

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ СОСТАВ ГОРНЫХ ПОРОД ПРИМОРСКОГО КРАЯ: ЧИСЛЕННОСТЬ, РАЗНООБРАЗИЕ, ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

Е.Г. Лебедева, Д.А. Русакова

Дальневосточный геологический институт ДВО РАН,
Проспект 100 лет Владивостоку 159, г. Владивосток, 690022,
e-mail: microbiol@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6654-8165>;
e-mail: dashka93.1993@mail.ru

Показано, что изученные горные породы содержат высокое количество физиологических групп бактерий и дрожжей. Среди выделенных культивируемых микроорганизмов в грунтах Приморского края преобладали представители рода *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhodotorula*, *Paenibacillus*, *Stenotrophomonas*. Среди изолятов преобладали непигментированные, подвижные, каталазоположительные и оксидазоотрицательные палочки. Для всех культур был характерен высокий уровень внеклеточной ферментативной активности.

Ключевые слова: горные породы, бактерии, численность, биоразнообразие.

MICROBIOLOGICAL COMPOSITION OF ROCKS IN PRIMORSKY KRAI: ABUNDANCE, DIVERSITY, PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL PROPERTIES

E.G. Lebedeva, D.A. Rusakova

It was shown that the studied rocks contain a high number of physiological groups of bacteria and yeast. Among the isolated culturable microorganisms in the soils of Primorsky Krai, representatives of the genera *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhodotorula*, *Paenibacillus*, *Stenotrophomonas* prevailed. Among the isolates, non-pigmented, motile, catalase-positive and oxidase-negative rods predominated. All cultures were characterized by a high level of extracellular enzymatic activity.

Keywords: rocks, bacteria, abundance, biodiversity.

Введение

Горные породы служат средой обитания для множества микроорганизмов, которые приспособились к повышенному уровню ультрафиолетового излучения, экстремальным факторам и нехватке воды. Они обитают в различных осадочных породах, таких как песчаники, известняки, гипс, доломит, карбонаты и галит [3]. Кроме того, микробная колонизация была обнаружена на магматических породах, таких как гранит, игнимбрит и базальт [5]. Согласно предыдущим исследованиям, на колонизацию горных пород микроорганизмами влияют физические и химические свойства горных пород, такие как структура пор, минеральный состав и проницаемость, а также факторы окружающей среды, такие как климатические условия, источники питательных веществ и наличие воды [9]. Несмотря на то,

что микроорганизмы, колонизирующие горные породы, широко распространены в различных географических регионах, очень мало информации о том, какие микробные сообщества населяют горные породы Приморского края. Горные породы Приморского края значительно обогащены редкоземельными элементами [8], что может значительно влиять на структуру микробных сообществ. В связи с ограниченной информацией целью работы было изучить микробиологический состав горных пород Приморского края с оценкой численности, культивируемого разнообразия и некоторых свойств бактерий.

Материалы и методы

Пробы горных пород отбирали в Ольгинском и Тернейском районе Приморского края в 2025 г. Всего было отобрано 9 проб горных пород. Пробы горных пород L 1-1 и L-4 представляли собой сухие мелкодисперсные частички серо-черного цвета. Пробы L1-2, L4, L5 были представлены увлажненным грунтом разного цвета (темно-серый, зеленый с черными вкраплениями, песочный) внешне похожим на глину. Горные породы, отобранные из Тернейского района Приморского края внешне были идентичны и представлены мелкодисперсными фракциями увлажненного грунта бежевого и салатного цвета.

Пробы горных пород отбирали в стерильные одноразовые контейнеры, соблюдая условия стерильности. Образцы до обработки хранили в анаэробных условиях в холодильнике при 4 °С не более 12 часов. В пробах горных пород определяли численность физиологических групп микроорганизмов методом предельных десятикратных разведений. Результаты оценивали методом наиболее вероятного числа по таблице Мак-Креди. Посевы осуществляли в трех повторностях. Микроорганизмы выращивали в термостате при температуре 25 °С в течение 7–20 суток. Анаэробные формы бактерий культивировали в анаэроостате с использованием газогенерирующих пакетов BD GasPak EZ. Морфологию, размеры, подвижность выделенных чистых культур микроорганизмов исследовал и с использованием светового микроскопа AxioStar plus (Carl Zeiss, Германия), оснащенного фотодокументирующей системой Axiovision и фазово-контрастной приставкой (x1000). Подвижность, тип клеточной стенки бактерий, определение продукции культурами окислительно-восстановительных ферментов проводилось стандартными методами [1]. Также исследовали протеолитическую, липазную, лецитиназную, пектиназную, амилазную и целлюлазную внеклеточную ферментативную активность штаммов [2].

Идентификацию доминирующих культур гетеротрофных микроорганизмов осуществляли с использованием молекулярно-генетического анализа гена 16S РНК. Для этого концентрировали биомассу, полученную от единичных колоний. Геномную ДНК выделяли с помощью метода на основе гексадецилтриметиламмония бромида [6]. ПЦР амплификацию 16S rDNA проводили с использованием праймеров p27f 5'AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG и p1524r 5'AAG GAG GTG ATC CAR CCG CA [7], а для амплификации ITS1 использовали ITS-s 5'AGG AGA

AGT CGT AAC AAG G и ITS-a 5'TCC TCC GCT TAT TGA TA TGC [10].

Результаты и обсуждения

Как показали исследования, проведенные нашими коллегами, минералогические свойства исследуемых горных пород, в целом, очень схожи между собой. Во всех них отмечено присутствие цеолитов (клиноптилолит-гейландит) – от 14,5 до 49,9% и глин (смектит, иллит и каолинит) – от 10 до 41,9% с явным преобладанием смектита. В ряду минеральных примесей повсеместно преобладают полевые шпаты (альбит и микроклин) и кварц. Судя по концентрации растворимых главных оксидов, во всех образцах значительно преобладает кремний, так же отмечаются сравнительно высокие концентрации алюминия, калия, железа и натрия, концентрации марганца, и фосфора, наоборот, незначительные. Среди микроэлементов преобладают Sr, Zr, Rb и Zn. Обращает на себя внимание, повышенное во всех исследуемых горных породах содержание редкоземельных элементов [8]. При этом во всех грунтах отмечены наиболее высокие концентрации лантана, церия, неодима и тория.

Численность физиологических групп микроорганизмов в пробах горных пород, отобранных в Ольгинском районе Приморского края варьировала от $0,4 \times 10^2$ до $4,4 \times 10^8$ КОЕ/гр, при этом отмечено значительное преобладание органотрофных бактерий, литотрофные бактерии практически отсутствовали. В изученных грунтах отмечена высокая численность микроорганизмов цикла углерода и азота, а так же силикатных бактерий (табл. 1). В цикле углерода в горных породах преобладали сапрофитные бактерии и микроорганизмы-гидролитики, что указывает на происходящие процессы разложения органического вещества. В цикле серы только в пробе грунта L-5 отмечена невысокая численность сульфатредуцирующих бактерий ($4,5 \times 10^3$ КОЕ/г), что указывает на происходящие процессы восстановления сульфатов до сероводорода. Количество силикатных бактерий в грунтах Ольгинского района варьировало от $1,2 \times 10^3$ до $6,4 \times 10^6$, наибольшее число отмечено в пробе L-5, характеризующийся наиболее высокими концентрациями кремния (табл. 1). Во всех изученных пробах грунта, отобранных в Ольгинском районе (кроме L-4) отмечено достаточно высокое количество дрожжей. Их численность варьировала от $1,4 \times 10^3$ до $4,5 \times 10^6$. При этом преобладал один морфологический тип дрожжей: розовые, гладкие, блестящие колонии с ровным краем. В среднем, численность различных групп микроорганизмов в пробах горных пород Тернейского района была несколько выше, по сравнению с таковой в Ольгинском районе. Микрофлора горных пород Тернейского района характеризовалась сравнительно высокой численностью сахаро- и амилолитических, а также липолитиков (табл.). Кроме того, только в пробе № Т-2 была обнаружена способность микроорганизмов к гидролизу целлюлозы. В отношении участников геохимического цикла азота для всех проб было характерно относительно высокая численность азотфиксирующих бактерий ($1,5 \times 10^4$ – $3,0 \times 10^5$ КОЕ/г) и отсутствие автотрофных нитрификаторов, что совпадает с данными, получен-

ными по Ольгинскому району (табл.). В образцах грунтов Тернейского района были выявлены как сульфатредукторы, так и тионовые бактерии, хотя их численность была так же невысока: в пробе № Т-1 отмечено присутствие обеих групп ($1,5 \times 10^2$ и $0,9 \times 10^2$ кл/г соответственно); в пробе № 27 – только сульфатредукторов ($9,5 \times 10^3$ кл/г); № 47 – только тионовых ($9,5 \times 10^2$ кл/г); проба № 48, в свою очередь, не содержала ни одной из групп. Участники геохимического цикла железа и марганца присутствовали в пробах № Т-5 ($1,2 \times 10^4$; $5,2 \times 10^3$) и Т-4 ($7,2 \times 10^2$; $1,6 \times 10^3$). Численность силикатных бактерий отличалась довольно большим разбросом показателей ($8,6 \times 10^3$ – $1,2 \times 10^9$ КОЕ/гр).

Таблица

Численность доминирующих физиологических групп микроорганизмов
в горных породах Приморского края (кл/мл)

Table

The number of dominant physiological groups
of microorganisms in rocks Primorsky Krai (cl/ml)

Название пробы	Аэробные сапрофиты	Анаэробные сапрофиты	Аммонификаторы	Амилолитики	Сахаролитики	Азотфиксаторы	Силикатные бактерии
Ольгинский район							
L-5	$7,2 \times 10^6$	$3,9 \times 10^6$	$8,4 \times 10^6$	$3,0 \times 10^6$	$2,5 \times 10^6$	$5,6 \times 10^5$	$6,4 \times 10^6$
L-2	$8,7 \times 10^6$	$9,0 \times 10^5$	$1,8 \times 10^6$	$4,8 \times 10^6$	$9,5 \times 10^3$	$1,6 \times 10^6$	$8,0 \times 10^4$
L-4	$2,2 \times 10^2$	$0,7 \times 10^2$	0	0	$0,4 \times 10^2$	$2,4 \times 10^3$	$1,2 \times 10^3$
L1-1	$4,4 \times 10^8$	$3,4 \times 10^6$	0	$4,0 \times 10^6$	$1,5 \times 10^5$	$9,2 \times 10^6$	$1,1 \times 10^4$
L1-2	$6,2 \times 10^6$	$4,8 \times 10^5$	$7,5 \times 10^2$	$2,5 \times 10^4$	$2,5 \times 10^3$	$5,0 \times 10^3$	$6,3 \times 10^4$
Тернейский район							
T-5	$2,6 \times 10^7$	$9,0 \times 10^6$	$2,2 \times 10^4$	$8,8 \times 10^5$	$4,5 \times 10^7$	$2,3 \times 10^4$	$8,6 \times 10^3$
T-1	$1,1 \times 10^8$	$1,0 \times 10^8$	0	$1,1 \times 10^5$	$9,5 \times 10^3$	$1,5 \times 10^4$	$5,5 \times 10^6$
T-4	$2,5 \times 10^7$	$1,8 \times 10^7$	$1,2 \times 10^6$	$5,0 \times 10^3$	$1,5 \times 10^6$	$3,0 \times 10^5$	$2,3 \times 10^7$
T-2	$5,3 \times 10^6$	$5,0 \times 10^5$	$3,0 \times 10^4$	$3,4 \times 10^5$	$2,5 \times 10^5$	$1,5 \times 10^5$	$1,2 \times 10^9$

В целом, горные породы характеризовались не высоким разнообразием гетеротрофных микроорганизмов, что связано с низкой концентрацией органических веществ. Наибольшее разнообразие таксонов микроорганизмов отмечено в горных породах L-5, T-1, T-4, наименьшее выявлено в образцах L1-2, T-2, N-4. В разных горных породах состав микроорганизмов отличался. Для горных пород Ольгинского района было характерно доминирование бактерий рода *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Paenibacillus*. В породах Тернейского района Приморского края отмечено преобладание микроорганизмов рода *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*. Изучение морфологии, подвижности и типа клеточной стенки выделенных культур показано, что среди гетеротрофной микрофлоры, изолированной из горных пород, доминировали непигментированные, подвижные (33,3–70%) палочки (66,7–90%). Соотношение бактерий с разным типом клеточной стенки варьировалось для каждой пробы, но в целом соотношение

грам-положительных (16,7–83,3%) и грам-отрицательных (16,7–83,3%) бактерий было примерно одинаковым. Исследование продукции окислительно-восстановительных ферментов микробными штаммами, выделенными из горных пород показало, что среди выделенных изолятов (76 шт.) преобладали каталазоположительные (89,5%) и оксидазоотрицательные (76,3%) бактерии. Проверка внеклеточной ферментативной активности коллекционных штаммов гетеротрофных бактерий показала, что 75% из них обладали желатиназной активностью, 60–65% амилолитической и пектинолитической, 40% – липолитической и целлюлазной, а протеолитической и лецитиназной – всего 5%. Уреазау активность проявляли 45% изолятов.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 25-27-00265.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Лысак В.В., Желдакова Р.А., Фомина О.В. Микробиология практикум. Минск: БГУ, 2015. 115 с.
2. Нетрусов А. И., Егорова М. А., Захарчук Л. М. Практикум по микробиологии : Учебное пособие для студентов высших учебных заведений М.: Академия, 2005. 608 с.
3. Büdel B. Ecology and diversity of rock-inhabiting cyanobacteria in tropical regions // Eur. J. Phycol. 1999. Vol. 34. P. 361–370.
4. Cockell C.S. Olsson K., Knowles F. et al. Bacteria in weathered basaltic glass, Iceland. Geomicrobiol. J. 2009. Vol. 26. P. 491–507.
5. Fajardo-Cavazos P., Nicholson W. Bacillus endospores isolated from granite: close molecular relationships to globally distributed Bacillus spp. from endolithic and extreme environments // Appl. Environ. Microbiol. 2006. Vol. 72. P. 2856–2863.
6. Kiselev K.V., Dubrovina A.S., Tyunin A.P. The methylation status of plant genomic DNA influences PCR efficiency // J. Plant. Physiol. 2015. Vol. 175. P. 59–67.
7. Lane D.J. 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt E., Goodfellow M. (eds) Nucleic acid techniques in bacterial systematics. John Wiley and Sons, Chichester. 1991. P. 115–175.
8. Panichev A.M., Baranovskaya N.V., Seryodkin I.V., Chekryzhov I. Yu., Vakh E.A., Soktoev B. R., Belyanovskaya A.I., Makarevich R.A., Lutsenko T.N., Popov N.Yu., Ruslan A.V., Ostapenko D.S., Vetoshkina A.V., Aramilev V.V., Kholodov A.S., Golokhvast K.S. Landscape REE anomalies and the cause of geophagy in wild animals at kudurs (mineral salt licks) in the Sikhote-Alin (Primorsky Krai, Russia) // Environ. Geochem. Health. 2022. Vol. 44. P. 1137–1160.
9. Uroz S., Calvaruso C., Turpault M.P., et al. Mineral weathering by bacteria: ecology, actors and mechanisms // Trends Microbiol. 2009. Vol. 17. P. 378–387.
10. White T.J., Bruns T.D., Lee S., Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal genes form phylogenetics. In: Innis MA, Gelfrand DH, Sninsky JJ, White TJ, editors. PCR protocols. San Diego, California, USA: Academic Press. 1990. P. 315–322.

REFERENCES:

1. Lysak V.V., ZHeldakova R.A., Fomina O.V. *Mikrobiologiya praktikum*. Minsk: BGU, 2015. 115 p.
2. Netrusov A. I., Egorova M. A., Zaharchuk L. M. *Praktikum po mikrobiologii : Uchebnoe posobie dlya studentov vysshih uchebnyh zavedenij* M.: Akademiya, 2005. 608 p.
3. Büdel B. Ecology and diversity of rock-inhabiting cyanobacteria in tropical regions // *Eur. J. Phycol.* 1999, vol. 34, pp. 361–370.
4. Cockell C.S. Olsson K., Knowles F. et al. Bacteria in weathered basaltic glass, Iceland. *Geomicrobiol. J.* 2009, vol. 26, pp. 491–507.
5. Fajardo-Cavazos P., Nicholson W. Bacillus endospores isolated from granite: close molecular relationships to globally distributed Bacillus spp. from endolithic and extreme environments // *Appl. Environ. Microbiol.* 2006, vol. 72, pp. 2856–2863.
6. Kiselev K.V., Dubrovina A.S., Tyunin A.P. The methylation status of plant genomic DNA influences PCR efficiency // *J. Plant. Physiol.* 2015, vol. 175, pp. 59–67.
7. Lane D.J. 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt E., Goodfellow M. (eds) *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley and Sons, Chichester. 1991, pp. 115–175.
8. Panichev A.M., Baranovskaya N.V., Seryodkin I.V., Chekryzhov I. Yu., Vakh E.A., Soktoev B. R., Belyanovskaya A.I., Makarevich R.A., Lutsenko T.N., Popov N Yu., Ruslan A.V., Ostapenko D.S., Vetoshkina A.V., Aramilev V.V., Kholodov A.S., Golokhvast K.S. Landscape REE anomalies and the cause of geophagy in wild animals at kudurs (mineral salt licks) in the Sikhote-Alin (Primorsky Krai, Russia) // *Environ. Geochem. Health.* 2022, vol. 44, pp. 1137–1160.
9. Uroz S., Calvaruso C., Turpault M.P., et al. Mineral weathering by bacteria: ecology, actors and mechanisms // *Trends Microbiol.* 2009, vol. 17, pp. 378–387.
10. White T.J., Bruns T.D., Lee S., Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal genes form phylogenetics. In: Innis MA, Gelfrand DH, Sninsky JJ, White TJ, editors. *PCR protocols*. San Diego, California, USA: Academic Press. 1990, pp. 315–322.