

Магнитотактические БАКТЕРИИ ПРИРОДНЫХ ВОДОЕМОВ РЕСПУБЛИКИ ТАТАРСТАН

Показано, что в составе ила и воды природных водоемов Республики Татарстан обитают магнитотактические бактерии. Выделены представители рода *Magnetospirillum*, которые имеют способность к внутриклеточной биоминерализации соединений железа.

Введение

Состав микрофлоры и характер микробиологических процессов в водоемах тесно связаны с экологической обстановкой окружающей среды, ее физическими и химическими особенностями, что в целом предопределяет весь комплекс гидробионтов, населяющих тот или иной биотоп. Рассматривая водоем в целом, необходимо изучать не только водную массу, но и иловые отложения. Именно здесь может накапливаться до 50 % органического вещества, подвижная часть которого находится в динамическом равновесии на границе раздела фаз «иловые отложения – вода» [1].

Типичным представителем водной микрофлоры является гетерогенная группа прокариот - магнитотактические бактерии (МТБ) [2, 3]. МТБ уникальны тем, что выращивают кристаллы (магнитосомы) магнитных минералов (магнетит – Fe_3O_4 или грейгит – Fe_3S_4) внутри клетки и используют их для различных целей [4]. Они были найдены в отложениях морских и пресных вод, в прудах, водоемах, реках [5-7]. Некоторые представители МТБ (*Magnetospirillum*) имеют способность к внутриклеточной биоминерализации соединений железа [8].

Возможность селекции и инокуляции МТБ в окружающую среду открывает большие возможности создания принципиально новых биофизических методов очистки сточных вод, осадков и почв от тяжелых металлов, металлоорганических соединений и тяжелых нефтепродуктов [9].

Целью работы явилось исследование природных водоемов Республики Татарстан (РТ) на наличие МТБ.

Р.И. Тухбатова*,

кандидат биологических наук, младший научный сотрудник биолого-почвенного факультета ФГАОУВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»

Э.А. Шишкина,

аспирант, младший научный сотрудник биолого-почвенного факультета ФГАОУВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»

Д.И. Газетдинова,

кандидат биологических наук, ассистент биолого-почвенного факультета ФГАОУВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»



Материалы и методы исследования

Отбор проб из озера Татарское болото и р. Сумка (Большеключинское сельское поселение село Ивановское, Зеленодольский р-н РТ) проводили с помощью дночерпателя с учетом литературных данных и биохимических особенностей МТБ, место обитания которых относится к границе раздела фаз «иловые отложения – вода» [10-12]. Образцы донного осадка помещали в стерильные стеклянные емкости объемом 0.5-1 л, плотно укупоривали пластиковыми крышками.

Для создания модельной системы пробы осадка и воды в соотношении 1:4 помещали в стеклянные и пластиковые сосуды, герметично закрывали резиновыми пробками, создавая микроаэрофильные и анаэробные условия для МТБ [13, 14]. В таком виде образцы выдерживали месяц при комнатной температуре, без доступа света для предотвращения развития фитопланктона, в поле действия постоянного магнита для создания искусственного магнитного поля. При этом

* Адрес для корреспонденции: annatutunjan@yahoo.com

полагали, что скопление клеток МТБ будет происходить в области южного полюса магнита.

Большинство МТБ находятся в природной среде в виде смешанной культуры и некультивируемом состоянии [15]. Сложно выделить их в чистую культуру без использования специальных селективных сред. Для наращивания биомассы МТБ суспензия из магнитной области модельных систем была посеяна на модифицированную синтетическую питательную среду СМТ-2 [16].

Состав среды СМТ-2 (г/л)

ацетат натрия	1
K_2HPO_4	0,5
NH_4Cl	0,1
дрожжевой экстракт	0,1
дистиллированная вода	1 л

В качестве источника железа в среду вносили 50-150 мг/л Fe(III)-цитрата, а в качестве источника углерода использовали ацетат натрия. Среду автоклавировали при температуре 120 °С и давлении 1 ат, рН среды 7,2-7,4.

Морфологию и таксис бактерий изучали с помощью оптической микроскопии препарата «висячая капля» в светлом поле при увеличении 10×125. Для приготовления препарата небольшую каплю суспензии образца наносили на покровное стекло, переворачивали его каплей вниз и помещали на специальное предметное стекло с углублением в центре. Края лунки предварительно смазывали вазелином. Капля оказывалась герметически заключенной во влажной камере.

Для люминесцентной микроскопии суспензию образца наносили микропипеткой 0,01 мл на обезжиренное предметное стекло, распределяя равномерно на площади 4 см² (2×2см). Препараты подсушивали и фиксировали над пламенем горелки, а затем окрашивали 2-4 мин водным раствором акридинового оранжевого (разведение 1:10000). Для микроскопирования на препарат наносили каплю воды и покрывали обезжиренным покровным стеклом. Лишнюю воду удаляли фильтровальной бумагой. Препараты просматривали на флуоресцентном микроскопе Carl Zeiss Axio (увеличение 10×40, EP=450-490нм, FT= 510).

Для молекулярно-генетического анализа бактериального сообщества из иловых образцов донных отложений была выделена тотальная ДНК. Для выделения и очистки ДНК использовали коммерческий кит QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen). Процедура

Ф.К. Алимова,
доктор биологических наук, профессор, научный руководитель, зав. каф. биохимии ФГАОУВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»

Д.К. Нурғалиев,
доктор геолого-минералогических наук, профессор, научный руководитель, проректор по научной деятельности ФГАОУВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»

проведена согласно протоколу производителя. Для определения таксономического положения бактерий проводили анализ последовательности 16S-рибосомального гена. Участки гена 16S рРНК были амплифицированы в реакции ПЦР (полимеразная цепная реакция) и секвенированы с использованием комбинации праймеров: M13 forward (5'-CGC CAG GGT TTT CCC AGT CFC GAC-3') и M13 reverse (5'-TCA CAC AGG AAA CAG CTA TGAC-3') [14]. Поиск в базе данных GenBank нуклеотидных последовательностей, гомологичных в отношении полученных нами, проводили с помощью программы поиска и выравнивания BLAST. Результаты секвенирования обрабатывали при помощи пакета программ Lasergene 5.03 (DNASTAR, Inc., США).

Результаты и их обсуждение

В ходе экспериментов нами было проанализировано 2 образца донного осадка (оз. Татарское болото и р. Сумка). По полученным результатам оптической микроскопии в обоих случаях преобладали спириллы, которые представляют собой клетки спиральной формы с закругленными концами. Размер клеток составил 12-30×3-5 мкм (рис. 1). Все клетки обладали подвижностью.

Для определения таксономического положения бактерий участки гена 16S рРНК были амплифицированы в реакции ПЦР и секвенированы с использованием комбина-

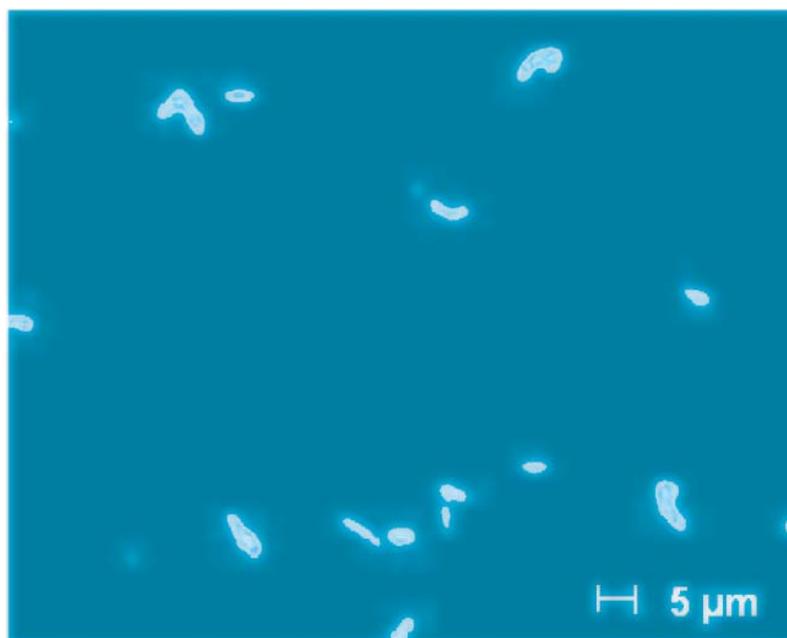


Рис. 1. Флуоресцентное изображение клеток магнитобактерий (краситель – акридиновый оранжевый).

Таблица 1

База данных нуклеотидных последовательностей BLAST

Штамм	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
DR-1	EU809644 1018 bp DNA linear ENV 03-AUG-2008 uncultured <i>Desulfovibrio</i> sp. clone KS-639 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	852	852	99 %	0,0	98 %
DR-2	GQ206312 1461 bp DNA linear ENV 01-JUN-2010 uncultured <i>Azospirillum</i> sp. clone 2A2H7C4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1037	1037	95 %	0,0	92 %
DR-3	EU675666 1454 bp DNA linear BCT 02-JUN-2010 <i>Magnetospirillum</i> sp. QH-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	985	985	98 %	0,0	96 %
DR-4	GQ206312 1461 bp DNA linear ENV 01-JUN-2010 uncultured <i>Azospirillum</i> sp. Clone 2A2H7C4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	571	571	100 %	5e-160	99 %
DR-5	EU675666 1454 bp DNA linear BCT 02-JUN-2010 <i>Magnetospirillum</i> sp. QH-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	839	839	100 %	0,0	98 %
DR-6	EU675666 1454 bp DNA linear BCT 02-JUN-2010 <i>Magnetospirillum</i> sp. QH-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	817	817	99 %	0,0	98 %
DR-7	EU809644 1018 bp DNA linear ENV 03-AUG-2008 uncultured <i>Desulfovibrio</i> sp. clone KS-639 16S ribosomal RNA gene,	828	828	100 %	0,0	100 %

ции праймеров (M13f и M13r), как наиболее отвечающей требованиям идентификации бактерий [2]. После ПЦР-амплификации было выделено 7 риботипов (DR- 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7), которые далее были секвенированы.

Секвенирование вышеуказанных фрагментов позволило нам получить их последовательности и сравнить с нуклеотидными последовательностями ранее описанных и внесенных в базу данных BLAST. Результаты поиска представлены в табл. 1.

Проведенные исследования по установлению таксономического положения выделенных микроорганизмов на основании молекулярно-генетического анализа позволили определить их родовую принадлежность. Таксономический анализ свидетельствует том, что микрофлора донных осадков относится к α -подклассу протеобактерий. Штаммы DR-3, DR-5, DR-6 ближе всего к представителям рода *Magnetospirillum*, обнаруживая с ними 96-98 % гомологию. Штаммы DR-1 и DR7 ближе всего к представителям рода *Desulfovibrio*, обнаруживая с ними 98-100 % гомологию. Штаммы DR-2 и DR4 ближе всего к представителям рода *Azospirillum*, обнаруживая с ними 92-99 % гомологию.

Заключение

Таким образом, показано, что в составе ила и воды природных водоемов Республики Татарстан обитают МТБ. Выделены представители рода *Magnetospirillum*, которые имеют способность к внутриклеточной биоминерализации соединений железа. Полученные данные представляют интерес для дальнейших исследований в области изучения круговорота железа в природе, разработки биотехнологических методов очистки сточных вод, осадков и почв от тяжелых металлов.

Данная работа выполнена в рамках проекта № 6286, в рамках целевой программы «Развитие научного потенциала высшей школы (2009-2010 годы)» мероприятие 2, раздел 2.1, подраздел 2.1.1

Литература

1. Горленко В.М. Экология водных микроорганизмов / В.М. Горленко, Г.А. Дубинина, С.И. Кузнецов // М.: «Наука». 1977. 289 с.

2. Schuler D. Formation of Magnetosomes in Magnetotactic Bacteria // *Mol. Microbiol. Biotechnol.* 1999. V. 1. P. 79–86.
3. Schuler D. Bacterial magnetosomes: microbiology, biomineralization and biotechnological applications / D. Schuler, R.B. Frankel // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1999. V. 52. P. 464–473.
4. Kopp R. E. The identification and biogeochemical interpretation of fossil magnetotactic bacteria / R. E. Kopp, J. L. Kirschvink // *Earth-Science Reviews.* 2008. V. 86(1–4). P. 42–61.
5. Kopp R. E. Chains, clumps, and strings: Magnetofossil taphonomy with ferromagnetic resonance spectroscopy / R. E. Kopp, B. P. Weiss, A. C. Maloof, H. Vali, C. Z. Nash, J. L. Kirschvink // *Earth and Planetary Science Letters.* 2006. V. 247. P. 10–25
6. Blakemore R.P. Magnetotactic bacteria / R.P. Blakemore // *Science.* 1975. V. 190. № 4212. P. 377–379.
7. Spring S. Dominating role of an unusual magnetotactic bacterium in the microaerobic zone of a freshwater sediment / S. Spring, R. Armann, W. Ludwig, K.H. Schlefer, H. Gemerden, N. Petersen // *Appl. And Environ. Microbiol.* 1993. V. 59. № 8. P. 2397-2403
8. Banerjee S. K. Ferrimagnetic properties of magnetite. In: *Magnetite Biomineralization and Magnetoreception in Organisms* / S. K. Banerjee, B. M Moskowitz // Plenum Press, New York and London. 1997. P. 17-41
9. Чертов Н.В. Магнитотактические бактерии водоемов Нижней Волги: дис. ... канд. биол. наук : 03.00.07, 03.00.18 / Чертов Николай Владимирович. М., 2000. 124 с. Библиографию: с. 89-106.
- Ключевые слова:**
донные осадки,
магнитотактические
бактерии
10. Blakemore R.P. Magnetic navigation in bacteria / R.P. Blakemore, R.B. Frankel // *Sci. Am.* – 1982. V. 245. № 6. P. 58-65
11. Kirschvink J.L. South-seeking magnetotactic bacteria / J.L. Kirschvink // *J. Exp. Biol.* 1980. № 86. P. 345–347.
12. Stolz J.F. Magnetosomes / J.F. Stolz // *J. of Gen. Microbiol.*- 1993.- V.139.- P. 1663-1670
13. Heyen U. Growth and magnetosome formation by microaerophilic *Magnetospirillum* strains in an oxygen-controlled fermentor / U. Heyen, D. Schuler // *Appl Microbiol Biotechnol.* – 2003. V. 61. P. 536–544.
14. Nash C. Mechanisms and evolution of magnetotactic bacteria 2008: Thesis for the Degree of Doctor of Philosophy; Defended May 22, 2008 / C. Nash; California Institute of Technology Pasadena. - California, 2008. 138 p.
15. Flies C.B. Combined approach for characterization of uncultivated magnetotactic bacteria from various aquatic environments / C.B. Flies, J. Peplies, D.Schuler // *Applied and environmental microbiology.* 2005. V. 71 № 5. P. 2723–2731.
16. Филина Н.Ю. Биология и экология бактерий, образующих магнитоупорядоченные соединения железа: автореферат ... на соискание канд. биол. наук : М. 1998. 24 с.
17. Bulat, S. A. UP-PCR analysis ITS1 ribotyping of *Trichoderma* and *Gliocladium* fungi / M. Lubeck, N.V. Mironenko, D.F. Jensen, P.S. Lubeck // *Mycol. Res.* 1998. № 102. P. 933-943.

R.I. Tuhbatova, E.A. Shishkina, D.I. Tazetdinova, F.K. Alimova, D.K. Nurgaliev

MAGNETOTACTIC BACTERIA OF NATURAL WATERS OF REPUBLIC OF TATARSTAN

Magnetotactic bacteria were shown to be as a part of silt and water of natural reservoirs in the Republic of Tatarstan. Representatives

of sort *Magnetospirillum* having ability to an endocellular biomineralization of iron compounds have been allocated.

Key words: Magnetotactic bacteria, bottom sediments