
ВЫДЕЛЕНИЕ И ВИДОВАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ Fe(III)-ВОССТАНАВЛИВАЮЩИХ БАКТЕРИЙ ИЗ ПАХОТНОГО ГОРИЗОНТА ВЫЩЕЛОЧЕННОГО ЧЕРНОЗЕМА

*К.Е. Сахарова, 4 курс, биологический факультет
Научный руководитель – к.б.н., доцент Н.Ю. Пухова
Ярославский государственный университет имени П.Г. Демидова*

Fe(III)-восстанавливающие микроорганизмы обитают повсеместно – в пресноводных и морских отложениях, эстуариях, в подземных средах и почвах. Широкое распространение Fe(III)-редукторов обуславливает их важную роль в анаэробном деструктивном сообществе. Микробное Fe(III)-восстановление в почве может сопровождаться: 1) разложением гуминовых веществ, т.е. снижением почвенного плодородия; 2) вымыванием образующихся ионов Fe^{2+} в нижележащие почвенные горизонты; 3) глеегенезом, что в конечном итоге приводит к деградации почвы.

Целью нашей работы было выделение, видовая идентификация и изучение способности изолированных чистых культур бактерий к Fe(III)-восстановлению.

Для достижения поставленной цели мы решали следующие задачи:

1. Выделение Fe(III)-восстанавливающих бактерий из почвенных образцов чернозема выщелоченного;
2. Изучение морфологических и физиолого-биохимических особенностей выделенных бактерий.
3. Идентификация бактерий по совокупности полученных данных.
4. Изучение способности выделенных штаммов к Fe(III)-восстановлению.

В процессе работы нами было выделено 11 чистых хемоорганогетеротрофных бактериальных культур из пахотного горизонта чернозема выщелоченного (Тамбовская обл., табл. 1).

Девять штаммов (R1, R4, R6, R7, R8, R17, R18, R19, R31) имеют палочковидную форму, штамм R11 представляет собой кокки.

Штамм R26 является плеоморфным, способен принимать форму от коротких до длинных палочек, иногда изогнутых. Из 11 бактериальных культур, 8 окрашиваются по Граму положительно (R1, R4, R6, R7, R11, R17, R18 и R19), 3 – грамотрицательные (R8, R31 и R26). Из 8 грамположительных штаммов, 7 – способны к образованию спор (R1, R4, R6, R7, R17, R18 и R19).

Нами было изучено использование бактериальными культурами семи различных источников углерода: глюкозы, крахмала, целлюлозы,

Таблица 1 Морфологические особенности исследуемых штаммов бактерий

П№ п/п	штамм	морфология	размеры клеток, мкм	наличие спор	окраска по Граму
1	2	3	4	5	6
1.	R1	палочки	0,5-1,0×2,0-4,0	+	+
2.	R4	палочки	0,5-1,0×2,0-4,0	+	+
3.	R6	палочки	0,5-1,0×2,0-4,0 2,0-4,0	+	+
4.	R7	палочки	1,0-1,5×2,0-4,0	+	+
5.	R8	палочки	0,5-1,0×2,0-6,0	-	-
6.	R11	кокки	1,0×1,0 <1,0	-	+
7.	R17	палочки	0,5-1,0×2,0-4,0	+	+
8.	R18	палочки	0,5-1,0×2,0-8,0	+	+
9.	R19	палочки	0,5-1,0×2,0-6,0	+	+
10.	R26	палочки	0,5-1,0×4,0-10,0 4,0-10,0	-	-
11.	R31	палочки	0,5-1,0×2,0-4,0	-	-

ацетата Na, гумата Na, инозита и казеина. Выбор спектра используемых источников углерода (табл. 2) основывался на наборе проводимых тестов для идентификации бактериальных культур [2,3].

Об отношении культур к молекулярному кислороду можно судить по росту на анаэробном агаре, а также по наличию или отсутствию у них таких ферментов, как каталаза и оксидаза (табл.3). Все штаммы являются каталазоположительными. Фермент оксидаза присутствует у девяти штаммов, культуры R1 и R18 оксидазоотрицательные. Рост на анаэробном агаре отмечен у восьми штаммов (R1, R4, R6, R11, R17, R18, R19 и R31), следовательно, эти штаммы являются факультативными анаэробами.

Таблица 2 .Использование источников углерода исследуемыми бактериями

№ п/п	штамм	глюкоза	крахмал	целлюлоза	ацетат Na	гумат Na	инозит	казеин
1.	R1	+	+	-	+	+	+	+
2.	R4	+	-	-	+	+	-	+
3.	R6	+	-	-	+	+	-	+
4.	R7	+	+	-	+	+	-	+
5.	R8	+	-	+	+	+	+	+
6.	R11	+	-	-	+	+	-	-
7.	R17	+	+	-	+	+	-	+
8.	R18	+	+	-	+	+	+	+
9.	R19	+	-	-	+	+	+	+
10.	R26	+	-	+	+	+	+	+
11.	R31	+	+	+	+	+	+	+

Таблица 3. Отношение к молекулярному кислороду исследуемых бактерий

№ п/п	штамм	тест на каталазу	тест на оксидазу	рост в анаэробном агаре
1.	R1	+	-	+
2.	R4	+	+	+
3.	R6	+	+	+
4.	R7	+	+	-
5.	R8	+	+	-
6.	R11	+	+	+
7.	R17	+	+	+
8.	R18	+	-	+
9.	R19	+	+	+
10.	R26	+	+	-
11.	R31	+	+	+

В работе была исследована способность изучаемых культур к росту на безазотистой среде Эшби. Результаты представлены в таблице 4. Два штамма (R11 и R31) не фиксируют молекулярный азот. Остальные девять штаммов с помощью нитрогеназной системы способны связывать молекулярный азот из атмосферы. Только один штамм R31 способен образовывать водорастворимые флуоресцирующие пигменты.

Таблица 4. Способность азотфиксации у исследуемых штаммов бактерий

№ п/п	штамм	способность к азотфиксации
1.	R1	+
2.	R4	+
3.	R6	+
4.	R7	+
5.	R8	+
6.	R11	-
7.	R17	+
8.	R18	+
9.	R19	+
10.	R26	+
11.	R31	-

Реакция Фогес-Проскауэра у всех штаммов отрицательная и штаммы не растут при +65°C. По совокупности исследуемых свойств и с учетом ключа для определения почвенных бактерий [2] и определителя бактерий рода *Bacillus* [3], мы идентифицировали исследуемые штаммы (табл.5).

Таблица 5. Результаты по идентификации штаммов

№ п/п	номера штаммов	вид бактерий
1.	R1; R7; R17; R18	<i>Bacillus firmus</i>
2.	R4; R6; R19	<i>Bacillus laterosporus</i>
3.	R26	<i>Cytophaga sp.</i>
4.	R11	<i>Micrococcus sp.</i>
5.	R31	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
6.	R8	<i>Stenotrophomonas sp.</i>

Поскольку наши бактерии были выделены из накопительной культуры для Fe(III)-восстанавливающих бактерий, то мы исследовали способность штаммов к Fe(III)-редукции на среде Лавли с ацетатом Na и Fe(OH)₃ в качестве источников углерода и железа соответственно (табл. 6).

Таблица 6. Рост и Fe(III)-восстановление у исследуемых штаммов бактерий

№ п/п	Бактерии	Рост	Fe(III)-восстановление
1.	<i>Bacillus firmus</i>	+	+
2.	<i>Bacillus laterosporus</i>	+	+
3.	<i>Cytophaga sp.</i>	+	+
4.	<i>Micrococcus sp.</i>	+	-
5.	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	+	+
6.	<i>Stenotrophomonas sp.</i>	+	+

На среде Лавли возможен рост для всех бактериальных культур, поскольку все штаммы могут использовать ацетат Na в качестве единственного источника углерода и энергии. К Fe(III)-восстановлению не способна только одна из исследуемых бактериальных культур - *Micrococcus sp.*

Таким образом, бактерии, выделенные нами из образцов чернозема выщелоченного, способны, во-первых, к использованию в качестве единственного источника углерода и энергии препарата гуминовых кислот – гумата Na. Следовательно, в природных условиях такие бактерии используют гуминовые вещества чернозема, что в конечном итоге приводит к разложению запасов почвенного гумуса. Во-вторых, в условиях эксперимента выделенные бактерии (за исключением вида *Micrococcus sp.*) способны к восстановлению нерастворимого Fe(OH)₃, тем самым, в природных условиях могут способствовать одновременно: увеличению количества ионов Fe²⁺ в пахотном горизонте, что может быть токсично для сельскохозяйственных растений; и вымыванию железа в нижележащие почвенные горизонты, что в конечном итоге может привести к возникновению оглеенных почвенных горизонтов [1].

Литература:

1. Зайдельман, Ф.Р. Процесс глееобразования и его роль в формировании почв / Ф.Р. Зайдельман. – М.: МГУ, 1998. – 316 с.
2. Лысак, Л.В. Методы оценки бактериального разнообразия почв и идентификации почвенных бактерий / Л.В. Лысак, Т.Г. Добровольская. И.Н. Скворцова. – М.: МАКС Пресс, 2003. – 120 с.
3. Нетрусов, А.И. Практикум по микробиологии / А.И. Нетрусов, М.А. Егорова, Л.М. Захарчук. – М.: Академия, 2005. – 608 с.