

УДК 631.4; 579.26

## ИССЛЕДОВАНИЕ ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ГЕТЕРОТРОФНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ ИЗ ПОЧВ, СФОРМИРОВАННЫХ НА ОЗЕРНЫХ ОТЛОЖЕНИЯХ ПРИОЛЬХОНЬЯ

Лопатовская О.Г.<sup>1</sup>, Середкина А.А.<sup>1</sup>, Белькова Н.Л.<sup>1,2</sup>, Хадеева Е.Р.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>ГОУ ВПО Иркутский государственный университет, Иркутск, Россия (664003, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 1), e-mail: lopatovs@gmail.com

<sup>2</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Лимнологический институт СО РАН, г. Иркутск, Россия (664033, г. Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3), e-mail: nlbelkova@gmail.com

<sup>3</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт географии СО РАН, г. Иркутск, Россия (664033, г. Иркутск, ул. Улан-Баторская, 1), e-mail: war\_ker@mail.ru

**В Восточной Сибири регосо́ль является интразональной почвой. Регосо́ль в степях Приольхонья (Предбайкалье) сформирована на поверхности Таготского гидролакколита под влиянием криогенных факторов, эоловых процессов, грунтовых и озерных вод. Почвы характеризуются как засоленные, карбонатные, насыщенные обменными основаниями, обогащенные органическим веществом. С разных глубин регосо́ли по профилю гидролакколита выделены гетеротрофные микроорганизмы и изучены их физиолого-биохимические свойства. Показано, что все культуры утилизировали широкий спектр сахаров, некоторых спиртов и продуцировали ферменты: каталазу, лецитиназу, амилазу и протеазу. Наличие множественной ферментативной активности у проанализированных штаммов предполагает их высокий метаболический потенциал.**

Ключевые слова: Таготский гидролакколит, Приольхонье, регосо́ль, почвы, микроорганизмы, внеклеточные ферменты, молекулярно-генетическая идентификация.

## INVESTIGATION OF PHISIOLOGO-BIOCHEMICAL PROPERTIES OF HETEROTROPHIC MICROORGANISMS FROM THE SOIL FORMED IN LAKE DEPOSITS OF PRIOLKHONIE

Lopatovskaya O.G.<sup>1</sup>, Seredkina A.A.<sup>1</sup>, Belkova N.L.<sup>1,2</sup>, Khadeeva E.R.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Irkutsk State University, Irkutsk, Russia (664003, Irkutsk, K. Marks Str., 1) e-mail: lopatovs@gmail.com

<sup>2</sup>Limnological Institute SB RAS, Irkutsk, Russia (664033, Irkutsk, Ulan-Batorskaya Str., 3), e-mail: nlbelkova@gmail.com

<sup>3</sup>V.B. Sochava Institute of Geography SB RAS, Irkutsk, Russia (664033, Irkutsk, Ulan-Batorskaya Str., 1)

**Regosol is intrazonal soil in Eastern Siberia. Regosol in the steppes of Olkhon region is formed on the surface of Tagotskij hydrolaccolith when affected by the cryogenic factors, aeolians, and groundwater and/or lake water. These soils are characterized as saline, carbonated, saturated exchangeable bases, and enriched with organic matter. Heterotrophic microorganisms were isolated from different depths along the profile of the hydrolaccolith. Their physiological and biochemical properties were studied. It was shown that all strains are able to utilize a wide range of sugars, alcohols and produce extracellular enzymes: catalase, lecithinase, amylase, and protease. The presence of multiple enzymatic activity by the analyzed strains suggests their high metabolic potential.**

Keywords: Tagotskij hydrolaccolith, Olkhon region, regosol, soil, microorganisms, extracellular enzymes, molecular identification.

Регосо́ль – грубая минеральная почва, формирующаяся на почвообразующих породах разной степени выветрелости, со слабо дифференцированным неполно развитым профилем и слабо выраженным гумусовым горизонтом. В Восточной Сибири она является интразональной почвой и встречается среди каштановых почв, солончаков и солонцов. В степном Приольхонье на абсолютных высотах от 557 до 675 м компактно, группируясь в цепочки, расположены соленые озера, вокруг которых формируются засоленные почвы – солончаки. Вокруг Таготского гидролакколита – одного из самых южных в Прибайкалье

фрагментов реликтовой вечной мерзлоты – имеются два озера термокарстового происхождения. Располагаясь рядом, они незначительно различаются по минерализации и компонентному составу воды, что объясняется различной степенью метаморфизации питающих их атмосферных осадков и подземных вод. Имеются единичные сведения о Таготском гидролакколите в работах геологов, археологов и палеоолимиологов при описании геологических отложений и при палеореконструкциях климата [2]. Для этого в конце прошлого столетия определяли некоторые физико-химические характеристики грунтов, были попытки выявить особенности эволюции озерных отложений, но при этом не дано описание почвы и не выявлены ее свойства [5; 7]. В настоящее время стало возможным обновить имеющиеся данные с целью получения более детальной характеристики уникальной для региона почвы с использованием современных методов исследований.

Почвенные микробные сообщества – уникальные системы, характеризующиеся целым спектром биогеохимических функций. Они играют важную роль в круговороте веществ, почвообразовании и формировании плодородия почв и представлены большим разнообразием форм: прокариотами (бактерии, актиномицеты, сине-зелёные водоросли) и эукариотами (грибы, микроскопические водоросли, простейшие). Используя современные методы и подходы, удастся изолировать новые виды микроорганизмов, различающиеся по своим физиолого-биохимическим свойствам: оптимуму pH, отношению к температуре, осмотическому давлению, используемым источникам органических и неорганических веществ. Учитывая, что почвы содержат большое количество органического вещества различного происхождения, исследования свойств гетеротрофных микроорганизмов представляют несомненный интерес [8].

Цель данной работы – описать физико-химические свойства регосоли в Приольхонье; провести идентификацию и изучить биотехнологический потенциал гетеротрофных микроорганизмов, выделенных из регосоли.

#### **Материал и методы исследования**

Почвенные пробы отбирали в мае 2011 г. с поверхности до глубины 110 см через каждые 10 см и хранили при температуре 20 °С до проведения дальнейших экспериментов.

Выполняли анализ следующих физико-химических свойств: pH, электропроводность, содержание обменных оснований, оксидов марганца и кремния, органических углерода и азота, карбонатов. Кислотность определяли на потенциометре (Эксперт-pH) при соотношении почвы к воде – 1:2,5; с 0,01M CaCl<sub>2</sub> – 1:2,5; электропроводность – 1:10; водная вытяжка при соотношении почвы к воде 1:5; карбонаты – газометрическим методом на приборе С-МАТ 550РС с разложением карбонатов 40% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>; обменные катионы Ca, Mg, K,

Na – ацетатно-аммонийным методом на ICP; C и N методом сжигания на VarioMax CNS-Analysators (CN-Betrieb).

Учет численности гетеротрофных микроорганизмов проводили с использованием питательных сред: NSY (г/л: питательный бульон – 1,0, соевый пептон – 1,0, дрожжевой экстракт – 1,0, агар – 15,0), LB:10 (г/л: триптон – 1,0, дрожжевой экстракт – 0,5, агар – 15,0), TSA (HiMedia, Индия), PCA (HiMedia, Индия). Культивирование вели при 20 °С. Учет общей численности гетеротрофных микроорганизмов (ОЧГМ) проводили на 3 и 7 сутки. Для изоляции культур делали стандартные пересевы из отдельно выросших колоний, чистоту проверяли визуально и микроскопическим контролем. Фенотипическое описание колоний проводили с помощью светового микроскопа (Микмед Р-13-2, Россия) при увеличении  $\times 10$ . Для описания колоний учитывали следующие признаки: форму, размер (диаметр), цвет, край, блеск, прозрачность, профиль. Морфологические свойства изучали микроскопированием мазков, отмечали форму микробных клеток, наличие спор, их расположение, тинкториальные свойства. Для исследуемых культур изучали ферментацию сахаров и спиртов на средах Гисса, определяли наличие каталазы [6]. Ферментативную активность определяли на селективных питательных средах по зонам просветления (в мм) вокруг укола. Культуры анализировали на наличие амилалитической, протеолитической, лецитиназной, липолитической и фосфатазной активности [6]. Идентификацию культур проводили молекулярно-генетическим методом [1].

### **Результаты и обсуждение**

Описание морфологических признаков почвы сделано в лабораторно-полевых условиях и дает представление об ее формировании в гидроморфных условиях (табл. 1). Химический анализ почвы позволил охарактеризовать содержание основных элементов, распределение веществ в почвенном профиле, аккумуляцию и миграцию органических и минеральных соединений. Карбонаты в основном мучнистые и пропитывают весь профиль. Содержание  $\text{CaCO}_3$  в почве варьирует от 14,52 до 68,17%, причем максимальное количество отмечено в средней части профиля у мерзлого горизонта на глубине 40–70 см, где встречается скопление раковин моллюсков (рис. 1). Вероятно, в средней и нижней части профиля происходило осаждение карбонатов в холодный период эволюции почв. В настоящее время здесь же отмечается максимум легкорастворимых солей, который составляет 1,4%. Идентичное содержание легкорастворимых солей отмечается во всех почвах Приольхонья [3, 4].

### **Таблица 1**

Морфологическое описание почвенного профиля регосоли Таготского гидралаколита

Глубина, см	Морфологическое описание почв
0–10	Темно-серый, пронизан корнями, средний суглинок, сухой, сильно пылит, единично створки моллюсков, агрегаты отчетливой формы, свежий
10–20	Серый, с белесыми пятнами (подтяжка карбонатов при иссушении по трещинам), легкий суглинок, очень плотный, похож на нижележащий, но светлее, малакофауна, пронизан конями, сухой
20–30	Темно-серый, легкий суглинок, утрамбован, не слоистый, единично корни, свежий
30–40	Темно-серый, структура столбчатая, средний суглинок, пронизан корнями, малакофауна, включения слюды, корни залегают между пластинками
40–50	Серый, плотный, более светлый, чем нижний, средний суглинок, пропитан карбонатами, примазки железа по трещинам и ходам единичных корней
50–60	Белесый, плотный, от среднесуглинистого до тяжелосуглинистого, сухой, при высыхании сыпется и пылит, остатки растений
60–70	Темно-серый, плотный, единично проникновение корней по трещинам, почти в горизонтальном направлении, средний суглинок
70–80	Серый, плотный, слоистый (пластинчатый), чешуйчатый, тяжелый суглинок, криогенные шпирь, корни по трещинам
80–90	Продолжение нижнего горизонта, но темнее, структура криогенная, выражена лучше, средний суглинок, уплотненность та же, возможно тот же горизонт, малакофауна округлой формы
90–100	Серый, твердый от мерзлоты, карбонатный, слоистый средний суглинок, фрагменты болотной растительности, выражена криогенная плитчатость, «криоморфная структура», остатки торфяных растений
100–110	Цементированный мерзлотой сизый, вероятно, выпертый глеевый горизонт, охристые примазки, оливковые пятна, средний суглинок, очень плотный от мерзлоты, криогенная плитчатость

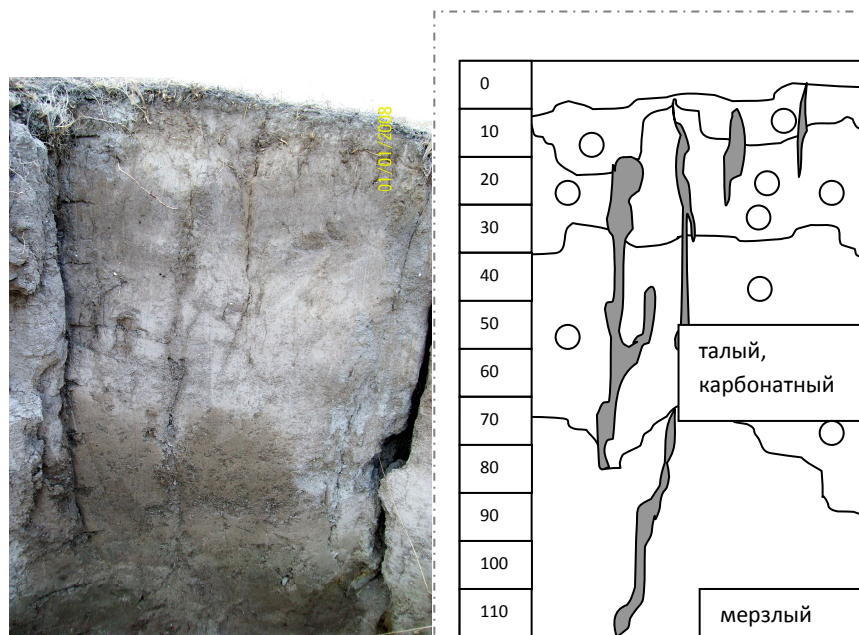


Рис. 1. Схема строения почвенного профиля регосоли Таготского гидролакколита. 0–10 – глубина отбора образцов; ○ – моллюски; β – криогенные трещины; ~ – граница почвенных горизонтов.

pH водной суспензии – от нейтрального (7,7) до щелочного (8,4), изменяется равномерно по профилю с увеличением вниз и обусловлен карбонатами кальция в отсутствии соды (табл. 2).

**Таблица 2**

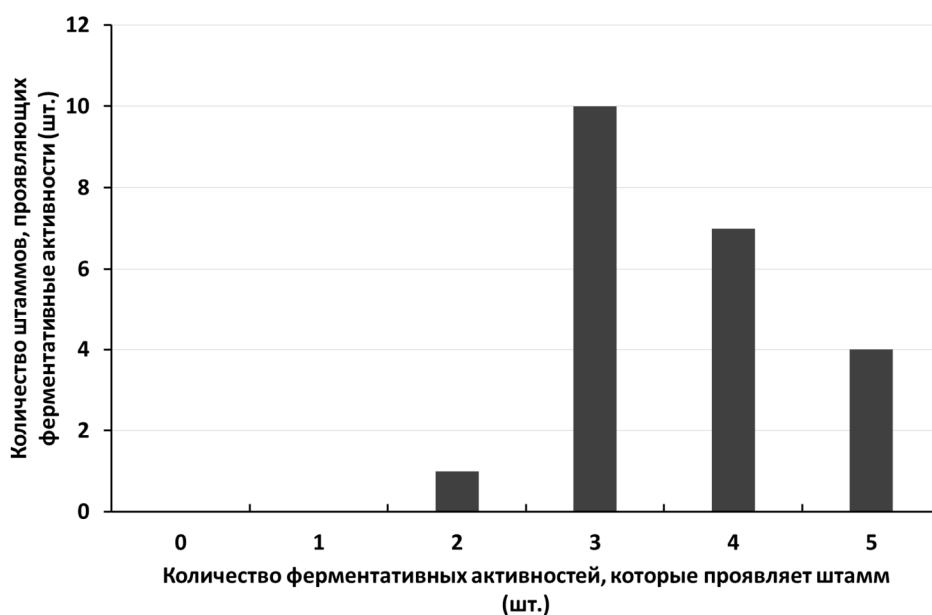
Физико-химические свойства почвы

Глубина, см	pH	Гумус, %	NO <sub>3</sub> , мг/100 г	NH <sub>4</sub> , мг/100 г	Сумма солей, %	С неорг., %	CaCO <sub>3</sub> , %	Электропроводность, мСм/см
0–10	8,48	11,4	36,06	52,72	0,3	5,6	46,98	0,3
10–20	7,90	8,8	158,75	26,00	1,1	4,1	34,23	1,6
20–30	7,93	8,2	664,94	17,47	1,1	6,2	51,70	1,6
30–40	7,96	8,3	796,56	16,58	1,4	6,7	55,45	2,0
40–50	7,76	6,3	473,31	13,68	1,2	7,5	62,89	1,6
50–60	7,77	5,4	129,13	14,89	0,8	8,2	68,17	1,2
60–70	7,82	6,6	40,31	16,18	0,7	7,9	66,22	0,9
70–80	7,99	6,4	25,13	20,04	0,4	7,7	64,38	0,6
80–90	7,99	5,6	24,88	19,64	0,4	6,8	56,52	0,6
90–100	8,30	4,2	23,63	24,71	0,1	4,3	35,51	0,1
100–110	8,16	2,8	25,63	15,70	0,2	1,8	14,52	0,2

Электропроводность, характеризующая общее содержание солей, высокая в верхней и средней частях профиля, буквально до мерзлого горизонта (до 2,0 мСм/см). Образование органического вещества проходило в условиях гидроморфного режима, когда на месте гидролакколита было озеро, эволюционирующее в болото, о чем свидетельствует погребенный «торфянистый», точнее, погребенный «сапропелевый» горизонт. Содержание органического вещества высокое и уменьшается по профилю сверху вниз (8,33–1,77%) до почвообразующей породы. Азота не более 0,73% вверху и 0,11% внизу профиля. Соотношение углерода к азоту изменяется с глубиной от 18,8 до 30,6, почва слабо обогащена азотом. Высокое содержание общего углерода связано с углеродом неорганическим. Доля неорганического углерода от 1 до 8%, что вероятно обусловлено карбонатностью отложений, наличием донного сапропеля. Нитратная и аммонийная формы азота – показатель обеспеченности почв органическими соединениями. Нитраты сосредоточены в средней части профиля, где залегает погребенный органогенный горизонт (до 796 мг/100 г), внизу резко уменьшаются (23 мг/100 г), за счет отсутствия органики в карбонатных отложениях. Аммоний присутствует в почве в виде водорастворимых солей и содержание его равномерно по профилю (13–25 мг/100 г). Содержание обменных оснований высокое по всему профилю. Среди обменных катионов кальция (до 80 ммоль/100г) преобладает над магнием (до 48 ммоль/100 г почвы), оба этих катиона входят в состав карбонатных почвообразующих пород. Колебания соотношений обменных катионов обусловлено близким залеганием грунтовых вод.

Исследование распределения ОЧГМ по профилю гидролакколита позволило выявить два пика численности на глубинах 20 и 60–80 см, которые хорошо коррелируют с содержанием общего и неорганического углерода. Органический углерод служит основным питательным субстратом для гетеротрофных микроорганизмов. Падение их численности на глубине 40 см связано, очевидно, с наличием здесь высокого содержания солей, которые угнетают рост в естественной среде обитания.

Большинство проанализированных культур гетеротрофных микроорганизмов имели круглую форму колоний с выпуклым профилем и диаметром от 1 до 4 мм. Колонии четырех культур были белого, непрозрачного цвета, остальные – кремового. Культуры К5-1, К5-2 и К5-3 продуцировали коричневый пигмент на 4 сутки. По морфологии клеток идентифицированы одиночные грамтрицательные палочки, которые варьировали по длине от 0,5 до 2 мкм. Результаты тестирования на физиолого-биохимическую активность показали, что 5 из 11 протестированных культур, К6, К8, К9-1, К10 и К16-1 способны утилизировать большинство сахаров и некоторые спирты. Все проанализированные культуры утилизировали глюкозу, сахарозу и практически все фруктозу. Внутриклеточной каталазой обладают все изученные штаммы, кроме К6. Результаты тестирования на наличие внеклеточной ферментативной активности показали высокий метаболический потенциал у проанализированных культур (рис. 2). Так, все культуры обладали лецитиназной и амилазной активностью, а протеолитическую проявляли только по гидролизу казеина. Фосфатазная активность за сутки была выявлена для 5 из 11 штаммов, К5-1, К5-2, К5-3, К9 и К16-1. Изученные штаммы идентифицированы как *Bacillus* spp. и *Brevibacillus* spp. Наличие множественной ферментативной активности у гетеротрофных микроорганизмов предполагает их высокую адаптационную способность утилизировать субстраты разного типа. Ранее нами было показано, что гетеротрофные бактерии, изолированные из нейстонной пленки оз. Байкал или глубинных слоев, преимущественно проявляют не более двух ферментативных активностей. В то время как гетеротрофы из биопленочных ассоциаций, сформированных на твердых субстратах, из донных осадков озера проявляют широкий спектр ферментативных активностей.



*Рис. 2. Представленность штаммов гетеротрофных микроорганизмов, проявляющих множественную ферментативную активность и изолированных из регосоли Таготского гидролакколита*

**Заключение.** Химизм почвы определяется составом элементов в почвообразующей породе и донном сапропеле. В исследуемой почве отмечается высокое содержание легкорастворимых солей, карбонатов, обменных кальция и магния, неорганического углерода и органического вещества. По сумме солей почва относится к засоленным, так как сумма солей превышает 1 %.

Таким образом, с разных глубин регосоли по профилю Таготского гидролакколита выделено 11 штаммов гетеротрофных микроорганизмов. Исследование физиолого-биохимических свойств показало, что все культуры утилизировали широкий спектр сахаров, некоторых спиртов и продуцировали ферменты: каталазу, лецитиназу, амилазу и протеазу. Наличие множественной ферментативной активности у проанализированных штаммов предполагает их высокий метаболический потенциал.

*Работа частично выполнена при финансовой поддержке РФФИ № 13-04-00614-а, РФФИ-Сибирь № 14-44-04105.*

### Список литературы

1. Белькова Н.Л. Молекулярно-генетические методы анализа микробных сообществ // Разнообразие микробных сообществ внутренних водоемов России: учеб.-метод. пособие. Отв. ред. А.М. Андреева. – Ярославль: Принтхаус, 2009. – С. 53–63.

2. Воробьева Г.А. Таготский гидролакколит // Почва как связующее звено функционирования природных и антропогенно-преобразованных экосистем. Путеводитель экскурсии III Международной научно-практической конференции, посвященной 80-летию кафедры почвоведения Иркутского государственного университета (16–22 августа 2011 г.) / отв. ред. Г.А. Воробьева. – Иркутск: ОТ «Перекресток», 2011. – С. 37–40.
3. Лопатовская О.Г., Кондратьева Г.В., Людвиг Д. Педо-гало-геохимические особенности засоленных почв соленых озер острова Ольхон. Депонированная рукопись ВИНТИ. № 195-V2006 27.02.2006. ГРНТИ: 611.01.91. – 10 с.
4. Лопатовская О.Г., Самойлова Е.А. Физико-химические свойства засоленных почв Приольхонья. Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2014621359. 2014.
5. Мац В.Д., Уфимцев Г.Ф., Манельбаум М.М. и др. Кайнозой Байкальской рифтовой впадины. Строение и геологическая история. – Новосибирск: Изд-во СО РАН, фил. «Гео», 2001. – 250 с.
6. Нетрусов А.И., Егорова М.А., Захарчук Л.М. Практикум по микробиологии: учеб. пособие для студ. вузов. – М.: Академия, 2005. – 608 с.
7. Попова С.М., Мац В.Д., Черняева Г.П. и др. Палеолимнологические реконструкции. Байкальская рифтовая зона. – Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние, 1989. – 111 с.
8. Lopatovskaya O., Seredkina A., Belkova N. Effect of ecological factors on the distribution of microorganisms in regosols (steppe of Priol'khonie, Siberia). // Acta Geol Sin-Engl. – 2014. – Vol. 88, № 1. – P. 188-190.

**Рецензенты:**

Беликов С.И., д.б.н., профессор, зав. лаб. аналитической биоорганической химии, ФГБУН Лимнологический институт Сибирского отделения РАН, г. Иркутск;

Тахтеев В.В., д.б.н., профессор, зав. лаб. экологии и байкаловедения, Научно-исследовательский институт биологии Иркутского государственного университета, г. Иркутск.