

# Ацидобрактерии – неизвестные доминанты наземных экосистем

С.Н.Дедыш, Ю.М.Серкебаева

*„Наибольшее значение имеют наиболее массовые формы, которые в силу их «белизности» остаются на обочине внимания, психологически концептуализируя гостя на экстрапародинарном, сенсационном.*

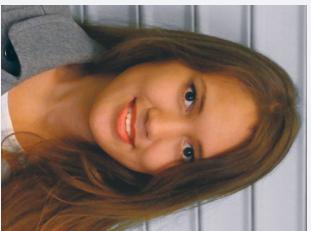
Г.А.Заварзин

Нельзя не согласиться со словами, приведенными в эпиграфе к статье. В самом деле, наше внимание легко привлекает что-то необычное, не укладывающееся в рамки повседневности. Не составляют исключения и естествоиспытатели, старающиеся проникнуть в наиболее отдаленные уголки нашей планеты в поисках экзотических экосистем, неизвестных представителей флоры и фауны, а также микроорганизмов, которым посвящена настоящая статья. Известно, что микробы живут везде, даже там, где в силу физико-химических условий жизни других организмов невозможна. Бытует мнение, что именно в таких экстремальных местообитаниях больше всего неизвестных микроорганизмов, и в поисках нового надо погружаться на дно океана, вскрывать льды Антарктиды или отправляться в долины вулканов и гейзеров.

Это неверно, далеко ходить не надо – достаточно наклониться и взять горсть земли из под ног. В нескольких граммах лежащей на вашей ладони почвы обитает не меньше загадочных и неизвестных микроорганизмов, чем в образце, полученным из какого-либо экзотического местообитания. Установить этот поразительный факт удалось еще в начале 90-х



**Светлана Николаевна Дедыш,** доктор биологических наук, заведующая лабораторией микробиологии болотных экосистем Института микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН. Область научных интересов – микробное разнообразие в северных болотных экосистемах, деструкция биополимеров в болотах, а также функции малоизученных групп бактерий.



**Юлия Муратова Серкебаева,** аспирант той же лаборатории. Занимается изучением молекулярной экологии микроорганизмов.

годов ХХ в., когда для оценки микробного разнообразия стали использовать молекулярные методы. В 1992 г. при изучении микробов в почве впервые применили экстракцию тотальной ДНК и анализ последовательностей генов 16S рРНК [1]. Оказалось, что большинство прочитанных фрагментов ДНК почвенных бактерий обнаруживают лишь очень отдаленное сходство с таковыми у известных микроорганизмов, т.е. принадлежат бактериям новых, неизвестных групп.

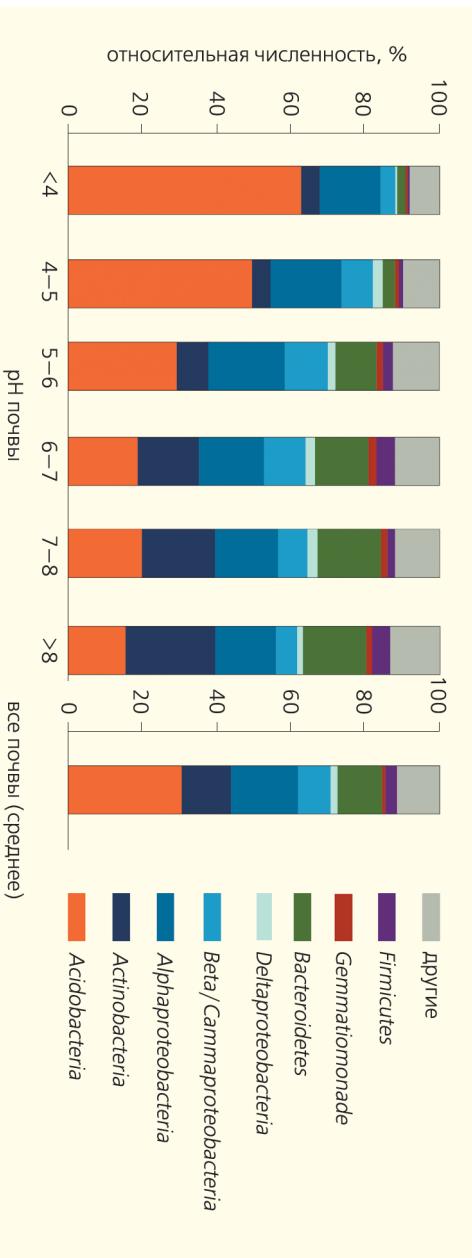
Одна из таких групп почвенных бактерий оказалась самой многочисленной. К концу 90-х годов в ней насчитывались уже несколько сотен расшифрованных нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК. Эти бактерии были обнаружены не только в почвах, но и в осадках пресных водоемов, в горячих источниках, шахтных водах, торфяных болотах и наскольких микробиоценозах. В 1997 г.

эта быстрорастущая группа получила статус новой филии в домене *Bacteria* и была названа *Acidobacteria* [2], созвучно единственному известному на тот момент представителю — ацилобактерии *Acidobacterium capsulatum*. Ее выделили японские микробиологи из кислых дренажных вод рудных отвалов [3]. Означает ли такое название, что все виды этой группы — ацилобактерии? Нет, ацилобактерии весьма разнообразны по физиологическим характеристикам и живут в различных местообитаниях, однако наиболее многочисленны в наземных экосистемах, и в частности в почвах.

## Ацилобактерии — типичные обитатели почв

Тот факт, что *Acidobacteria* — одна из типичных и численно доминирующих групп почвенных бактерий, пока еще не вошел в учебники. объясняется это тем, что классическими методами посева, до недавнего времени традиционно используемыми для изучения микробного населения почвы, обнаружить ацилобактерии нельзя. Они растут гораздо медленнее, чем хорошо известные микробиологам почвенные псевдомонады, бациллы, стрептомицеты и многие другие микробионты. Кроме того, на подавляющем большинстве рутинных питательных сред ацилобактерии и вовсе не могут развиваться. Именно поэтому они так долго оставались неизвестными. Однако с введением в практику молекулярных методов оценки микробного разнообразия стало ясно, что ацилобактерии не только присутствуют во всех без исключения почвах, но и в ряде случаев составляют доминирующую группу.

Особенно ярко это было продемонстрировано с помощью одного из современных и точных мето-

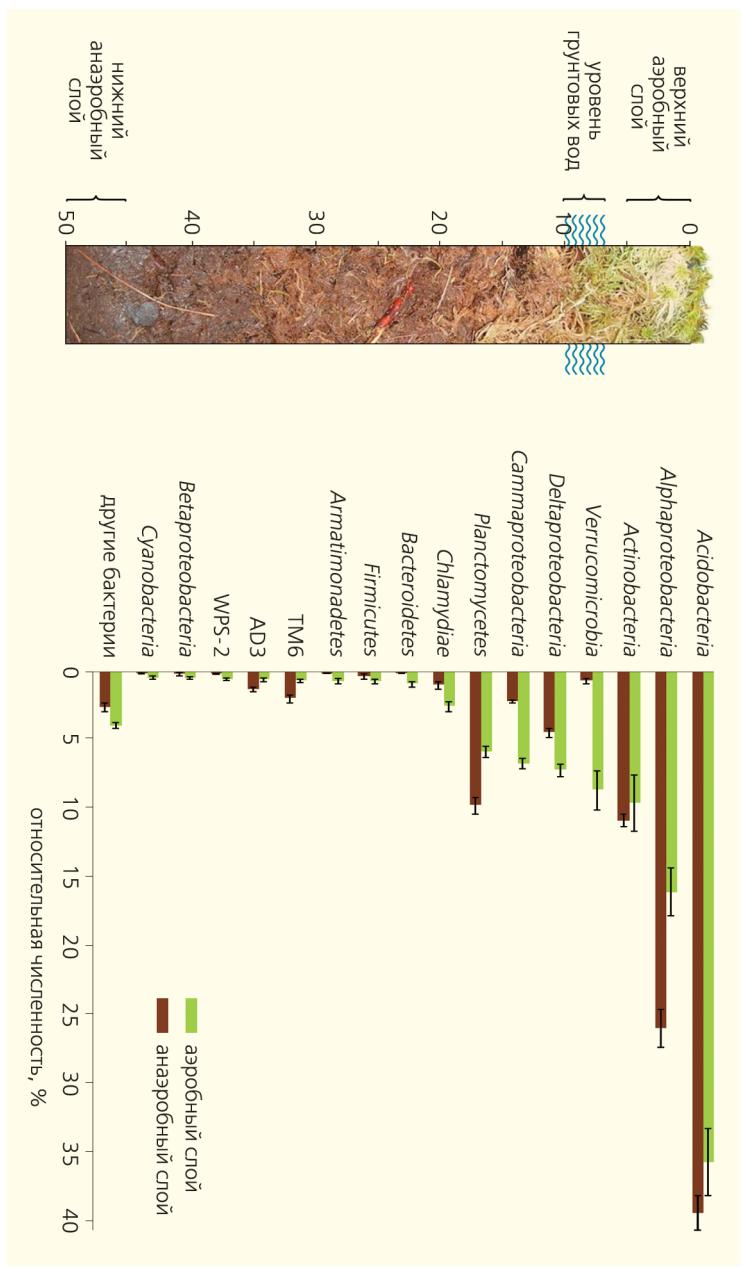


\* Пиро секвенирование — метод определения последовательности нуклеотидов в ДНК путем синтеза комплементарной цепи, когда присоединение каждого нуклеотида сопровождается регистрацией высвобождающегося пирофосфата.

дов оценки микробного разнообразия — пиро секвенирования\* рибосомальных генов — своеобразных молекулярных «паспортов» микроорганизмов. Этот метод позволяет считывать информацию с сотен тысяч микробных «паспортов», т.е. фактически делать перепись микробного населения исследуемого образца. Таким способом группа американских микробиологов провела масштабный анализ бактериального населения 88 почв из различных географических зон США. В результате выяснилось, что на долю ацилобактерий приходится от 15 до 60% всех полученных из образцов почв последовательностей генов 16S rRNA [4]. Наиболее многочисленны ацилобактерии были в кислых почвах (рН менее 5), тогда как в нейтральных и слабощелочных чистенное преимущество переходило к другим группам прокариот, например к актинобактериям.

Много ли в России кислых почв? Ответ, несомненный для неспециалиста, — да. На самом деле таких почв (с рН менее 6) в нашей стране большинство; преимущественно это почвы болотных экосистем (рН от 3,5 до 5) [5]. Их микробные сообщества и стали в нашей лаборатории главным объектом исследований. Мы применили метод пиро секвенирования генов 16S rRNA для изучения бактериального разнообразия в торфе кислотного сфагнового болота, типичного для севера России [6]. Самой многочисленной группой болотного микробного сообщества оказались ацилобактерии: на их долю в верхнем, аэробном, слое залежи приходилось около 35% всех проанализированных фрагментов ДНК и около 39% — в анаэробном, затопленном водой пласте торфа на глубине 10 см.

Соотношение числа нуклеотидных последовательностей генов 16S rRNA филогетических групп бактерий по данным молекулярного анализа микробного разнообразия почв с различными значениями рН [4].



Состав микробных сообществ в торфе сфагнового болота по данным пиро секвенирования генов 16S рРНК [6]. Слева — профиль болота и зоны отбора образцов (отмечены фигурными скобками). Справа — соотношение числа нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК различных филогенетических групп бактерий в аэробном и анаэробном слоях сфагнового болота.

бине 0,5 м. Иными словами, ацидо-бактерии были доминантами бактериального сообщества как в аэробной, так и в анаэробной части профиля болота.

Чтобы увидеть клетки ацидо-бактерий непосредственно в торфе, мы воспользовались другим молекулярным методом — гибридизацией *in situ* с флуоресцентно-мечеными олигонуклеотидными зондами (метод FISH; fluorescent *in situ* hybridization). Зонд NoAc-1402, который специфически связывается с клетками ацидо-бактерий, позволил наблюдать компактные микроколонии или диффузные скопления этих бактерий на частичках полуразложившегося растительного материала. Судя по выявленному зондом клеткам, численность ацидо-бактерий в болотах достаточно высока — достигает десятков миллионов клеток в грамме торфа [7]. Почек же эта группа так плохо изучена и почему доступно так мало культур этих бактерий?

Микрофотографии клеток ацидо-бактерий в сфагновом торфе. Слева — визуализация бактерий с помощью метода FISH (гибридизация с флуоресцентно-меченым зондом NoAc-1402, стрелками показаны связавшиеся с ним клетки); справа — окраска всех присутствующих в торфе клеток ДНК-специфичным красителем ДАФИ. Здесь и далее фото авторов

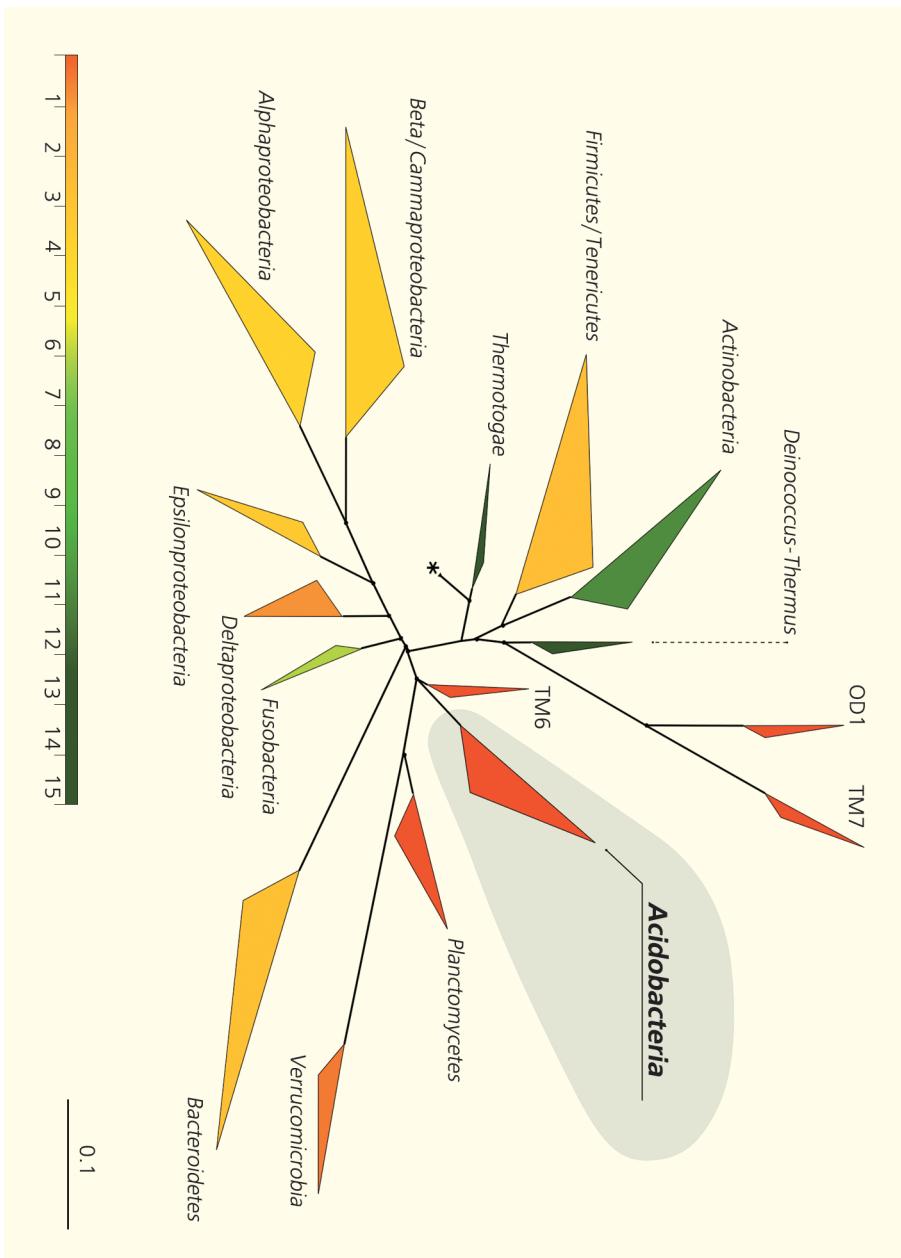
## Секреты культивирования ацидобактерий

Сразу поясним, что Acidobacteria — далеко не единственная филогенетическая группа в пределах Bacteria, которая остается малоизученной из-за недостатка культивируемых видов. Таких групп довольно много: из типичных для почв и торфов бактерий можно упомянуть verrucomicroбий (*Verrucomicrobia*) и планктонмистов (*Planctomycetes*). Большая часть содержащихся ныне в GenBank нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК этих бактерий была получена в виде клонов и принадлежит формам, не выделенным пока в чистых культурах. Последовательности генов известных видов составляют лишь ничтожную часть природного разнообразия этих бактерий. Существуют, конечно, так называемые группы-кандидаты, в которых вообще нет культивируемых представителей. Они не имеют латинских наименований, а обозначаются буквенно-цифровыми индексами (например, TM6, TM7 и OD1).

Контраст же составляют достаточно хорошо изученные филогенетические линии бактерий, представителей которых микробиологи научились сравнительно неплохо культивировать (такие как *Aciпovabacteria*).

Как уже упоминалось, ко времени формального описания группы Acidobacteria в 1997 г. имелся лишь единственный охарактеризованный вид. К 2000 г. число таковых увеличилось до трех, сегодня же их не более двух десятков. Выделение и описание новых ацидобактерий происходило крайне медленно, несмотря на то что в последнее десятилетие разработаны молекулярные методы детекции этих микроорганизмов.

Еще совсем недавно для мирового научного сообщества микробиологов ключевым оставался вопрос о принципиальной возможности культивирования почвенных ацидобактерий. Положительный ответ на него получили австралийские микробиологи, которые раскрыли ряд «скретлов», позволяющих выращивать эти бактерии в лаборатории.



рии [8]. Оказалось, что необходимо, во-первых, уменьшить концентрацию веществ в питательных средах в сотни и тысячи раз по сравнению с рутинными средами; во-вторых, лучше использовать слабокислые (рН 4,5–5,5), нежели нейтральные (рН 6,5–7,5) среды; и, наконец, увеличить время инкубации посевов — от традиционных нескольких дней до нескольких месяцев. Значит, выделение ацидобактерий требует большого терпения.

Затем американские и немецкие микробиологи описали два рода типичных почвенных ацидобактерий — *Terriglobus* и *Edaphobacter*. Будучи умеренными ацидофильными аэробными гетеротрофами, они в качестве субстратов роста используют сахара и различные гетерополисахариды. Совсем недавно из аридных почв саванны изолировали и описали ацидобактерий рода *Blastocatella*. Эти мезофильные аэробы растут на комплексных белковых субстратах. Вот, собственно, и все выделенные из почв ацидобактерии.

## Ацидобактерии из болот

Настало время рассказать и об успехах российских микробиологов в непростом деле культивирования и изучения ацидобактерий. Задегая вперед, скажем, что половина их таксонов, известных сегодня, описана в нашем институте сотрудниками лаборатории микробиологии болотных экосистем.

Началась эта работа менее 10 лет назад, когда с помощью молекулярного анализа в микробных сообществах сфагновых болот обнаружили доминирующую группу прокариот — Acidobacteria [9]. Стала очевидной задача получить лабораторные культуры и изучить свойства этих микроорганизмов. Только как подступиться к поискам бактерий, о которых почти ничего не известно? Никто из российских микробиологов ранее с ацидобактериями не работал. Кроме нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК этих организмов мы не располагали ни информацией о морфологии клеток, ни данными об их субстратах или условиях роста. На помощь пришел упомянутый уже метод FISH с флуоресцентно-меченым зондом Ноаc-1402, специфичным для определения ацидобактерий. Его мы и использовали в нашей работе как своеобразный навигатор.

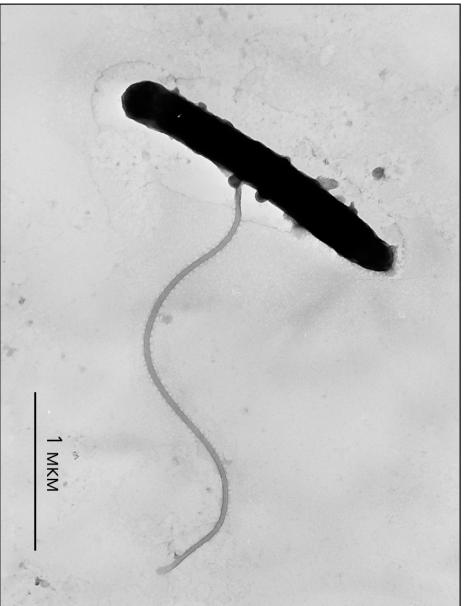
Прежде всего, чтобы понять, какие среды нужны для выделения этих микроорганизмов, в экспериментах определяли их субстратные предпочтения. В образцы торфа вносили сахара, органические кислоты, спирты, полисахариды и проверяли отклик — возрастание численности клеток. В контролльный вариант добавляли лишь воду без субстрата. После инкубации в течение нескольких дней количество клеток, специфически связывающихся с зондом Ноаc-1402, увеличилось только в образцах торфа с глюкозой и некоторыми полисахарами (пектином, ксиланом и крахмалом) [7]. По-

скольку глюкозу используют очень многие быстро растущие бактерии (они легко обгоняют рост ацидобактерий на лабораторных средах), то выбирать ее селективным субстратом для Acidobacteria не стоило. Больше подходили различные гетерополисахариды растительного происхождения, в том числе пектин и ксилан, на которых расстут далеко не все бактерии. В приготовлении питательных сред мы отказались от агар-агара, традиционно используемого микробиологами в качестве отвердителя, и заменили его полисахаридом микробного происхождения — фитагелем. Эти и ряд других модификаций в составе сред и условий инкубации более точно воспроизводили условия жизни микроорганизмов в болотах. Имеющийся у нас инструмент (метод FISH) позволял проследить развитие ацидобактерий в лабораторных культурах и проверить, подходит ли им выбранные нами условия. Такая стратегия себя полностью оправдала, и мы получили около двух десятков изолятов ацидобактерий разных видов. Их принадлежность к роду Acidobacteria подтверждена определением нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК. Что же представляют собой эти микроорганизмы и каковы их свойства?

## Типичные представители и их свойства

Один из наиболее интересных видов болотных ацидобактерий — выделенный Т.А.Ланкратовым *Tellatosphaer bradus* [10]. Палочковидные клетки этой бактерии снабжены толстым и довольно длинным жгутиком, позволяющим мигрировать в профиле болота, следуя колебаниям уровня воды и занимая подходящую по условиям экологии нишу. Развивается тельматобактер в микроаэробных и анаэробных условиях, т.е. в затопленной водой части болота. *T. bradus* — это первая ацидобактерия, для которой была доказана способность разлагать целлюлозу, один из основных компонентов фитомассы растений. Особое значение имеет тот факт, что это свойство проявляется в анаэробных условиях: тем самым бактерия получает преимущество в конкуренции с мицелиальными грибами — целлюлозолитиками, активными только в аэробных условиях. Существуют и другие, неподобные на тельматобактер болотные ацидобактерии-целлюлозолитики. У них иная морфология клеток и они предпочитают расти в аэробных условиях, но, как и тельматобактер, входят в состав гидролитического микробного сообщества болот [11].

Иные экологические функции у другой болотной ацидобактерии — *Bryobacter aggregatus*, которую выделила И.С.Куличевская [12]. Эта аэробная бактерия утилизирует галактуроновую и глюкуроновую кислоты — характерные компоненты клеточной стенки сфагновых мхов, образующиеся при их разложении.

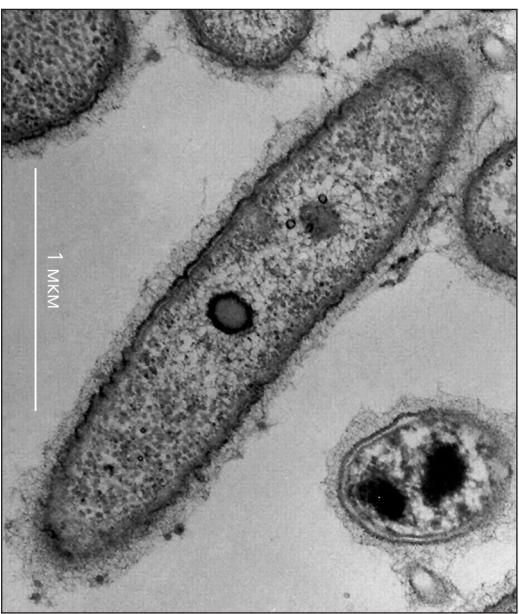


**болотные ацидобактерии целлюлозолитики.** Слева — *Telmatobacter bradus*, живущий в затопленной водой части болотного профиля и мигрирующий вслед за колебаниями воды с помощью жгутика [10]. Справа — пока не имеющая латинского названия и отличающаяся от тельматобактера морфологически ацидобактерия (штамм CC0287), которая предпочитает аэробные условия [11].

Еще одна функция ацидобактерий — деструкция клеточных полисахаридов других микроорганизмов. Клетки многих микробов (в том числе азотфиксирующих и метанотрофных бактерий), населяющих кислые сфагновые болота, покрыты хорошо развитыми слизистыми капсулами. В ассоциации с такими организмами часто обнаруживаются ацидобактерии, но их роль в сообществе остается неясной. Ацидобактерия *Bryoscella elongata* изолирована из ассоциации с болотным метанотрофом *Methylocapsus acidiiphila* [13]. В отличие от него, *Belongata* не растет на C1-соединениях (метане или метаноле), но может развиваться в совместной культуре, используя капсульные полисахариды метанотрофа в качестве источника углерода. Способность бриоцеллы гидролизовать полисаха-

риды микробного происхождения легко увидеть, если посеять ее на среду, где утилизатором углерода является единственным источником углерода служит фитатель — экзополисахарид, синтезируемый *Sphingomonas elodea*. Растущие колонии бриоцеллы погружаются в среду за счет гидролиза полисахарида. Интересно, что на ультратонких срезах клеток *Belongata* выявлены темные включения — гранулы, судя по результатам рентгеновского микронализма, содержащие фосфор, кальций и железо. Эта находка указывает на возможную роль бриоцеллы в биохимических превращениях железа в болотах. Однако проверка этого предположения требует дальнейших исследований.

Изучение физиологии и свойств перечисленных болотных ацидобактерий заложило основу



Ацидобактерия *Bryoscella elongata*, гидролизующая полисахариды микробного происхождения. Слева — ее колонии, обра- зующие «кратеры» на среде с фитателем; справа — ультратонкий срез клетки.

понимания их экологических функций в экосистемах. По всей видимости, эти медленно растущие, но хорошо адаптированные к обитанию в кислых и холодных болотах бактерии играют роль деструкторов полимеров растительного и микробного происхождения. Иными словами, составляют важный компонент гидролитического микробного сообщества сфагновых болот. Хорошо изученные микробиологами активные гидролитики-нейтрофилы, такие как цианофаги, бациллы, клостридины, не способны размножаться в кислых сфагновых болотах, белых доступными формами азота. Их место занимают ацидобактерии, которые осуществляют процессы деструкции очень медленно, чем и объясняется накопление неразложившихся растворительных остатков и образование торфа.

\* \* \*

Подводя итог нашему рассказу, следует признать, что, несмотря на успехи последних лет в культивировании и изучении Acidobacteria, пока давляющее большинство представителей этой группы еще не изучены. О том, что они, несомненно, имеют нераскрытый функциональный потенциал, говорит недавнее сенсационное сообщение об обнаружении в горячем источнике хлорофиллодержащей, фотосинтезирующей ацидобактерии [14]. Что еще таит в себе пока ускользающее от микробиологов и остающееся неисследованым разнообразие ацидобактерий? Ответ на этот вопрос еще предстоит найти современному поколению микробиологов. ■

## Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований. Проект №09-04-00004.

### Литература

1. Liesack W, Stackebrandt E. Occurrence of novel groups of the domain Bacteria as revealed by analysis of genetic material isolated from an Australian terrestrial environment // J. Bacteriol. V.174. P.5072–5078.
2. Ludwig W, Bauer SH, Bauer M. et al. Detection and in situ identification of representatives of a widely distributed new bacterial phylum // FEMS Microbiol. Lett. 1997. V.153. P.181–190.
3. Kishimoto N, Kosako Y, Tano T. *Acidobacterium capsulatum* gen. nov., sp. nov.: an acidophilic chemoorganotrophic bacterium containing menaquinone from acidic mineral environment // Curr. Microbiol. 1991. V.22. P.1–7.
4. Laufer CL, Hamady M, Knight R. et al. Pyrosequencing-Based Assessment of Soil pH as a Predictor of Soil Bacterial Community Structure at the Continental Scale // Applied and Environmental Microbiology. 2009. V.75. P.5111–5120.
5. Land resources of Russia. CD-ROM database created by International Institute for Applied Systems Analysis. RAS. 2002.
6. Serkebaeva YM, Kim Y, Liesack W, Dedysb S.N. Pyrosequencing-based assessment of the Bacteria diversity in surface and subsurface peat layers of a northern wetland, with focus on poorly studied phyla and candidate divisions // PLOS ONE. 2013. V8(5). P.63994.
7. Pankratov TA, Serkebaeva YM, Kulichevskaya IS. et al. Substrate-induced growth and isolation of Acidobacteria from acidic sphagnum peat // The ISME Journal. 2008. V.2. P.551–560.
8. Sait M, Hugenholtz P, Janssen PH. Cultivation of globally distributed soil bacteria from phylogenetic lineages previously only detected in cultivation-independent surveys // Environmental Microbiology. 2002. V.4. P.654–666.
9. Dedysb S.N., Pankratov TA, Belova S.E. et al. Phylogenetic analysis and in situ identification of Bacteria community composition in an acidic sphagnum peat bog // Applied and Environmental Microbiology. 2006. V.72. P.2110–2117.
10. Pankratov TA, Kirsanova LA, Kaparullina EN. et al. *Telmatobacter bradus* gen. nov., sp. nov., a cellulolytic facultative anaerobe from subdivision 1 of the Acidobacteria and emended description of *Acidobacterium capsulatum* Kishimoto et al. 1991 // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2012. V.62. P.430–437.
11. Pankratov TA, Ivanova A.O., Dedysb S.N. et al. Bacterial populations and environmental factors controlling cellulose degradation in an acidic sphagnum peat // Environmental Microbiology. 2011. V.13. P.1800–1814.
12. Kulichevskaya IS, Suzina NE, Liesack W. et al. *Bryobacter aggregatus* gen. nov., sp. nov., a peat-inhabiting, aerobic chemoorganotroph from Subdivision 3 of the Acidobacteria // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2010. V.60. P.301–306.
13. Dedysb S.N., Kulichevskaya IS, Serkebaeva YM. et al. *Bryocella elongata* gen. nov., sp. nov., a novel member of subdivision 1 of the Acidobacteria isolated from a methanotrophic enrichment culture and emended description of *Edaphobacter aggregans* Koch et al. // International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology. 2008. V.62. P.654–664.
14. Bryant D.A., Costas AMG., Maresca JA. et al. Chloracidobacterium termophilum an aerobic phototrophic Acidobacterium // Science. 2007. V.317. P.523–526.