



УДК 579. 832. 1 574. 24579. 222 574. 23574. 58

## Выделение и характеристика бактерий рода *Hyphomicrobium* из оз. Байкал

А. С. Ковадло ([kovadlo@lin.irk.ru](mailto:kovadlo@lin.irk.ru))

**Аннотация.** Впервые из оз. Байкал выделены представители факультативных метилотрофных бактерий – род *Hyphomicrobium*. Бактерии рода *Hyphomicrobium* (гифомикробы) обнаружены в 33 % проб воды, отобранных по всей акватории оз. Байкал. Численность гифомикробов была  $3,5 \times 10^2$  клеток в миллилитре воды в районе Селенгинского мелководья, что составило 0,01 % от общей численности микроорганизмов. Выявлена способность штамма Ну-Х/1 к аэробной денитрификации.

**Ключевые слова:** бактерии рода *Hyphomicrobium*, распространение в природе факультативных метилотрофов, аэробная денитрификация.

Отличительными особенностями бактерий рода *Hyphomicrobium* являются сложный жизненный цикл и факультативно метилотрофный тип физиологии [9]. Метилотрофные микроорганизмы извлекают энергию и в большинстве случаев углерод из соединений, которые не имеют С–С связи, так называемые С1-соединения. Факультативные метилотрофы соответственно способны использовать как С1-соединения, так и соединения с более чем одним атомом углерода [7]. Бактерии рода *Hyphomicrobium* относятся к группе факультативных метилотрофов [9]. Различные штаммы гифомикробов способны использовать формиат, метиламины [11], хлорметан [15], диметилсульфоксид [20], диметилсульфид [6] и другие соединения. Кроме того, некоторые виды рода *Hyphomicrobium* осуществляют денитрификацию, где в качестве органического субстрата они используют метанол [22]. Штаммы *Hyphomicrobium* могут быть выделены как из образцов почвы, так и из проб воды [18]. Гифомикробы также обнаруживаются в составе микробного сообщества активного ила очистных сооружений, причем здесь они имеют наибольшую численность по сравнению с другими местообитаниями [13, 12].

В настоящее время в донных осадках оз. Байкал обнаружены мощные залежи газовых гидратов метана. С помощью молекулярно-генетической идентификации выявлены метанотрофные микроорганизмы [4], но исследования по изучению факультативных метилотрофов в оз. Байкал не проводились. Известно, что метанотрофные микроорганизмы выделяют метанол, который служит субстратом для факультативных метилотрофов, а гифомикробы являются наиболее частыми спутниками метанотрофов в их накопительных культурах [10].

Исследования морфологического разнообразия бактерий оз. Байкал с помощью электронной микроскопии выявили наличие почкующихся бактерий рода *Hyphomicrobium* в составе микробного сообщества, поэтому целью данной работы было выделение и характеристика бактерий рода *Hyphomicrobium* из оз. Байкал, как одного из представителей факультативных метилотрофных бактерий. Целью исследования также был подсчет численности микроорганизмов данного рода для мониторинга микробного биоразнообразия экосистемы оз. Байкал и сравнения численности гифомикробов с другими экосистемами.

### **Материалы и методы исследования**

**Отбор проб.** В июне 2007 г. были отобраны пробы воды в районе впадения крупнейшего притока оз. Байкал – р. Селенги. Образцы отбирали на 3 станциях: в устье протоки Харауз (глубина 4,5 м) и на расстоянии 1 и 3 км (глубина 18 м) от устья протоки. На каждой станции воду брали с поверхности и у дна.

В июне 2008 г. пробы воды были отобраны по всей акватории озера. Распространение гифомикробов в экосистеме оз. Байкал изучается впервые, и поэтому для исследования были отобраны разнообразные образцы, отражающие разное качество вод оз. Байкал. Часть проб была отобрана в областях влияния притоков озера – 17 проб, 29 проб из глубоководной части озера и областей вблизи населенных пунктов и предприятий.

**Обнаружение и учет количества клеток *Hyphomicrobium* в природном образце.** Наличие почкующихся простековых клеток гифомикробов предварительно выявляли с помощью световой микроскопии и подтверждали трансмиссионной электронной микроскопией контрастированных уранил ацетатом препаратов. Анализировали природные образцы через 2 месяца после отбора и посева в стерильную среду SM с 0,5 % метанолом [5]. Для учета количества клеток *Hyphomicrobium* применили методику, подходящую для подсчета морфологически идентифицируемых микроорганизмов. Из исходного образца воды готовили серию десятикратных разведений. Затем с помощью световой микроскопии определяли наличие почкующихся простековых клеток гифомикробов. Изначальное количество в миллилитре воды определяли по таблице МакКреди, основанной на вариационной статистике [1]. В качестве основы для разведений использовали стерильную байкальскую воду или солевую среду SM. Для получения наиболее достоверного результата с наименьшим доверительным интервалом для каждой пробы было выполнено по 3 или 4 повторности разведений.

**Метод выделения штаммов.** Для того чтобы выделить отдельные штаммы бактерий рода *Hyphomicrobium* использовали различные подходы. Обнаруженные клетки с помощью световой микроскопии пытались выделить либо через этап обогатительных культур на среде «337» [11] с метанолом, Na-ацетатом, либо путем непосредственного высевания на агаризованную среду, состоящую из минеральной основы «337» с метано-

лом или триметиламином гидрохлоридом, либо без источников углерода. Также применили метод аэробного и анаэробного обогащения в среде «337» с  $\text{KNO}_3$  и метанолом [19].

**Подсчет общего количества микроорганизмов с использованием эпифлуоресцентной микроскопии.** Общее количество микроорганизмов в пробах воды учитывали с помощью эпифлуоресцентной микроскопии («Olympus», Япония), окрашенных ДАФИ (4,6-диамидино-2-фенилиндола, конечная концентрация 1 мкг/мл) клеток. Для автоматического подсчета использовали программу ImageTest [2]. Расчеты вели на основе формулы, приведенной ранее [1].

**Культуральные характеристики *Hyphomicrobium sp.*** Для изучения спектра утилизируемых субстратов использовали в качестве основы минеральную основу «337», которую стерилизовали автоклавированием и каждый тестируемый субстрат добавляли после стерилизации при помощи фильтрации через фильтр с размером пор 0,22 мкм. Метанол использовали в концентрации 0,05 % (15,6 мМ), 0,5 % (156 мМ), 2 % (625 мМ); триметиламин гидрохлорид (11,2 мМ); Na-ацетат; глюкозу добавляли до конечной концентрации 0,1 %. Культивирование проводили при +30 °С в аэробных условиях без доступа света для C1-соединений. Для исследования влияния температуры на рост гифомикробов проводили культивирование при +4 °С, +17 °С, +30 °С. Время генерации ( $g$ ) и константу скорости роста ( $\mu$ ) рассчитывали согласно формулам [3]. Оптическую плотность измеряли с использованием фотоэлектроколориметра при длине волны 660 нм. Денитрификацию также определяли на минеральной основе «337» с 1 %  $\text{KNO}_3$  и метанолом в колбах с притоком воздуха. В качестве контроля использовали минеральную основу «337» с  $\text{KNO}_3$  без микроорганизмов на контроль возможного образования газа в результате химических реакций и «337» без  $\text{KNO}_3$  с клетками Ну-Х/1. Выделяемый микроорганизмами газ анализировали на газовом хроматографе.

## Результаты и их обсуждение

### Обнаружение *Hyphomicrobium* в пробах воды оз. Байкал

#### *Зоны влияния притоков (р. Баргузин, р. Селенга, р. Кичера, р. В. Ангара)*

Схема оз. Байкал и станции отбора проб представлены на рис. 1. Баргузинский залив и р. Баргузин: в Баргузинском заливе были отобраны 4 пробы с поверхности воды и 2 пробы из придонной части толщи воды. Характерным оказалось то, что именно в 2 придонных пробах (устье р. Баргузин и 3 км от устья) клетки *Hyphomicrobium* были обнаружены и не обнаружены ни в одной из поверхностных проб (р. Баргузин, устье р. Баргузин, 1 и 3 км от устья). Селенгинское мелководье: в 2007 г. образцы воды отбирали на 3 станциях: в устье протоки Харауз (глубина 4,5 м) и на расстоянии 1 и 3 км от устья протоки в Байкале. На каждой станции воду брали с поверхности и у дна. Было установлено, что в период исследований на приустьевом участке в районе впадения протоки Харауз в оз. Байкал бактерии рода *Hyphomicrobium* были в основном сосредоточены в

придонной области. Определение наиболее вероятного числа клеток показало максимальное значение в придонной пробе устья протоки Харауз в количестве  $3,5 \cdot 10^2$  клеток в миллилитре с доверительным интервалом от 92 до 1330 клеток. Общее количество микроорганизмов в воде данного района варьировало от  $2,4$  до  $3,0 \cdot 10^6$  кл/мл. То есть гифомикробы составляли не более 0,01 % от общего числа микроорганизмов. В других пробах клетки стабильно обнаруживались, но плотность их не превышала 10 клеток в миллилитре воды. В 2008 г. пробы были отобраны на расстоянии 1, 3 и 7 км от устья протоки Харауз. На этих трех станциях брали воду с поверхности и, кроме того, на 3-километровой и 7-километровой станции воду из придонной части толщи. Бактерии рода *Hyphomicrobium* были найдены в воде, отобранной на поверхности со станции 1 км от устья и из придонной пробы станции в 3 км от устья протоки



Рис. 1. Схема отбора проб в различных частях оз. Байкал в июне 2007–2008 гг.

Харауз. В устье р. В. Ангара бактерии рода *Hyphomicrobium* также были обнаружены.

**Пелагиаль оз. Байкал.** В пробах воды с различных глубин (10 м, 15 м, 50 м, 500 м, 750 м) центральной станции разреза пос. Листвянка – пос. Танхой в исследуемый период простековые клетки бактерий рода *Hyphomicrobium* не обнаружены. Также они не были найдены в поверхностных пробах центральных станций разрезов Академического хребта, м. Крестовый – м. Хобой, ст. Солнечная – о. Ушканий, м. Ижимей – о. Лиственничный, м. Котельниковский – м. Амундакан, но выявлены на станциях м. Ухан – м. Токий и с. Байкальское – м. Турали.

В областях вблизи населенных пунктов были отобраны следующие пробы: 15 км от пос. Култук (0 м, 5 м, 6000 м, 1200 м), 1 км от пос. Солзан (0 м), центральная станция пос. Маритуй – пос. Солзан, 3 км от пос. Солзан (0 м, 5 м, 25 м, 200 м, 450 м), 3 км от пос. Танхой (0 м), 3 и 7 км от пос. Маритуй (0 м). Бактерии рода *Hyphomicrobium* обнаружены в 3 км от пос. Солзан на глубине 25 м и от пос. Маритуй на поверхности воды.

В итоге исследуемые микроорганизмы обнаружены в 52 % проб воды, отобранных в зонах влияния крупных притоков и в 14 % проб воды из глубоководной части озера. Таким образом, на основе данных анализа 52 проб воды из оз. Байкал наиболее благоприятные условия для развития гифомикробов в июне 2007 г. и июне 2008 г. наблюдались в основном в зонах влияния крупных притоков.

Согласно исследованиям выявлено, что накопительные культуры мезофильных денитрификаторов из различных местообитаний, включая почву, донные осадки, загрязненные воды, активный ил, обнаруживают *Hyphomicrobium* [8, 14, 17]. Выделенные нами штаммы из вод Селенгинского мелководья, возможно, указывают на процесс денитрификации, причем кислородотолерантной, при использовании C1-соединений в данном районе.

**Изоляция штаммов *Hyphomicrobium* sp.** Изначально был использован метод непосредственного высевания из пробирок с различными разведениями, где наблюдали наличие почкующихся клеток гифомикробов на агаризованные среды, где в качестве источников углерода был использован метанол, триметиламин гидрохлорид, дрожжевой экстракт. Также использовалась среда без источников углерода. Даже в результате длительного культивирования попытки прямого посева на твердые питательные среды оказались безуспешными. Поэтому был использован метод получения накопительных культур в жидкой солевой среде с метанолом или Na-ацетатом. А также был опробован метод накопления на метанол-нитратной среде без доступа кислорода и в аэробных условиях. Метод получения накопительных культур на метаноле в аэробных условиях оказался успешным для выделения *Hyphomicrobium* из проб воды оз. Байкал. В итоге было выделено 8 штаммов из зоны влияния р. Селенги, но морфологические и культуральные исследования показали схожесть выделенных штаммов, даже географически разделенных на расстоянии 2 км, поэтому для дальнейшей характеристики был оставлен 1 штамм Ну-Х/1.

**Фенотипическая характеристика *Hyphomicrobium* sp. Ну-Х/1:**

Морфология. Клетки штамма Ну-Х/1 овальной формы, их размер варьирует в зависимости от стадии жизненного цикла, длина клетки – 0,39–1,45 мкм, ширина 0,45–1,22 мкм. Простека шириной 0,15 мкм (рис. 2).

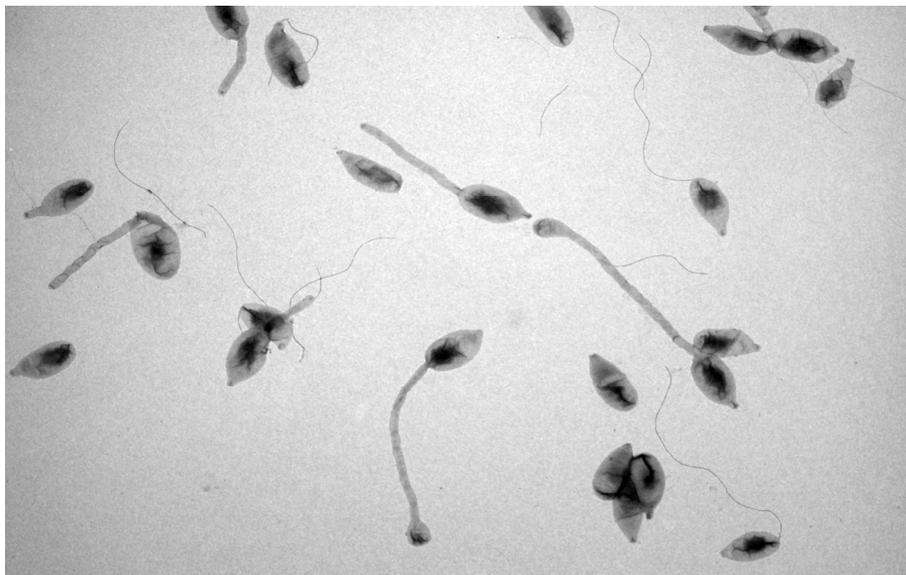


Рис. 2. Трансмиссионная электронная микроскопия штамма Ну-Х/1, выделенного из придонного слоя Селенгинского мелководья.

Культивирование на среде «337» с метанолом. В культуре клетки, находящиеся на разных стадиях жизненного цикла

Физиология *Hyphomicrobium* sp. Неоднократно для олиготрофных бактерий рода *Hyphomicrobium* была показана способность к развитию на средах, не содержащих источников углерода. Поэтому мы протестировали развитие байкальских гифомикробов в среде без источников углерода. Был обнаружен относительно незначительный рост клеток на среде без добавления источников углерода по сравнению с ростом на метаноле. Так, максимальное накопление биомассы при культивировании на минеральной среде составило не более 7 % от биомассы клеток, культивированных в среде с 0,5 %  $\text{CH}_3\text{OH}$ .

Интересно также было выявить оптимальную концентрацию метанола для развития гифомикробов, выделенных из оз. Байкал. Было установлено, что на среде с концентрацией метанола 0,05 % время генерации оказалось 9 ч, на 2 % метаноле – 16,7 ч, а самое небольшое время генерации – 7,7 ч необходимо клеткам гифомикробов, выделенным из оз. Байкал, на среде с 0,5 % метанола. Константа скорости роста  $\mu$  при культивировании на 0,5 %  $\text{CH}_3\text{OH}$  составила 0,083  $\text{ч}^{-1}$ . По данным Tuhela et al.  $\mu$  при культивировании на триметилаmine для штамма *Hyphomicrobium* W1-1B, выделенного из биопленки водосборной скважины (USA) [21], состави-

до  $0,031 \text{ ч}^{-1}$ . Невысокие значения константы скорости роста характерны для олиготрофных организмов [23].

Оптимальную температуру для развития в метилотрофных условиях определяли при 0,5 % концентрации  $\text{CH}_3\text{OH}$ . Оказалось, что при  $+4 \text{ }^\circ\text{C}$  клетки *Hyphomicrobium* не размножаются, тогда как с повышением температуры увеличивается интенсивность роста клеток и синтез биомассы.

Для исследования спектра утилизируемых субстратов использовали метанол и метиламин гидрохлорид в качестве индикаторов C-1 метаболизма, глюкозу как показатель наличия цикла Кребса и Na-ацетат на функционирование глиоксилатного цикла, также выделенные штаммы помещали в среду с дрожжевым экстрактом и пептоном. Был получен рост гифомикробов на всех субстратах, кроме дрожжевого экстракта и пептона.

**Денитрификация.** Исследования показали, что не все штаммы *Hyphomicrobium* при росте на метаноле способны осуществлять денитрификацию, помимо этого система нитратредукции репрессируется в аэробных условиях [24]. В современном определителе бактерий Берджи [9] описаны виды, осуществляющие редукцию нитрата в анаэробных условиях, например вид *Hyphomicrobium denitrificans*. Хотя в статье J. В. М. Meiberg и соавт. [16] сообщалось о синтезе нитратредуктазы у *Hyphomicrobium X* (типовом штамме *Hyphomicrobium denitrificans*) при низком давлении кислорода – от 0 до 20 мм рт. ст. При росте *Hyphomicrobium* Hy-X/1 на среде «337» с метанолом и  $\text{KNO}_3$  в аэробных условиях выделялся газ, указывающий на процесс денитрификации. Анализ показал, что на 94 % выделяемый газ состоит из  $\text{N}_2$ . Таким образом, можно предположить, что бактерии рода *Hyphomicrobium* в оз. Байкал осуществляют редукцию нитратов до газообразного азота с одновременным использованием растворенного в воде кислорода в аэробной зоне водоема.

## Заключение

Таким образом, были проведены первые исследования, посвященные факультативным метилотрофам в оз. Байкал. Выявлено наличие почкующихся клеток гифомикробов в одной трети проб, отобранных в различных участках оз. Байкал. Численность клеток в воде озера сопоставима с численностью гифомикробов в других пресноводных водоемах, не подверженных влиянию загрязняющих стоков [12]. Штамм Hy-X/1, выделенный из оз. Байкал, в основном выявил характерные для данного рода физиологические особенности. А именно низкая скорость роста и способность размножаться без источников углерода, характерная для олиготрофных микроорганизмов, а также факультативно метилотрофный тип физиологии. Однако выявлена способность данного организма к осуществлению денитрификации при воздушном насыщении кислородом среды, что исследовано для микроорганизмов других родов, но не описано для рода *Hyphomicrobium* [9].

## Список литературы

1. *Антипчук А. Ф.* Микробиологический контроль в прудовых хозяйствах / А. Ф. Антипчук. – М. : Пищ. пром-сть, 1979. – 145 с.
2. Компьютерная система учета изображений флюоресцентно-окрашенных бактерий / В. Н. Дроздов [и др.] // Микробиология. – 2006. – Т. 75, № 6. – С. 751.
3. *Шлегель Г.* Общая микробиология / Г. Шлегель. – М. : Мир, 1972. – 476 с.
4. Первые результаты исследования филогенетического разнообразия микроорганизмов осадков Южного Байкала в районе приповерхностного залегания гидратов метана / О. В. Шубенкова [и др.] // Микробиология. – 2005. – Т. 74, № 3. – С. 370–377.
5. *Aa K.* The Use of Various Substrates and Substrate Concentrations by a Hyphomicrobium sp. Isolated From Soil: Effect on Growth Rate and Growth Yield / K. Aa, R. A. Olsen // Microb. Ecol. – 1996. – Vol. 31. – P. 67–76.
6. *De Bo I.* Removal of dimethyl sulfide from waste air in a membrane bioreactor / I. De Bo, H. Van Langenhove, J. Heyman // Desalination. – 2002. – Vol. 148. – P. 281–287.
7. *De Marco P.* Methylo-trophy versus heterotrophy: a misconception / P. De Marco // Microbiology. – 2004. – Vol. 150, № 6. – P. 1606–1607.
8. *Foglar L.* Wastewater Denitrification Process- The Influence of Methanol and Kinetic Analysis / L. Foglar, F. Briski // Process Biochemistry. – 2003. – Vol. 39. – P. 95–103.
9. *Gliesche C.* Bergey's Manual of systematic bacteriology. 2nd ed. / C. Gliesche, A. Fesefeldt, P. Hirsch ; eds. D. J. Brenner, N. R. Krieg, J. T. Staley. – N. Y. : Springer, 2005. – Vol. 2, part C. – P. 476–494.
10. *Hanson S. R.* Methanotrophic bacteria / S. R. Hanson, T. E. Hanson // Microbiological Reviews. – 1996. – 60: 2. – P. 439–471.
11. *Hirsch P.* Biology of Budding Bacteria II. Growth and Nutrition of Hyphomicrobium spp. / P. Hirsch, S. F. Conti // Archiv für Mikrobiologie. – 1964. – Vol. 48. – P. 358–367.
12. *Holm N. C.* Diversity and Structure of Hyphomicrobium Populations in a Sewage Treatment Plant and Its Adjacent Receiving Lake / N. C. Holm, C. G. Gliesche, P. Hirsch // Applied and Environmental Microbiology. – 1996. – Vol. 62, N 2. – P. 522–528.
13. Quantification of Hyphomicrobium Populations in Activated Sludge from an Industrial Wastewater Treatment System as Determined by 16S rRNA Analysis / A. C. Layton [et al.] // Applied and Environmental Microbiology. – 2000. – Vol. 66. – P. 31167–1174.
14. *Lemmer H.* Denitrification in a Methanol Fed Fixed Bed Reactor. Part 1: Physico-Chemical and Biological Characterization / H. Lemmer, A. Zaglauer, G. Metzner // Water Science Technology. – 1997. – Vol. 31. – P. 1897–1902.
15. Hyphomicrobium chloromethanicum sp. nov. and Methylobacterium chloromethanicum sp. nov., chloromethane-utilizing bacteria isolated from a polluted environment / I. R. McDonald [et al.] // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2001. – Vol. 51. – P. 119–122.
16. *Meiberg J. B. M.* Effect of dissolved oxygen tension on the Metabolism of Methylated amines in Hyphomicrobium X in the absence and presence of nitrate: evidence for „aerobic“ denitrification / J. B. M. Meiberg, P. M. Bruinenberg, W. Harder // Journal of General Microbiology. – 1980. – P. 120, 453–463.
17. Full-scale application of nitrogen removal with methanol as carbon source / U. Nyberg [et al.] // Water Sci. Technol. – 1992. – Vol. 26. – P. 1077–1086.

18. *Poindexter J. S.* Dimorphic Prosthecate Bacteria: The Genera Caulobacter, Asticcacaulis, Hyphomicrobium, Pedomicrobium, Hyphomonas and Thiodendron // The prokaryotes / eds. A. Balows [et al.]. – N. Y. : Springer, 1992. – P. 2176–2192.
19. *Sperl G. T.* Denitrification with Methanol: a Selective Enrichment for Hyphomicrobium Species / G. T. Sperl, D. S. Hoare // J. of Bacteriology. – 1971. – Vol. 108. – P. 733–736.
20. Continuous degradation of dimeyhyl sulfoxide to sulfate ion by Hyphomicrobium denitrificans WU-K217 / M. i-N. Takako [et al.] // Journal of bioscience and bioengineering. – 2002. – Vol. 94, N 1. – P. 52–56.
21. Phylogenetic and narG Analysis of a Hyphomicrobium Isolate / L. Tuhela [et al.] // Curent Microbiology. – 1997. – Vol. 35. – P. 244–248.
22. Characterization and description of Hyphomicrobium denitrificans sp. nov. / T. Urakami [et al.] // Int. J. Syst. Bacteriol. – 1995. – Vol. 45. – P. 528–532.
23. *Van Gernerden H.* Heterotrophic activity in the sea / H. Van Gernerden, J. G. Kuenen // NATO conference series. Marine sciences: trends. – 1984. – Vol. 15. – P. 25–54.
24. *Zumft W. G.* Cell Biology and Molecular Basis of Denitrification / W. G. Zumft // Microbiology and Molecular Biology Reviews. – 1997. – Vol. 61, N 4. – P. 533–616.

## Isolation and characteristic of g. Hyphomicrobium bacteria from Lake Baikal

A. S. Kovadlo

**Abstract.** First representatives of facultative methylotrophic bacteria were isolated from Lake Baikal (genus Hyphomicrobium). G. Hyphomicrobium bacteria were detected in 33 % water samples took all over the basin of Lake Baikal. The abundance of hyphomicrobes was  $3,5 \times 10^2$  cells per milliliter of water in region of Selenga river shoal though it was composed 0, 01 % from total number of microorganisms. The ability of Hy-X/1 strain to aerobic denitrification was detected.

**Key words:** genus Hyphomicrobium bacteria, distribution in nature of facultative methylotrophic microorganisms, aerobic denitrification.

*Ковадло Анна Сергеевна*  
кандидат биологических наук  
Лимнологический институт СО РАН  
664033, Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3  
лаборатория водной микробиологии  
тел.: 42-54-15