ЭКОБИОТЕХ
ISSN 2618-964X http://ecobiotech-journal.ru

ШТАММЫ БАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫЕ ИЗ СПЕЛЕОТЕМЫ ПЕЩЕРЫ ШУЛЬГАН-ТАШ (КАПОВОЙ, ЮЖНЫЙ УРАЛ), СПОСОБНЫЕ К ОТЛОЖЕНИЮ МИНЕРАЛОВ КАРБОНАТА КАЛЬЦИЯ

Рябова А.С.[1], Червяцова О.Я.[2], Леонова Л.В.[3], Ясаков Т.Р.[1], Галимзянова Н.Ф.[1], Кузьмина Л.Ю.[1]

[1] Уфимский Институт биологии Уфимского федерального исследовательского центра РАН, Россия;
E-mail: alenarya@rambler.ru
[2] ФГБУ «Государственный заповедник «Шульган-Таш», д. Иргизлы, Башкортостан, Россия
[3] Институт геологии и геохимии УрО РАН, Екатеринбург, Россия

В составе микробного сообщества субаквальных сталактоидов пещеры Шульган-Таш обнаружены гетеротрофные бактерии, отлагающие карбонат кальция в питательных средах с Na-Ca-солями яблочной кислоты в аэробных условиях при pH ~8-9. Два штамма бактерий, идентифицированных на основе анализа гена 16S рРНК, принадлежали к видам *Pseudomonas* sp. и *Rhizobium herbae*. Новообразованные кристаллы характеризовались большим разнообразием форм и размеров, что, вероятно, может быть обусловлено свойствами биопленок, образуемых этими штаммами.

Ключевые слова: *Pseudomonas*, *Rhizobium herbae*, биокристаллизация, карбонат кальция, спелеотемы пещер

THE BACTERIAL STRAINS ISOLATED FROM SUBAQUEOUS SPELEOTHEMES IN THE SHULGAN-TASH CAVE (KAPOVA, SOUTH URAL) ARE CAPABLE TO DEPOSITION OF CALCIUM CARBONATE MINERALS

Ryabova A.S.[1], Chervyatsova O.Ya.[2], Leonova L.V.[3], Iasaev T.R.[1], Galimzyanova N.F.[1], Kuzmina L.Yu.[1]

[1] Ufa Institute of Biology of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa
E-mail: alenarya@rambler.ru
[2] Shulgan-Tash State Nature Reserve, Irgizly village, Republic of Bashkortostan, Russia
[3] Institute of Geology and Geochemistry of Ural Branch of RAS, Yekaterinburg, Russia

Heterotrophic bacteria precipitating of calcium carbonate in nutritional media containing sodium-calcium salts of malic acid under aerobic conditions (pH ~8-9) are found as members of microbial community colonizing subaqueous speleothems. Two bacterial isolates identified through 16S rRNA gene analysis are belonged to *Pseudomonas* sp. and *Rhizobium herbae* species. Newly-formed calcium carbonate crystals are characterized by abundance and wide variety of forms and sizes that may be associated with specific properties of microbial biofilms formed by these bacteria.

Keywords: *Pseudomonas*, *Rhizobium herbae*, biocrystallization, calcium carbonate, cave speleothemes

Поступила в редакцию: 9.07.2019

DOI: 10.31163/2618-964X-2019-2-4-406-409

ВВЕДЕНИЕ

В водоемах некоторых карбонатных пещер встречаются специфические минеральные образования, называемые субаквальными сталактоидами – pool fingers [Hill, Forti, 1997]. Pool fingers формируются под урезом воды, местами образуя несколько ярусов, и представляют собой удлиненные кристаллы кальцита длинной до 50 см [Queen, Melim, 2006]. Существует гипотеза формирования pool fingers за счет развития гетеротрофных микроорганизмов, использующих питательные вещества, поступающие с поверхностными водами и изменяющих в процессе жизнедеятельности pH окружающей среды (кислотно-щелочной барьер), способствуя выпадению кристаллов кальцита и росту агрегатов. При истощении резервов органического вещества замедляется микробное развитие и происходит погребение колоний под минеральной коркой [Melim et al., 2001].

Пещера Шульган-Таш – единственная пещера Южного Урала (Республика Башкортостан, Государственный природный заповедник «Шульган-Таш»), где обнаружены субаквальные карбонатные спелеотемы. Они формируются ниже уреза воды слабопроточного подземного водоема «Дальнего Верхнего озера».

Целью данной работы было изучить способность бактериальных изолятов, выделенных из спелеотемы (pool fingers) пещеры Шульган-Таш, in vitro отлагать кристаллы кальцита.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение бактерий из образца pool fingers производили методом предельных разведений на твердой среде Gran's с изменениями (г/л): KNO_3 – 0,5; $Na_2HPO_4 \times 12H_2O$ – 0,25; яблочная кислота – 4,02; $CaCl_2$ – 3,3; агар – 15. [Danielli, Edington, 1983]. Инкубацию посевов производили при температуре 22°С (~20 сут).

Отбор изолятов для исследований производили по их способности образовывать минералы, которые изучали при помощи светового микроскопа Leica DM 1000 (Германия). Для работы было отобрано два изолята, проявляющих способность к образованию минеральных фаз в бактериальном матриксе. Идентификацию изолятов проводили на основании анализа последовательности гена 16S рРНК.

При изучении методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) сухие препараты колоний напыляли углеродом. Исследования препаратов проводили на приборах JSM 6390LV (JEOL) с энергодисперсионным спектрометром (ЭДС) INCA Energy 450 X-max 80.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ численности микроорганизмов в образце pool fingers показал присутствие гетеротрофных бактерий, использующих яблочную кислоту (2,3-7,8 × 10^6 КОЕ/г). Только 50% бактериальных колоний формировали минералы внутри и вокруг бактериального матрикса. Были выбраны два изолята, проявляющих наибольшую активность в образовании разных форм кристаллов. Изоляты, представленные грамотрицательными подвижными палочками, получили лабораторные номера IB St1-2a (консорциум из 2-х видов) и IB St1-4. На основании анализа 16S рРНК доминант консорциума IB St1-2a был идентифицирован как *Pseudomonas* sp., а штамм IB St1-4 как *Rhizobium herbae*.

При культивировании изучаемых штаммов в аэробных условиях на твердых средах с Na-Ca-солями яблочной кислоты, уже через неделю наблюдался рост кристаллов, а через 3 недели происходило массовое кристаллообразование в бактериальном матриксе (рис. а, г). Ранее проведенные нами исследования показали, что по данным рентген-дифрактометрического анализа новообразованные минералы, полученные при участии микроорганизмов, представлены кристаллами кальцита без промежуточных фаз. Степень окристаллизованности подобных минералов достаточно высокая [Кузьмина и др., 2018]. На рисунке представлены различные формы минеральных агрегатов, полученные при культивировании изучаемых штаммов. Общей закономерностью новообразованных минералов является формирование расщепленных кристаллов. Расщепление может быть обусловлено как автодеформационным механизмом за счет высокой скорости роста, так и наличием химических примесей.

В бактериальном матриксе консорциума преобладали множественные гантелевидные кристаллы, местами срастающиеся в сложные агрегаты, размеры которых составляли 100-150 мкм (рис. а). Некоторые из них имели плоскую поверхность, обращенную вверх (рис. б). По всей видимости, она является индукционной поверхностью, образованной по пленке поверхностного натяжения раствора. В других случаях наблюдали относительно изометричные формы, свидетельствующие об их свободном росте внутри бактериального матрикса (рис. в).

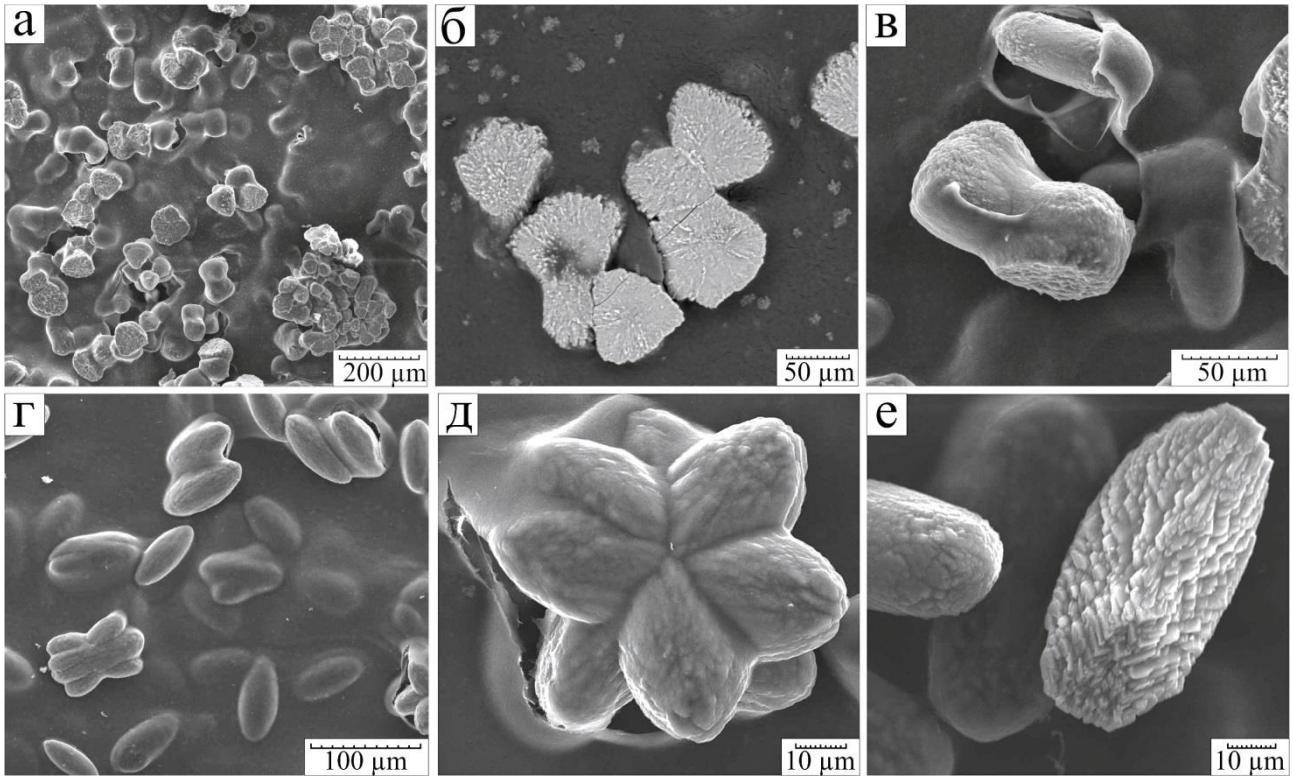

Рисунок. Морфология новообразованных кристаллов карбоната кальция, полученных при культивировании консорциума *Pseudomonas* sp. IB St1-2a и не идентифицированной бактерии (а, б, в) и штамма *Rhizobium herbae* IB St1-4 (г, д, е) на среде с Na-Ca солями яблочной кислоты

В случае штамма *R. herbae* IB St1-4 в бактериальном матриксе образуются множественные удлиненные расщепленные кристаллы размером до 50 мкм (рис. г). Иногда наблюдалось срастание и расщепление таких кристаллов (рис. д). Удлиненные кристаллы типичной формы при большом увеличении демонстрируют блочное строение. По морфологии подобных кристаллов можно сделать вывод, что они представлены комбинациями нескольких ромбоэдров (рис. е). Отличительной особенностью новообразованных минералов, полученных при участии штамма *R. herbae* IB St1-4, является их более мелкий размер и отсутствие плоских индукционных поверхностей, что указывает на большее количество затравок в бактериальном матриксе. Вероятно, их образование происходит как на поверхности, так и внутри бактериальной биопленки.

Развитие изучаемых штаммов при использовании солей яблочной кислоты в качестве источника углерода приводит к увеличению pH среды 8-9 и выше. Этот процесс вызывает освобождение ионов кальция и натрия, изменение карбонатно-бикарбонатного баланса, что способствует образованию кальцита в виде минералов [Заварзин, 2002; Barton, Northup, 2007; Boston et al., 2009]. Ранее экспериментально было показано, что образование кальцита происходит только в аэробных условиях при непосредственном участии микроорганизмов за

счет углекислого газа, выделяемого при жизнедеятельности последних [Anderson et al., 1992, Кузьмина и др., 2018]. Известно, что формирование кристаллов кальцита является пассивным, генетически не регулируется микроорганизмами. Биологическая функция кристаллизации $CaCO_3$ в настоящее время не выяснена [Lian et al., 2006].

Таким образом, показано, что развитие бактерий *Rhizobium herbae* IB St1-4 и консорциума *Pseudomonas* sp. IB St1-2a и не идентифицированной бактерии на солях яблочной кислоты приводит к образованию кристаллов кальцита, различающихся по размерам и форме. Вероятно, морфология новообразованных кристаллов обусловлена свойствами микробной биопленки конкретного штамма.

При проведении исследований использовали оборудование ЦКП «Агидель» УФИЦ РАН. Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России № 075-00326-19-00 по теме № АААА-А18-118022190098-9 (УИБ УФИЦ РАН) и при частичной финансовой поддержке РФФИ и Правительства Республики Башкортостан в рамках гранта № 17-44-020091 р_а. Часть работы выполнена в рамках государственного задания ИГГ УрО РАН № АААА-А18-118052590032-6.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Заварзин Г.А. Микробный геохимический цикл кальция // Микробиология. 2002. Т. 71. № 1. С. 5-22.
2. Кузьмина Л.Ю., Леонова Л.В., Рябова А.С., Галимзянова Н.Ф., Симакова Ю. С., Червяцова О.Я. Микробные сообщества мондмильха пещеры Шульган-Таш (Южный Урал) и их участие в переотложении карбоната кальция // Минералогия техногенеза – 2018. Миасс: ИМин УрО РАН. 2018. С. 155-166.
3. Andersen S.M., Johnsen K., Sørensen J., Nielsen P., Jacobsen C.S. *Pseudomonas frederiksbergensis* sp. nov., isolated from soil at a coal gasification site // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2000. N. 50. P. 1957-1964.
4. Anderson S., Appanna V.P., Huang J., Viswanatha T. A novel role for calcite in calcium homeostasis // FEBS Letters. 1992. V. 308. N. 1. P. 94-96.
5. Barton H.A., Northup D.E. Geomicrobiology in cave environments: past, current and future perspectives // Journal of cave and karst studies. 2007. V. 69. N. 1. P. 163-178.
6. Boston P.J., Spilde M.N., Northup D.E., Curry M.D., Melim L.A., Rosales-Lagarde L. Microorganisms as speleogenetic agents: geochemical diversity but geomicrobial unity / Hypogene speleogenesis and karst hydrogeology of artesian basins. International conference, Ukraine: Simferopol. 2009. P. 51-58.
7. Danielli H.M.C., Edington M.A. Bacterial calcification in limestone caves // Geomicrobiology journal. 1983. V. 3. N. 1. P. 1-16.
8. Hill C.A., Forti P. Cave minerals of the World, 2nd Edition / National Speleological Society, Huntsville. 1997. 463 p.
9. Lian B., Hu Q., Chen J., Ji J., Teng H.H. Carbonate biomineralization induced by soil bacterium *Bacillus megaterium* // Geochimica et Cosmochimica Acta. 2006. N. 70. P. 14.
10. Queen L.M., Melim L.A. Biothems: biologically influenced speleothems in caves of the Guadalupe mountains, New Mexico, USA / New Mexico Geological Society Guidebook, 57th Field conference, Cave and Karst of Southeastern New Mexico. 2006. P. 167-174.