши криофилов достаточно узкие – толщи ледников, глубины морей и океанов [18, 19], гораздо чаще в низкотемпературных местообитаниях встречаются психротрофные микроорганизмы, которые могут расти в более широком диапазоне температур, но высокоактивны при низких температурах. Психротрофные бактерии живут близко к поверхности Земли и приспособились к годовым изменениям температуры. В теплое время года они показывают быстрый рост (оптимум от 22 до 30 °C), но способны расти и в холодных условиях (2–15 °C), когда другие организмы неактивны [20, 21]. Схожие результаты получены группой украинских исследователей, которые показали, что 40–70% микроорганизмов, выделенных из различных биотопов Антарктиды, являются психротолерантными и способны расти в широком температурном диапазоне (1–30 °C), понижение температуры культивирования приводит к увеличению продолжительности лаг фазы роста антарктических бактерий, однако не влияет на уровень продукции биомассы [22].

Видовую идентификацию бактерий, выделенных из «зеленого снега», осуществляли с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии. Данный метод, основанный на сравнительном анализе белковых профилей (так называемое прямое белковое профилирование), зарекомендовал себя как относительно дешевый, быстрый и надежный способ определения таксономической принадлежности микроорганизмов, в том числе трудно культивируемых в лабораторных условиях [23, 24].

На основании данных MALDI-TOF масс-спектрометрии идентифицировано 16 исследуемых культур бактерий, из которых 10 культур отнесено к классу *Actinobacteria* (4 – виду *Arthrobacter psychrolactophilus*, 3 – *Arthrobacter stackebrandtii*, 1 – *Arthrobacter oxydans*, 2 – *Rhodococcus erythropolis*), 6 культур – к классу *Gammaproteobacteria* (2 – к виду *Pseudomonas antarctica*, 2 – *Pseudomonas fragi*, 1 – *Pseudomonas fluorescens*, 1 – *Pseudomonas veronii*). Для 30 выделенных бактериальных культур видовую принадлежность установить не удалось (табл. 2).

Таблица 2. Результаты идентификации бактериальных культур, выделенных из «зеленого снега» прибрежной зоны Восточной Антарктиды методом MALDI-TOF MS

Культура	Таксономическая принадлежность
Кластер 1 (6 изолятов)	
З.С.1-1 (P-1); З.С.1-1 (P-2); З.С.2; З.С.1; З.С.Б.2 (P-1); З.С.Б.3	Не идентифицированы
Кластер 2 (4 изолята)	
З.С.5 (P-2); З.С.1-4; З.С.1-16; З.С.1-19 (P-1)	Не идентифицированы
Кластер 3 (7 изолятов)	
З.С.3 (P-2); З.С.1 (зеленый); З.С.1-5; З.С.1-8; З.С.1-11; З.С.1-13; З.С.1-23	Не идентифицированы
Кластер 4 (7 изолятов)	
З.С.1-9	<i>Pseudomonas fragi</i> (1.819)
З.С.1-19 (P-2)	<i>Arthrobacter oxydans</i> (1.994)
З.С.1-26	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (2.240)
З.С.2 (20°)-1	<i>Pseudomonas antarctica</i> (2.023)
З.С.2 (5°)-2	<i>Pseudomonas fragi</i> (1.968)
З.С.Б.2 (P-2); З.С.Б.2 (P-3)	Не идентифицированы
Кластер 5 (6 изолятов)	
З.С.1 (желтый) (P-1Н)	<i>Arthrobacter psychrolactophilus</i> (1.700)
З.С.1 (желтый) (P-1Р)	<i>Arthrobacter psychrolactophilus</i> (1.820)
З.С.1 (желтый) (P-2)	<i>Arthrobacter stackebrandtii</i> (1.800)
З.С.1-3	<i>Arthrobacter stackebrandtii</i> (1.797)

Культура	Таксономическая принадлежность
З.С.5 (P-1)	Не идентифицированы
З.С.1-21	<i>Arthrobacter stackebrandtii</i> (1.870)
Кластер 6 (7 изолятов)	
З.С.1-6 (P-1); З.С.1-6 (P-2); З.С.1-15 (P-1); З.С.1-15 (P-2); З.С.1-12 (P-1); З.С.1-12 (P-2); З.С.1-20 (P-1)	Не идентифицированы
Отдельные изоляты (9 изолятов)	
З.С.1-2	<i>Arthrobacter psychrolactophilus</i> (1.715)
З.С.1-24	<i>Arthrobacter psychrolactophilus</i> (1.796)
З.С.2 (20°)-2	<i>Pseudomonas veronii</i> (1.800)
З.С.2 (5°)-1	<i>Pseudomonas antarctica</i> (2.207)
З.С.Б.1 (P-1)	<i>Rhodococcus erythropolis</i> (2.383)
З.С.Б.1 (P-2)	<i>Rhodococcus erythropolis</i> (2.259)
З.С.3 (P-1); З.С.1-7; З.С.1-20 (P-2)	Не идентифицированы

Примечание. Обозначения: 1.700...1.999 – недостоверная идентификация; 2.000...2.299 – достоверная идентификация до рода; 2.300...3.000 – достоверная идентификация до вида [12].

Известно, что идентификация микроорганизмов с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии базируется на попарном сравнении пиков в спектре исследуемого образца с пиками эталонных спектров, находящихся в базе данных. Этот метод позволяет быстро и надежно идентифицировать микроорганизмы, для которых получены «стандартизированные» спектры белковых профилей, и не подходит для определения таксономической принадлежности микроорганизмов, белковые профили которых отсутствуют в доступных базах данных. Сложность идентификации бактериальных культур, выделенных из «зеленого снега», вероятно, обусловлена тем, что база данных эталонных спектров, используемая «Bruker Daltonics», содержит преимущественно белковые профили микроорганизмов, важных для медицины и пищевой промышленности [23, 24], а профили «редких» микроорганизмов в ней практически не представлены. В таком случае

ценность метода MALDI-TOF масс-спектрометрии для определения таксономической принадлежности антарктических микроорганизмов в настоящее время все еще невелика и данный подход может, в лучшем случае, использоваться для их предварительной идентификации. В частности, получаемые белковые профили могут служить основой для группировки микробных культур, характеризующихся максимальным сходством спектров клеточных белков и с большой вероятностью относящихся к одному таксону родового или видового уровня.

С помощью статистического анализа методом главных компонент культуры бактерий, выделенные из «зеленого снега», на основании подобию MALDI-TOF MS спектров были объединены в шесть кластеров (табл. 2, рис. 3). Кластеры 1, 2, 3, 6 включали не идентифицированные культуры бактерий, кластер 5 объединял пять культур бактерий рода *Arthrobacter* и одну не идентифицированную культуру, в то время как кластер 4 состоял из четырех псевдомонад, двух неидентифицированных культур и одного представителя рода *Arthrobacter*, что является довольно странным. Еще девять анализируемых культур имели уникальные белковые профили и не относились к определенному кластеру. Интересен факт, что в эту «группу» попали представители родов *Arthrobacter* и *Pseudomonas*, формирующие кластеры 5 и 4 соответственно, а также несколько штаммов бактерий рода *Rhodococcus*.

Одной из задач, успешно решаемой с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии в клинической микробиологии, является внутривидовая дифференциация бактерий. Данный подход продемонстрировал высокую разрешающую способность для выявления внутривидовых различий представителей родов *Stenotrophomonas*, *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Listeria* [25]. Результаты сравнительного анализа белковых профилей культур бактерий, выделенных из «зеленого снега», подтвердили сведения литературы о перспективности применения MALDI-TOF масс-спектрометрии для дифференциации микроорганизмов уровне штаммов, поскольку для всех культур были получены индивидуальные штаммоспецифичные спектры.

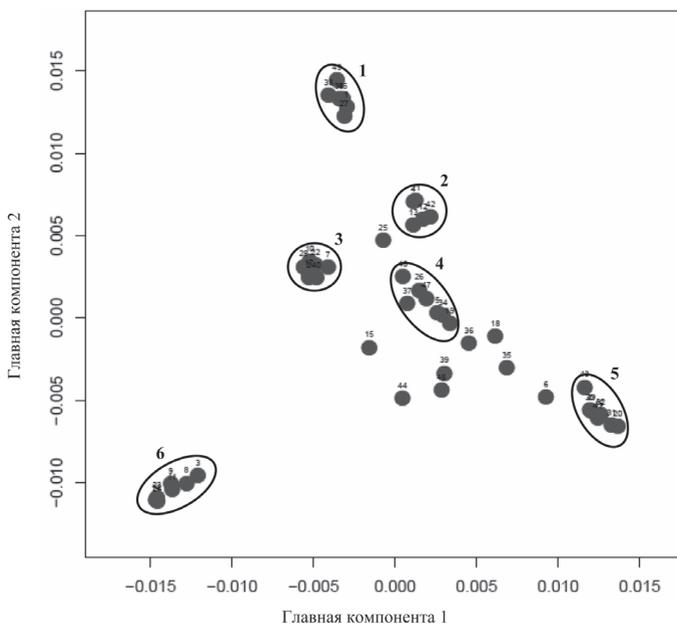


Рис. 3. Результаты анализа сходства MALDI-TOF MS спектров клеточных белков бактериальных культур, выделенных из «зеленого снега», методом главных компонент

Для подтверждения видовой принадлежности исследуемых бактериальных культур, установленной на основании данных MALDI-TOF масс-спектрометрии, проведена молекулярно-генетическая идентификация четырех культур – 3.C.2 (5°)-2, 3.C.1 (желтый) (P-1H), 3.C.1 (желтый) (P-1P), 3.C.2 (20°)-2. По результатам сравнительного анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рПНК штаммы *Pseudomonas antarctica* 3.C.2 (5°)-2, *Pseudomonas veronii* 3.C.2 (20°)-2 идентифицированы как *Pseudomonas* sp., штаммы *Arthrobacter psychrolactophilus* 3.C.1 (желтый) (P-1H), 3.C.1 (желтый) (P-1P) – как представители филогенетически близкого вида *Arthrobacter psychrochitiniphilus*. Полученные данные свидетельствуют, что метод MALDI-TOF масс-спектрометрии клеточных белков обеспечивает надежную родовую идентификацию культур антарктических микроорганизмов.

низмов, однако для определения их видовой принадлежности необходимо применять методы геносистематики.

Психрофильные микроорганизмы привлекают пристальное внимание исследователей как потенциальные продуценты новых ферментов и биологически активных веществ, перспективных для использования в производственных процессах, включая сельское хозяйство, химическую промышленность, фармацевтику. Из антарктических бактерий, принадлежащих к роду *Arthrobacter*, выделены β -галактозидазы с низкотемпературным оптимумом работы, которые могут применяться в новых технологических процессах. Из почвы и воды Антарктиды изолированы бактерии, синтезирующие щелочную фосфатазу, протеазу, ксиланазу, липазу, и ряд других ферментов, представляющих интерес для биохимии и прикладной биотехнологии [1–3].

Проведен скрининг выделенных культур микроорганизмов на наличие ферментативных активностей, которые потенциально могут использоваться в биотехнологии (табл. 3).

Таблица 3. Ферментативная активность микроорганизмов, выделенных из «зеленого снега» Восточной Антарктиды

Культура	Протеаза	Амилаза	Целлюлаза	ДНКаза	Липаза	
					твин-20	твин-80
З.С.1	–	+	+	–	+	–
З.С.2	–	+	+	–	+	–
З.С.3 (P-1)	–	–	–	–	–	+
З.С.3 (P-2)	–	–	–	–	–	–
З.С.5 (P-1)	–	–	–	–	+	+
З.С.5 (P-2)	–	–	–	–	–	–
З.С.1 (зеленый)	–	–	–	–	+	–
З.С.1 (желтый) (P-1Н)	–	–	–	–	–	–
З.С.1 (желтый) (P-1Р)	–	–	–	–	+	+
З.С.1 (желтый) (P-2)	–	+	–	–	+	+
З.С.1-1 (P-1)	–	–	+	–	+	–
З.С.1-1 (P-2)	–	+	+	–	+	–
З.С.1-2	–	–	–	+	+	+
З.С.1-3	–	–	–	+	+	+

Окончание табл. 3

Культура	Протеаза	Амилаза	Целлюлаза	ДНКаза	Липаза	
					твин-20	твин-80
З.С.1-4	–	–	–	–	+	+
З.С.1-5	–	–	–	–	–	–
З.С.1-6 (P-1)	–	–	–	–	–	–
З.С.1-6 (P-2)	–	–	–	–	–	–
З.С.1-7	–	–	–	–	+	+
З.С.1-8	–	–	–	–	–	–
З.С.1-9	–	–	–	+	+	+
З.С.1-11	–	–	–	–	–	–
З.С.1-12 (P-1)	–	–	–	–	–	–
З.С.1-12 (P-2)	–	–	–	–	–	–
З.С.1-13	–	–	–	–	–	–
З.С.1-15 (P-1)	–	–	–	–	–	–
З.С.1-15 (P-2)	–	–	–	–	–	–
З.С.1-16	–	–	–	–	+	+
З.С.1-19 (P-1)	–	–	–	–	+	+
З.С.1-19 (P-2)	+	–	–	+	+	+
З.С.1-20 (P-1)	–	–	–	–	–	–
З.С.1-20 (P-2)	–	–	–	–	+	+
З.С.1-21	–	–	–	–	+	+
З.С.1-23	–	–	–	–	–	–
З.С.1-24	–	–	–	–	+	–
З.С.1-26	+	–	–	+	+	+
З.С.2 (20°)-1	+	–	–	+	+	+
З.С.2 (20°)-2	+	–	–	+	+	+
З.С.2 (5°)-1	+	–	–	+	–	+
З.С.2 (5°)-2	+	–	–	+	–	–
З.С.Б.1 (P-1)	–	–	–	–	+	+
З.С.Б.1 (P-2)	–	–	–	–	+	+
З.С.Б.2 (P-1)	–	+	+	–	+	–
З.С.Б.2 (P-2)	–	–	–	–	+	+
З.С.Б.2 (P-3)	–	–	–	–	–	–
З.С.Б.3	–	+	+	–	+	–

Примечание. «+» – наличие активности; «–» – отсутствие активности.

Липазной активностью обладали более 50% исследуемых бактерий, при этом отмечена специфичность их липолитических ферментов в отношении гидролизуемых субстратов. Протеолитическая, амилолитическая и целлюлолитическая активности обнаружены у 6 культур, ДНКазная активность – у 9 культур, ни одна из исследуемых культур не проявляла пектолитической активности. Среди анализируемых бактерий 5 культур продуцировали как целлюлазы, так и амилазы, 2 культуры – протеазы и ДНКазы, 2 культуры – протеазы, ДНКазы и липазы. Особенности биосинтеза, физико-химические свойства, температурные оптимумы работы и перспективы биотехнологического применения ферментов, обнаруженных у выделенных культур антарктических бактерий, еще предстоит изучить.

Заключение. Охарактеризованы морфологические и физиолого-биохимические признаки 46 культур бактерий, выделенных из «зеленого снега» прибрежных областей Восточной Антарктиды, на основании которых 34 культуры отнесены к филумам *Firmicutes* и *Actinobacteria*, 12 культур – к филуму *Proteobacteria*. С использованием метода MALDI-TOF масс-спектрометрии определена таксономическая принадлежность 16 бактериальных культур, из которых 10 культур идентифицированы как представители класса *Actinobacteria*, родов *Arthrobacter* и *Rhodococcus*, 6 культур – класса *Gammaproteobacteria*, рода *Pseudomonas*, 20 выделенных культур идентифицировать не удалось. Для всех исследуемых культур бактерий получены индивидуальные штаммоспецифичные белковые профили, на основании сходства которых выделено шесть кластеров, объединяющих представителей филогенетически близких таксонов. При изучении температурного диапазона роста выделенных культур антарктических микроорганизмов установлено, что они растут в диапазоне температур 4–28 °С, оптимум роста 10–18 °С, и являются психротрофами. Проведен скрининг выделенных культур микроорганизмов на наличие ферментативных активностей, которые потенциально могут использоваться в биотехнологии, выявлены перспективные продуценты протеаз, амилаз, целлюлаз, ДНКаз и липаз.

Работа выполнена в рамках дополнительного раздела «Микробиологический анализ и консервация изолятов, выделенных

из объектов на территории Восточной Антарктиды, включая образцы донных отложений пресных водоемов, микрофлоры снежного покрова, эндолитных и гиполитных сообществ, мелкозема с повышенным содержанием нефтепродуктов, фрагментов останков животных, целлюлозосодержащих материалов и ряда других объектов» задания 3.22 «Молекулярно-генетическая идентификация, таксономическая ревизия и характеристика культур микроорганизмов из фонда Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов» ГПНИ «Фундаментальные основы биотехнологий» (2011–2015 гг.).

Литература

1. Feller, G. Psychrophilic enzymes: from folding to function and biotechnology / G. Feller // Scientifica. – 2013. – Vol. 2013 – P. 512840.
2. Demonstration of antifreeze protein activity in Antarctic lake bacteria / J. A. Gilbert [et al.] // Microbiol. Read. Engl. – 2004. – Vol. 150, N 1 – P. 171–180.
3. Purification and characterization of thermo-labile alkaline phosphatase from an Antarctic psychrotolerant *Bacillus* sp. P9 / R. K. Dhaked [et al.] // Enzyme Microb. Technol. – 2005. – Vol. 36, N 7 – P. 855–861.
4. *Algoriphagus antarcticus* sp. nov., a novel psychrophile from microbial mats in Antarctic lakes / S. Van Trappen [et al.] // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2004. – Vol. 54, N 6 – P. 1969–1973.
5. *Psychrobacter vallis* sp. nov. and *Psychrobacter aquaticus* sp. nov., from Antarctica / S. Shivaji [et al.] // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2005. – Vol. 55, N 2 – P. 757–762.
6. Sattley, W. M. Isolation, characterization, and ecology of cold-active, chemolithotrophic, sulfur-oxidizing bacteria from perennially ice-covered Lake Fryxell, Antarctica / W. M. Sattley, M. T. Madigan // Appl. Environ. Microbiol. – 2006. – Vol. 72, N 8 – P. 5562–5568.
7. Garrison, D. L. Sea ice microbial communities in Antarctica: these communities may provide an important food resource in deep-water pelagic systems / D. L. Garrison, C. W. Sullivan, S. F. Ackley // BioScience. – 1986. – Vol. 36, N 4 – P. 243–250.
8. Carpenter, E. J. Bacterial activity in South Pole snow / E. J. Carpenter, S. Lin, D. G. Capone // Appl. Environ. Microbiol. – 2000. – Vol. 66, N 10 – P. 4514–4517.
9. Microbes in High Arctic snow and implications for the cold biosphere / T. Harding [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 2011. – Vol. 77, N 10 – P. 3234–3243.
10. Snow surface microbiome on the High Antarctic Plateau (DOME C) / L. Michaud [et al.] // PloS One. – 2014. – Vol. 9, N 8 – P. e104505.
11. Практикум по микробиологии / А. И. Нетрусов [и др.]. – М.: Издательский центр «Академия», 2005. – 608 с.
12. MALDI Biotyper CA System [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://www.bruker.com/fileadmin/user_upload/8-PDF-Docs/Separations_MassSpectrometry/Literature/Brochures/MALDI_Biotyper_CA_brochure_03-2015_eBook.pdf. – Дата доступа: 25.02.2016.

13. Jolliffe, I. Principal Component Analysis / I. Jolliffe // Wiley StatsRef: Statistics Reference Online. – John Wiley & Sons, Ltd, 2014.

14. Comparing of the MALDI-TOF spectra [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://www.bio.bsu.by/genetics/files/spectra_similarity.r. – Дата доступа: 25.02.2016.

15. BLAST: Basic Local Alignment Search Tool [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. – Дата доступа: 18.12.2014.

16. Заварзин, Г. А. Введение в природоведческую микробиологию / Г. А. Заварзин, Н. Н. Колотилова. – М.: Книжный дом «Университет», 2001. – 256 с.

17. Бактериальные сообщества в почвах криптогамных пустошей восточной антарктиды (оазисы Ларсеманн и Холмы Тала) / А. Г. Кудинова [и др.] // Почвоведение. – 2015, № 3 – С. 317.

18. Psychrophilic microorganisms: challenges for life / S. D'Amico [et al.] // EMBO Rep. – 2006. – Vol. 7, N 4 – P. 385–389.

19. Morita, R. Y. Psychrophilic bacteria / R. Y. Morita // Bacteriol. Rev. – 1975. – Vol. 39, N 2. – P. 144–167.

20. Hoover, R. B. Psychrophilic and psychrotolerant microbial extremophiles in polar environments / R. B. Hoover, E. V. Pikuta // Polar Microbiology: in 1 vols. – CRC Press, 2009. – P. 115–156.

21. Discovery of large conical stromatolites in Lake Untersee, Antarctica / D. T. Andersen [et al.] // Geobiology. – 2011. – Vol. 9, N 3 – P. 280–293.

22. Диапазон температур для роста антарктических микроорганизмов / В. А. Романовская [и др.] // Микробиол. журн. – 2012. – № 74, N 4 – С. 13–19.

23. Dingle, T. C. MALDI-TOF mass spectrometry for microorganism identification / T. C. Dingle, S. M. Butler-Wu // Clin. Lab. Med. – 2013. – Vol. 33, N 3 – P. 589–609.

24. Biswas, S. Use of MALDI-TOF mass spectrometry for identification of bacteria that are difficult to culture / S. Biswas, J.-M. Rolain // J. Microbiol. Methods. – 2013. – Vol. 92, N 1 – P. 14–24.

25. Применение МАЛДИ времяпролетной масс-спектрометрии для идентификации микроорганизмов / Е. А. Демидов [и др.] // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2015. – Т. 17, № 4/1 – С. 758–764.

V. E. MIAMIN¹, A. V. SIDARENKA¹, L. N. VALETOVICH¹,
Y. G. GIGINIAK², G. I. NOVIK¹, E. I. KOLOMIETS¹

CHARACTERIZATION OF MICROORGANISMS, ISOLATED FROM GREEN SNOW OF COASTAL AREAS OF EAST ANTARCTICA

¹*Institute of Microbiology, National Academy of Sciences, Minsk, Belarus, vladmiamin@mail.ru, collection@mbio.bas-net.by*

²*State Scientific and Production Amalgamation*

«The Scientific and Practical Center for Bioresources», Minsk, Belarus

Morphological and physiological-biochemical properties of 46 microbial cultures isolated from «green snow» of coastal areas of East Antarctica were studied. Using MALDI-TOF mass-spectrometry taxonomic affiliation of 16 cultures was established, among them 10 cultures were identified as representatives of class

Actinobacteria, genera *Arthrobacter* and *Rhodococcus*, 6 cultures – class *Gamma-proteobacteria*, genus *Pseudomonas*, 20 cultures were not reliably identified. For analyzed antarctic bacterial cultures individual strain-specific protein profiles were obtained, based on similarity of which six clusters gathering representatives of phylogenetic close taxa were distinguished. It was shown that analyzed cultures grow in temperature range 4–28 °C, optimal temperature 10–18 °C, and may be regarded as thermophiles. Based on results of antarctic microbial cultures screening for production of biotechnologically important enzymes, potential producers of proteases, amylases, cellulases, DNAses, lipases were discovered.

Поступила 25.04.2016 г.

УДК 579.222.3+579.864.+579.873.13

*И. А. НАЙДЕНКО, В. В. ДЕНИСЕНКО, М. Е. САФОНОВА,
Е. А. СЕМЕНЧУКОВА, Н. А. ГОЛОВНЕВА*

**ПРОДУКЦИЯ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ
И ГЛИКОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ
ПРИ РАЗДЕЛЬНОМ И СОВМЕСТНОМ
КУЛЬТИВИРОВАНИИ МОЛОЧНОКИСЛЫХ
И БИФИДОБАКТЕРИЙ**

*Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
microbio@mbio.bas-net.by*

Изучены накопление биомассы, продукция связанных с клеточной поверхностью протеолитических, пептидазных и гликолитических ферментов при раздельном и совместном культивировании бактерий родов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*. Выявлено увеличение накопления биомассы, отсутствие негативного влияния на продукцию ферментов протеолитического комплекса и некоторое снижение накопления гликолитических ферментов при совместном культивировании по сравнению с раздельным выращиванием исследуемых микроорганизмов.

Введение. Как важные представители микробиоценоза желудочно-кишечного тракта человека и животных молочнокислые и бифидобактерии до настоящего времени остаются одними из наиболее часто используемых микроорганизмов в ветеринарной практике и медицине в качестве основы препаратов про- и пре-