

Актуальные проблемы развития пищевых и биотехнологий

УДК 574.589

DOI: 10.14529/food210101

СКРИНИНГ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ДОННЫХ ОТЛОЖЕНИЙ ОЗЕРА БАЙКАЛ

О.О. Бабич^{1,2}, С.А. Сухих^{1,2}, Е.В. Ульрих³, М.А. Шевченко¹,
С.Ю. Носкова¹, М.И. Зими́на¹, А.Ю. Просеков²

¹ Балтийский федеральный университет им. И. Канта, г. Калининград, Россия

² Кемеровский государственный университет, г. Кемерово, Россия

³ Кузбасская государственная сельскохозяйственная академия, г. Кемерово, Россия

Озеро Байкал расположено во внутриконтинентальной рифтовой зоне на юге центральной Сибири. Это самое глубокое озеро в мире, содержащее самый большой объем жидкой пресной воды в одном водоеме. Микробные сообщества Байкала могут обладать значительной биомассой и образуют так называемые микробные маты. Целью данной работы является скрининг и идентификация микроорганизмов, выделенных из донных отложений озера Байкал. Проведен скрининг микроорганизмов. Изоляты микроорганизмов получали следующим образом: для выделения ДНК из анализируемых образцов использовался метод экстракции фенолом/хлороформом и очистки раствором цетил-триметил аммонийбромида. Дифференцировку бактерий по биохимическим свойствам их клеточной стенки проводили по Граму. Генетическое разнообразие выделенных микроорганизмов исследовали с помощью Random Amplified Polymorphic DNA-анализа с использованием праймера Lmbd – GGGCGCTG. В результате проведенных исследований из микробных сообществ донных отложений озера Байкал выделено 7 изолятов, различных по морфологическим признакам. Установлено, что среди палочковидных бактерий представлены как грамположительные (изолят 1), так и грамотрицательные (изоляты 2, 3, 4, 6, 7) формы. Доказана видовая принадлежность микроорганизмов: изолят 1 – *Bacillus megaterium*, изолят 2 – *Pseudomonas fluorescens*, изолят 3 – *Pseudomonas putida*, изолят 4 – *Pseudomonas aeruginosa*, изолят 5 – *Micrococcus luteus*, изолят 6 – *Pseudomonas oleovorans*, изолят 7 – *Acinetobacter calcoaceticus*. Изучение микроорганизмов донных отложений озера Байкал приведет к лучшему пониманию основных биологических процессов, таких как структура и функция мембран или структура белков в условиях низкой ионной силы.

Ключевые слова: микроорганизмы, озеро Байкал, морфология, генетическое разнообразие, идентификация, изоляты.

Введение

Озеро Байкал расположено во внутриконтинентальной рифтовой зоне на юге центральной Сибири. Это самое глубокое озеро в мире, содержащее самый большой объем жидкой пресной воды в одном водоеме – 23 000 км³. Морфологически это озеро состоит из трех глубоких котловин, разделенных подводными горными хребтами. Южный и центральный бассейны имеют самые глубокие точки (1461 и 1642 м соответственно). Присутствие кислорода на самых больших глубинах – черта, присущая океанам, но уникальная среди глубоких озер (>800 м), объясняет присутствие многоклеточной жизни и эволюцию обширной, в основном эндемичной фауны вплоть до самых глубоких участков озера.

Время полного восстановления воды в озере Байкал приближается к 400 годам, что довольно много для озера и также напоминает океанические водоемы [1].

Воды Байкала слабоминерализованные; общие концентрации растворенных солей составляют примерно 0,1 г/л, что резко контрастирует с океанами, содержащими ок. 35 г/л.

Озеро Байкал также олиготрофно, и биогенные элементы в поверхностных слоях рециркулируются примерно четыре раза, прежде чем оседают в глубокие воды. Все эти особенности вместе с большим расстоянием до ближайших морских вод (около 1800 км до Охотского моря, северо-запад Тихого океана) делают озеро Байкал парадигмой континентального пресноводного тела, во многом по-

хожего на океан, за исключением резко пониженной солености. Однако это единственная кислородная система, сопоставимая с солеными водами океана с точки зрения крайней олиготрофности и больших глубин. Другие кислородные озера, такие как Кратерное озеро (США), имеют глубину <1000 м. С другой стороны, озера с глубиной > 1000 м, такие как Танганьика (африканские озера), бескислородны. Однако лишь недавно озеро Байкал было использовано в качестве модели для изучения различий с океаном и изучения предполагаемых переходов в микробном сообществе [2]. Поскольку общепринято считать, что жизнь появилась в соленых морских водах, что подтверждается важной ролью одновалентных катионов натрия и калия во всех живых клетках, Байкал представляет собой идеальный полигон для изучения адаптации микробов к жизни в минеральных солях (особенно в условиях отсутствия натрия). Отличительные особенности гидрологии и гидрохимии Байкала (а именно его большая глубина, длительный период ледового покрова, низкие температуры поверхностных вод даже летом, стабильные температуры у дна, высокие концентрации кислорода на всех глубинах и низкие концентрации биогенных элементов) сделали это озеро очень своеобразной средой для его обитателей, включая микробные сообщества [3]. Микроорганизмы, населяющие эти экстремальные условия, должны иметь гибкий метаболизм и ферментативные системы, подходящие для конкретных условий озера Байкал. Кроме того, Байкал остался относительно нетронутым, в основном из-за низкой плотности населения вокруг его бассейна. Однако, как и любой другой большой экосистеме на Земле, она находится под угрозой глобального (изменение климата) и местного (промышленное и туристическое развитие вдоль ее берегов) антропоного давления, что делает ее изучение срочно необходимостью [4].

Быстрое опускание воды из освещаемой зоны приводит к обогащению глубоких слоев водной толщи не только кислородом и питательными веществами, но также прокариотами и мелкими эукариотами. Во время подледного периода изменение солености во время замерзания льда вызывает конвекцию и турбулентность в водном слое, прилегающем ко льду. Этот механизм интенсивно запускается в начале-середине марта и постепенно охватывает водный слой толщиной 20–50 м [5].

Концентрации биогенных элементов (азота, фосфора и кремния) в поверхностных и придонных водах подвержены сезонным колебаниям, вызванным потреблением и регенерацией биотических веществ в верхних слоях, а также уникальными процессами придонного водообмена. С другой стороны, в основном водоеме между приблизительно 300 м под поверхностью и 100 м над дном концентрации биогенных элементов мало изменяются ни с глубиной, ни с сезоном. В летний период преобладает пикопланктон, продукция которого сопоставима с производством диатомовых водорослей весной и осенью. Тем не менее, только около 10 % биомассы пикопланктона достигает дна, остальная часть деградирует в освещаемой зоне. Воды притоков Байкала отличаются от самого озера по физическим параметрам, содержанию взвешенных веществ, химическому составу, а также качественному и количественному составу фито- и бактериопланктона [6].

В озере Байкал автотрофный пикопланктон также является одним из основных первичных продуцентов. Летом он в основном состоит из цианобактерий, присутствие и преобладание которых отмечается в трофогенном слое [7].

По отношению к температуре микроорганизмы, как известно, подразделяют на психрофилов (оптимальная температура роста ≤ 15 °C), мезофилов ($T_{\text{опт}} \approx 37$ °C), термофилов ($T_{\text{опт}} > 50$ °C) и гипертермофилов ($T_{\text{опт}} > 80$ °C). Термофильные микроорганизмы, встречающиеся чаще, чем гипертермофильные, представлены различными видами бактерий, включая фотосинтетические (цианобактерии, пурпурные и зеленые бактерии), энтеробактерии (*Bacillus*, *Clostridium* и др.), тионовые (*Thiobacillus*) и археи (*Pyrococcus*, *Thermococcus*, *Sulfolobus*, метаногены) [8].

Традиционно, для характеристики состава микробных сообществ используются микробиологические методы, предполагающие получение чистых культур микроорганизмов с последующей микробиологической и биохимической характеристикой [9]. Позднее стали применяться молекулярные методы, основанные на ПЦР-амплификации фрагментов генов 16S рРНК и их секвенировании, которые показали, что в лабораторных условиях удается культивировать не более 0,1–5 % видов микроорганизмов. Альтернативой традиционным методам секвенирования, которые предпола-

гают клонирование фрагментов генов 16S рРНК и независимое секвенирование отдельных клонов, является метод пиросеквенирования, дающий возможность проведения единовременного определения не нескольких десятков, а нескольких сот тысяч нуклеотидных последовательностей [10].

Структура и функциональное разнообразие микробного сообщества минеральных источников во многом зависят от химического состава вод и пород. Содержание акцепторов электронов, биогенных элементов и веществ в минеральной воде оказывает влияние на формирование состава микробного сообщества и его активность [11]. Синтезируемое фототрофными и хемолитотрофными микроорганизмами автохтонное органическое вещество подвергается аэробной и анаэробной деструкции. Тесные трофические взаимоотношения между различными группами микроорганизмов позволяют им эффективно участвовать в трансформации органических и неорганических веществ подземных вод, что обусловлено их огромным биохимическим потенциалом и большой численностью [12].

Микробные сообщества в источниках могут обладать значительной биомассой и образовывать так называемые микробные маты. В них взаимодействуют представители разных трофических групп микроорганизмов, осуществляющих полный цикл биогенных элементов. Микробные сообщества гидротерм можно разделить на два типа: с доминированием фототрофных микроорганизмов и с доминированием хемотрофных микроорганизмов. Хемотрофные сообщества часто развиваются в виде обрастаний. Граница между фототрофными и хемотрофными сообществами определяется, по-видимому, устойчивостью фотосинтетического аппарата к факторам окружающей среды, в первую очередь к температуре. Ведущая роль в формировании сообщества принадлежит фототрофным микроорганизмам. В настоящее время цианобактериальные маты встречаются, в основном, в биотопах, где сохранились экстремальные условия [13].

Важным фактором, влияющим на распространение микробного сообщества, является температура. С уменьшением температуры состав фототрофного сообщества азотных гидротерм расширяется. Рядом авторов было показано, что в составе фототрофных микробных сообществ щелочных гидротерм Байкальской рифтовой зоны присутствуют циа-

нобактерии и аноксигенные фототрофные бактерии (АФБ). Вместе с тем, исследования филогенетического разнообразия микроорганизмов в термальных местообитаниях показывают, что большое число термофильных микроорганизмов до сих пор не получено в лабораторных культурах, и, следовательно, их свойства неизвестны. Среди новых термофильных прокариот активно выделяются микроорганизмы, относящиеся к относительно новому роду *Anoxybacillus*, с новыми, биотехнологически привлекательными свойствами [14].

Целью данной работы является скрининг и идентификация микроорганизмов, выделенных из донных отложений озера Байкал.

1. Объекты и методы исследований

Материалом для выделения чистых культур экстремофильных (психрофильных) микроорганизмов послужили донные осадки озера Байкал, отобранные в прибрежной зоне (г. Слюдянка, п. Листвянка, п. Култук, рис. 1) в мае-июне 2020 года. Температура всех образцов донных осадков при отборе проб составляла $(4,0 \pm 0,5)$ °С. Отобранные образцы помещали в стерильные чашки Петри и замораживали.

Для выделения колоний микроорганизмов образцы донных осадков измельчали в стерильных условиях и небольшой кусочек (примерно 5 г) растирали по поверхности чашки с агаризованной питательной средой. Инкубировали чашки и пробирки стационарно в течение 3 суток.

Выделение и культивирование бактерий рода *Bacillus* проводили на питательной среде состава (г/л): пептический перевар животной ткани – 10,0, настой говядины – 500,0, натрия хлорид – 5,0, агар-агар – 25,0. Температура культивирования 37 °С.

Выделение и культивирование бактерий рода *Pseudomonas* проводили на питательной среде состава (г/л): пептон – 10,0, дрожжевой экстракт – 5,0, натрия хлорид – 10,0, K_2HPO_4 – 1,5. Температура культивирования 30 °С.

Выделение и культивирование бактерий рода *Micrococcus* проводили на питательной среде состава (г/л): гидролизат казеина – 1,8, дрожжевой экстракт – 2,7, натрий хлористый – 0,2. Температура культивирования 37 °С.

Выделение и культивирование бактерий рода *Acinetobacter* проводили на питательной среде состава (г/л): панкреатический перевар казеина – 1,0, пепсиновый перевар мяса – 0,5,



Рис. 1. Места отбора проб донных отложений

дрожжевой экстракт – 1,0, крахмал – 0,5, настой говядины – 5,0. Температура культивирования 30 °С.

Изоляты микроорганизмов получали следующим образом: для выделения ДНК из анализируемых образцов использовался метод экстракции фенолом/хлороформом и очистки раствором СТАВ (цетил-триметил аммонийбромид).

В ходе изучения фенотипических свойств микроорганизмов определяли цвет, форму, консистенцию, структуру, поверхность, характер контура края.

Основной метод изучения морфологии бактерий – микроскопия фиксированных окрашенных препаратов. Микроскопирование проводили с использованием микроскопа биологического AxioScopeA1 («CarlZeiss», Гёттинген, Германия).

Дифференцировку бактерий по биохимическим свойствам их клеточной стенки проводили по Граму с использованием набора для окраски по Граму («Лаб-Биомед», Москва, Россия). Суть метода заключается в том, что клеточная стенка грамположительных бактерий прочно фиксирует генцианвиолет, не обесцвечивается этанолом и потому не воспринимает дополнительный краситель (фуксин). У грамотрицательных микроорганизмов генцианвиолет легко вымывается из

клетки этанолом, и они окрашиваются дополнительным красителем.

Окраску спор бактерий проводили по Шефферу-Фултону. Сущность метода заключается в комбинированном действии концентрированного раствора красителя бриллиантового зеленого и температуры на малопроницаемую оболочку спор с дальнейшим обесцвечиванием цитоплазмы вегетативной клетки и ее контрастным докрасиванием сафранином. При микроскопировании споры окрашиваются в зеленый цвет, а клетки – в красный.

Наличие жгутиков устанавливают путем исследования культур на подвижность в препаратах «раздавленная капля».

Молекулярное типирование методом RAPD-PCR. Выделение ДНК микроорганизмов проводили с использованием набора реагентов «ПРОБА-НК» для выделения ДНК из биологического материала («ДНК-технология», Москва, Россия).

Генетическое разнообразие выделенных микроорганизмов исследовали с помощью RAPD анализа (Random Amplified Polymorphic DNA) с использованием праймера Lmbd – GGGCGCTG.

Электрофорез в агарозном геле проводили с применением камеры для горизонтального электрофореза SE-2 с источником питания «Эльф-4» («Хеликон», Москва, Россия). Для

приготовления 2 %-ной агарозы к 1 г агарозы добавляли 50 мл однократного буфера TBE и тщательно перемешивали. Полученный раствор помещали в микроволновую печь (на 2–5 мин в зависимости от мощности печи, следили за интенсивностью кипения суспензии) или кипятили на водяной бане в течение 15 мин до полного растворения агарозы. Расплавленную агарозу охлаждали до 56 °С и добавляли 5 мкл бромистого этидия (концентрация 10 мг/мл), тщательно перемешивали. Расплавленную агарозу с бромистым этидием разливали в подготовленную форму. Толщина геля составляла 0,5–0,7 см. Через 30–40 мин удаляли гребенку. Готовый гель использовали сразу или хранили в однократном буфере в холодильнике при 4 °С. Для проведения электрофореза смешивали в отдельной пробирке 2 мкл буфера для нанесения и 10 мкл реакционной смеси. Вносили смесь в лунки геля (соотношение буфер/реакционная смесь – 2/8). В одну из лунок вносили маркер молекулярной массы (100 Вр). Помещали заполненный гель в камеру для электрофореза, заполненную буфером. Толщина слоя буфера над поверхностью геля составляла примерно 2–3 мм. В режиме постоянного напряжения 100 В электрофорез длился примерно 70–90 мин. Для проверки достоверности получаемых результатов в одну из лунок помещали 100 п.н. ДНК-маркер («Сибэнзим», Новосибирск, Россия). Состав буфера для хранения: 10 mM Tris HCl (pH 8,0); 1 mM ЭДТА; 50 mM NaCl.

Полимеразную цепную реакцию проводили с использованием праймеров, специально подобранных и синтезированных фирмой «Синтол» (Москва, Россия). Температурный режим подбирали с учетом длины амплифицированного фрагмента, длины и состава используемых праймеров.

2. Результаты и их обсуждение

В результате проведенных исследований из микробных сообществ донных отложений озера Байкал выделено 7 изолятов, различных по морфологическим признакам (см. таблицу).

Из таблицы следует, что из семи выделенных изолятов шесть из них представляют собой палочковидные бактерии, а один изолят – бактерии сферической формы (кокки). Среди палочковидных бактерий представлены как грамположительные (изолят 1), так и грамотрицательные (изоляты 2, 3, 4, 6, 7) формы.

Простота внешней формы микроорганизмов и строения их клетки делает классифика-

цию по морфологическим признакам затруднительной. В этой связи дополнительную информацию о видовой принадлежности микроорганизмов, выделенных из донных отложений озера Байкал, получали с использованием метода молекулярного типирования с использованием RAPD (метод анализа полиморфизма амплифицированных фрагментов ДНК).

Метод RAPD-PCR основан на использовании коротких произвольных олигонуклеотидных праймеров длиной 9–10 пар нуклеотидов, которые гибридизуются с ДНК-мишенью при низкой температуре отжига. Суть метода заключается в амплификации случайных последовательностей ДНК-мишени с одного праймера, для которого неизвестно, где на ДНК мишени он имеет участки гомологии и сколько их. В данном методе стадия рестрикции амплификатов отсутствует, поскольку в процессе амплификации синтезируются фрагменты разной длины, которые разделяют электрофорезом в агарозном геле и анализируют полученные электрофореграммы.

Метод RAPD-PCR обладает высокой чувствительностью и позволяет дифференцировать близкородственные виды, он прост в исполнении и экономически выгоден. Для его использования не обязательно иметь информацию о строении генома искомого микроорганизма, один протокол можно применять для работы с широким спектром культур. К недостаткам метода отнесется плохая воспроизводимость, так как малейшие изменения условий реакции могут привести к изменению конечного результата.

В данной работе метод RAPD-PCR использовали для генетической идентификации штаммов, выделенных из донных отложений озера Байкал. В качестве праймера использовали праймер Lmbd – GGGCGCTG.

Электрофореграмма фрагментов ДНК, полученных с помощью метода RAPD-PCR с использованием праймера Lmbd, представлена на рис. 2.

Данные рис. 2 свидетельствуют о том, что использование праймера Lmbd приводило к образованию большого количества фрагментов размером от 200 до 5000 п.н. Из рис. 2 следует, что паттерны ПЦР-электрофореграмм разных штаммов выделенных бактерий отличаются друг от друга по количеству и размерам, что позволяет сделать достоверный вывод о различной видовой принадлежности изучаемых микроорганизмов.

Культуральные и морфологические свойства изолятов, выделенных из донных отложений озера Байкал

Номер изолята	Морфология колоний	Микроскопические характеристики
Изолят 1	Колонии плоские, шероховатые, от грязно-белового до желтого цвета, диаметром от 2 до 5 мм	Грамположительные спорообразующие палочки размером 0,5–1,5 мкм с закругленными концами. Располагаются одиночно или в парах, иногда образуют цепочки. При исследовании методом «висячая капля» клетки подвижны
Изолят 2	Колонии плоские, выпуклые, диаметром 1,5–3,0 мм, сероватого цвета	Грамотрицательные палочки, с полярными жгутиками, не спорообразующие. При исследовании методом «висячая капля» клетки подвижны
Изолят 3	Колонии круглые, плоские, гладкие, непрозрачные, диаметром 2–3 мм, белые, с неровными краями	Грамотрицательные палочки (прямые или изогнутые), спор не образуют. При исследовании методом «висячая капля» клетки подвижны
Изолят 4	Колонии выпуклые, неправильной формы, бежевые	Грамотрицательные палочки (прямые или слегка изогнутые), спор не образуют. При исследовании методом «висячая капля» клетки подвижны
Изолят 5	Колонии округлые, блестящие, гладкие, непрозрачные, желтого цвета	Грамположительные бактерии сферической формы, расположены попарно или цепочками, спор не образуют
Изолят 6	Колонии гладкие, с ровными краями, выпуклые, однородной консистенции, диаметром 5 мм, светло-кремового цвета	Грамотрицательные палочки. При исследовании методом «висячая капля» клетки подвижны
Изолят 7	Колонии круглые, мелкие, блестящие, с ровным краем, бесцветные	Грамотрицательные толстые, прямые палочки, располагаются парами или цепочками, спор и жгутиков не образуют

На основании анализа рис. 2 сделали вывод о видовой принадлежности микроорганизмов, выделенных из донных отложений озера Байкал: изолят 1 – *Bacillus megaterium*, изолят 2 – *Pseudomonas fluorescens*, изолят 3 – *Pseudomonas putida*, изолят 4 – *Pseudomonas aeruginosa*, изолят 5 – *Micrococcus luteus*, изолят 6 – *Pseudomonas oleovorans*, изолят 7 – *Acinetobacter calcoaceticus*.

Проводили сопоставление полученных нами результатов с результатами других исследований. В работе [15] были исследованы пробы донных отложений, отобранные в районе Посольской банки озера Байкал. Таксономическое распределение данных о последовательности 16S рРНК показало, что преобладающими последовательностями в пробах были *Sphingomonas* (55,3 %), *Solirubrobacter* (27,5 %) и *Arthrobacter* (16,6 %).

Исследование микробного сообщества озе-

ра Байкал методами общей и молекулярной микробиологии [16] показало, что культивируемые штаммы бактерий представлены различными известными родами. Вода в озере содержит большое количество бактериальных морфотипов, выявленных с помощью электронной микроскопии, и большое разнообразие некультивируемых микроорганизмов, принадлежащих к разным филогенетическим группам, что выявлено при секвенировании фрагмента гена 16S рРНК. Сделан вывод о том, что микробное сообщество озера Байкал включает не только известные виды, но и новые виды бактерий, которые, возможно, являются эндемичными для озера. Культуры гетеротрофных бактерий озера Байкал были признаны принадлежащими к родам *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Escherichia*, *Flavobacterium*, *Xanthomonas*, *Corynebacterium* и *Vibrio*.

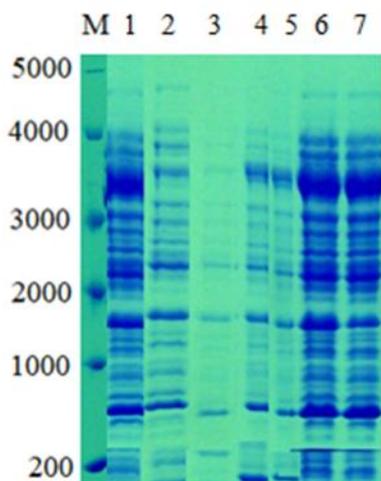


Рис. 2. Электрофореграмма фрагментов ДНК, полученных с помощью метода RAPD-PCR: М – маркер GeneRuler DNA Ladder Mix; 1 – *Bacillus megaterium* (изолят 1), 2 – *Pseudomonas fluorescens* (изолят 2), 3 – *Pseudomonas putida* (изолят 3), 4 – *Pseudomonas aeruginosa* (изолят 4), 5 – *Micrococcus luteus* (изолят 5), 6 – *Pseudomonas oleovorans* (изолят 6), 7 – *Acinetobacter calcoaceticus* (изолят 7)

В работе [17] исследовались донные отложения озера Байкал. Используя морфологические и биохимические признаки, а также 16S фрагменты рРНК длиной от 416 до 1455 п.н., все культивированные бактериальные сообщества (всего 110 штаммов) отнесены к *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Nocardia*, *Planococcus*, *Pseudomonas*, *Rhodotorula*, *Vibrio*, *Xanthomonas* и *Zoogloea*.

Представленные в работах [15–17] данные совпадают с результатами, полученными нами. Как и в данных исследованиях, нами обнаружены микроорганизмы, выделенные из донных отложений озера Байкал, относящиеся к родам *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Micrococcus* и *Acinetobacter*. Преимущество наших исследований заключается в том, что идентификацию микроорганизмов проводили с помощью электрофореграмм фрагментов ДНК, полученных с помощью метода RAPD-PCR. Данный метод является точным, незатратным и эффективным при идентификации микроорганизмов, выделенных из донных отложений озера Байкал. Однако при сопоставлении на-

ших исследований с исследованиями в работах [15–17] установлено меньшее разнообразие видов микроорганизмов в прибрежной зоне г. Слюдянка, п. Листвянка, п. Култук. Там не обнаружены *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Flavobacterium*, *Nocardia*, *Planococcus*, *Rhodotorula*, *Vibrio*, *Xanthomonas* и *Zoogloea*.

Выводы

В данной работе проведен скрининг и идентификация микроорганизмов, выделенных из донных отложений озера Байкал. В результате проведенных исследований из микробных сообществ донных отложений озера Байкал выделено 7 изолятов, различных по морфологическим признакам. Установлено, что среди палочковидных бактерий представлены как грамположительные (изолят 1), так и грамотрицательные (изоляты 2, 3, 4, 6, 7) формы. Доказана видовая принадлежность микроорганизмов: изолят 1 – *Bacillus megaterium*, изолят 2 – *Pseudomonas fluorescens*, изолят 3 – *Pseudomonas putida*, изолят 4 – *Pseudomonas aeruginosa*, изолят 5 – *Micrococcus luteus*, изолят 6 – *Pseudomonas oleovorans*, изолят 7 – *Acinetobacter calcoaceticus*

В заключение следует отметить, что озеро Байкал уникально во многих смыслах и может предоставить уникальное представление о том, как функционирует экология крупных пресноводных водоемов в высоких широтах и в какой степени они могут подвергаться антропогенному воздействию. Микробиом озера Байкал также может быть богатым источником новых микробов, ферментов и биоактивных соединений для биотехнологии, отличаюсь от других микробов своей способностью управлять своей физиологией с чрезвычайно небольшими количествами основных биологических катионов, таких как Na, Ca и Mg. Они также могут быть ключом к пониманию роли этих важных компонентов физиологии клетки и привести к лучшему пониманию основных биологических процессов, таких как структура и функция мембран или структура белков в условиях низкой ионной силы.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-34-70004/19 от 21.11.2019)

Литература/References

1. Bychkov I.V., Gagarinova O.V., Orlova I.I., Bogdanov V.N. Water Protection Zoning as an Instrument of Preservation for Lake Baikal. *Water*, 2018, 10, p. 1474. DOI: 10.3390/w10101474.
2. Suslova M.Yu., Grebenshchikova V.I. Water quality monitoring of the Angara River source. *Limnology and Freshwater Biology*, 2020, vol. 4, pp. 1040–1041. DOI: 10.31951/2658-3518-2020-A-4-1040.
3. Shevchenko M.A., Suhih C.S., Bulgakova O.M. Analysis of psychrophilic microbiota of lake Baikal sediments. The strategies of modern science development. *Proceedings of the XVII International scientific-practical conference*. Morrisville, USA, 10–11 April 2019, pp. 20–23.
4. Axenov-Gribanov D.V., Kostka D.V., Vasilieva U.A., Shatilina Zh.M., Krasnova M.E., Pereliaeva E.V., Zolotovskaya E.D., Morgunova M.M., Rusanovskaya O.O., Timofeyev M. Cultivable Actinobacteria First Found in Baikal Endemic Algae Is a New Source of Natural Products with Antibiotic Activity. *International Journal of Microbiology*, 2020, vol. 4, pp. 1–13. DOI: 10.1155/2020/5359816.
5. Pavlova O.N., Adamovich S.N., Novikova A.S., Gorshkov A.G., Izosimova O.N., Ushakov I.A., Oborina E.N., Mirskova A.N., Zemskaya T.I. Protatranes, effective growth biostimulants of hydrocarbon-oxidizing bacteria from Lake Baikal, Russia, *Biotechnology Reports*, 2019, vol. 24, pp. e00371. DOI: 10.1016/j.btre.2019.e00371.
6. Hafenbradl D. *Ferroglobus placidus* gen. nov., sp. nov., a novel hyperthermophilic archaeum that oxidizes Fe²⁺ at neutral pH under anoxic conditions. *Arch Microbiol.*, 2016, vol. 166, pp. 308–314.
7. Robles-Porchas G.R., Gollas-Galván T., Martínez-Porchas M., Martínez-Cordova L.R., Miranda-Baeza A., Vargas-Albores F., The nitrification process for nitrogen removal in biofloc system aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 2020, vol. 12, no. 4, pp. 2228–2249. DOI: 1210.1111/raq.12431.
8. Lang S.Q., Früh-Green G.L., Bernasconi S.M., Brazelton W.J., Schrenk M.O., McGonigle J.M. Deeply-sourced formate fuels sulfate reducers but not methanogens at Lost City hydrothermal field. *Sci Rep.*, 2018, vol. 15, no. 8(1), p. 755. DOI: 10.1038/s41598-017-19002-5. PMID: 29335466.
9. Al-Dhabaan F.A. Morphological, biochemical and molecular identification of petroleum hydrocarbons biodegradation bacteria isolated from oil polluted soil in Dhahran, Saud Arabia. *Saudi J Biol Sci.*, 2019, vol. 26, no. 6, pp. 1247–1252. DOI: 10.1016/j.sjbs.2018.05.029. Epub 2018 May 31. PMID: 31516354.
10. Ivanov AV, Demonterova EI. Tectonics of the Baikal rift deduced from volcanism and sedimentation: a review oriented to the Baikal and Hovsgol lake systems. *Prog Mol Subcell Biol.*, 2009, vol. 47, no. 27–54. DOI: 10.1007/978-3-540-88552-8_2. PMID: 19198772.
11. Verkhovtseva N.V., Shekhovtsova N.V., Ryzhikova I.A., Rodionova T.A., Kondakova G.V. Bacilli of the deep subterranean biosphere. *9th international conference on bacilli.*, Lausanne (Switzerland), 2017, p. 176.
12. Zemskaya T.I., Cabello-Yeves P.J., Pavlova O.N. Microorganisms of Lake Baikal – the deepest and most ancient lake on Earth. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2020, vol. 104, pp. 6079–6090. DOI: 10.1007/s00253-020-10660-6.
13. Sukhanova E.V., Suslova M.Yu., Zimens E.A. Identification of heterotrophic phosphate and silica solubilizing bacterial strains isolated from Lake Baikal. V-th Baikal Symposium on Microbiology. *Microorganisms and Viruses in Water Ecosystems*. September 10, 2020. (BSM-2020). <http://www.lin.irk.ru/bsm2020/en/>.
14. Bukin S.V., Pavlova O.N., Manakov A.Y., Kostyreva E.A., Chernitsyna S.M., Mamaeva E.V., Pogodaeva T.V., Zemskaya T.I. A The Ability of Microbial Community of Lake Baikal Bottom Sediments Associated with Gas Discharge to Carry Out the Transformation of Organic Matter under Thermobaric Conditions. *Front Microbiol.*, 2016, vol. 7, pp. 690. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00690. PMID: PMC4861714.
15. Cabello-Yeves P.J., Zemskaya T.I., Zakharenko A.S., Sakirko M.V., Ivanov V.G., Ghai R., Rodriguez-Valera F. Microbiome of the deep Lake Baikal, a unique oxic bathypelagic habitat. *Limnology and Oceanography*, 2019, vol. 65, no. 7. DOI: 10.1002/lno.11401.
16. Belkova N., Parfenova V.V., Kostornova T.Ya., Denisova L.Ya., Zaichikov E.F. Microbial Biodiversity in the Water of Lake Baikal. *Microbiology*, 2003, vol. 72, no. 2, pp. 203–213. DOI: 10.1023/A:1023224215929.
17. Zemskaya T., Cabello-Yeves P.J., Pavlova O., Rodriguez-Valera F. Microorganisms of Lake Baikal – the deepest and most ancient lake on Earth. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, vol. 104, no. 1. DOI: 10.1007/s00253-020-10660-6.

Бабич Ольга Олеговна, доктор техн. наук, доцент, директор института живых систем, Балтийский федеральный университет им. И. Канта (г. Калининград); Кемеровский государственный университет (г. Кемерово), OOBabich@kantiana.ru

Сухих Станислав Алексеевич, канд. техн. наук, доцент, заведующий лабораторией, Балтийский федеральный университет им. И. Канта (г. Калининград); Кемеровский государственный университет (г. Кемерово), SSukhikh@kantiana.ru

Ульрих Елена Викторовна, доктор техн. наук, профессор кафедры агробиотехнологий, Кузбасская государственная сельскохозяйственная академия (г. Кемерово), elen.ulrich@mail.ru

Шевченко Маргарита Андреевна, младший научный сотрудник, Балтийский федеральный университет им. И. Канта (г. Калининград), lionsorcieri@gmail.com

Носкова Светлана Юрьевна, канд. техн. наук, научный сотрудник, Балтийский федеральный университет им. И. Канта (г. Калининград), SNoskova@kantiana.ru

Зими́на Мария Игоревна, канд. техн. наук, научный сотрудник, Балтийский федеральный университет им. И. Канта (г. Калининград), mariia.zimina@list.ru

Просеков Александр Юрьевич, доктор техн. наук, профессор РАН, заведующий кафедрой «Бионанотехнология», Кемеровский государственный университет (г. Кемерово), aprosekov@rambler.ru

Поступила в редакцию 18 ноября 2020 г.

DOI: 10.14529/food210101

SCREENING AND IDENTIFICATION OF MICROORGANISMS ISOLATED FROM BOTTOM SEDIMENTS OF LAKE BAIKAL

O.O. Babich^{1,2}, S.A. Sukhikh^{1,2}, E.V. Ulrikh³, M.A. Shevchenko¹,
S.Yu. Noskova¹, M.I. Zimina¹, A.Yu. Prosekov²

¹ Baltic Federal University named after I. Kanta, Kaliningrad, Russian Federation

² Kemerovo State University, Kemerovo, Russian Federation

³ Kuzbass State Agricultural Academy, Kemerovo, Russian Federation

Lake Baikal is located in the inland rift zone in the south of central Siberia. It is the deepest lake in the world, containing the largest volume of fresh water in a single body of water. Microbial communities of Lake Baikal can have significant biomass and form the so-called microbial mats. This work aims to screen and identify microorganisms isolated from the bottom sediments of Lake Baikal. Screening of microorganisms was carried out. Isolates of microorganisms were obtained as follows: extraction with phenol/chloroform and purification with a cetyl-trimethyl ammonium bromide solution was used to isolate DNA from the analyzed samples. Bacteria were differentiated according to the biochemical properties of their cell walls by Gram staining. The genetic diversity of the isolated microorganisms was investigated by Random Amplified Polymorphic DNA analysis using the Lmbd – GGGCGCTG primer. The research resulted in isolation of 7 isolates with different morphological characteristics from the microbial communities of Lake Baikal bottom sediments. It was found that among rod-shaped bacteria there are both gram-positive (isolate 1) and gram-negative (isolates 2, 3, 4, 6, 7) forms. The species of microorganisms were determined isolate 1 – *Bacillus megaterium*, isolate 2 – *Pseudomonas fluorescens*, isolate 3 – *Pseudomonas putida*, isolate 4 – *Pseudomonas aeruginosa*, isolate 5 – *Micrococcus luteus*, isolate 6 – *Pseudomonas oleovorans*, isolate 7 – *Acinetobacter calcoaceticus*. The study of microorganisms in the Lake Baikal sediments will lead to a better understanding of basic biological processes such as the structure and function of membranes or the structure of proteins under low ionic strength conditions.

Keywords: microorganisms, Lake Baikal, morphology, genetic diversity, identification, isolate.

Актуальные проблемы развития пищевых и биотехнологий

Olga O. Babich, doctor tech. sci., Associate Professor, Director of the Institute of Living Systems, Baltic Federal University named after I. Kanta, Kaliningrad; Kemerovo State University, Kemerovo, OOBabich@kantiana.ru

Stanislav A. Sukhikh, cand. tech. sci., Associate Professor, Head of Laboratories, Baltic Federal University named after I. Kanta, Kaliningrad; Kemerovo State University, Kemerovo, SSukhikh@kantiana.ru

Elena V. Ulrich, doct. tech. sci., Professor of the Department of Agrobiotechnology, Kuzbass State Agricultural Academy, Kemerovo, elen.ulrich@mail.ru

Margarita A. Shevchenko, Junior Researcher, Baltic Federal University named after I. Kanta, Kaliningrad, lionsorciere@gmail.com

Svetlana Yu. Noskova, cand. tech. sci., Researcher, Baltic Federal University named after I. Kanta, Kaliningrad, SNoskova@kantiana.ru

Maria I. Zimina, cand. tech. sci., Researcher, Baltic Federal University named after I. Kanta, Kaliningrad, mariia.zimina@list.ru

Alexander Yu. Prosekov, doctor. tech. sci., Professor of the Russian Academy of Sciences, Head of the Department of Bionanotechnology, Kemerovo State University, Kemerovo, aprosekov@rambler.ru

Received November 18, 2020

ОБРАЗЕЦ ЦИТИРОВАНИЯ

Скрининг и идентификация микроорганизмов, выделенных из донных отложений озера Байкал / О.О. Бабич, С.А. Сухих, Е.В. Ульрих и др. // Вестник ЮУрГУ. Серия «Пищевые и биотехнологии». – 2021. – Т. 9, № 1. – С. 5–14. DOI: 10.14529/food210101

FOR CITATION

Babich O.O., Sukhikh S.A., Ulrich E.V., Shevchenko M.A., Noskova S.Yu., Zimina M.I., Prosekov A.Yu. Screening and identification of microorganisms isolated from bottom sediments of Lake Baikal. *Bulletin of the South Ural State University. Ser. Food and Biotechnology*, 2021, vol. 9, no. 1, pp. 5–14. (in Russ.) DOI: 10.14529/food210101
