

УДК 579.222;579.266;579.844

## АЦИДОБАКТЕРИИ В МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВАХ БОЛОТНЫХ И ТУНДРОВЫХ ЛИШАЙНИКОВ

© 2012 г. Т. А. Панкратов<sup>1</sup>

Учреждение Российской академии наук Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН, Москва  
Поступила в редакцию 03.12.2010 г.

Исследованы бактериальные сообщества лишайников сфагнового болота Карелии и тундры Воротинской области. Численность бактерий филогенетической группы *Acidobacteria* в талломах живых и разлагающихся лишайников достигала  $3.8 \times 10^8$  кл./г, а доля от общего числа бактерий – 6–32%. Из образцов живых и разлагающихся талломов лишайников получены чистые культуры ацидобактерий. Десять из них идентифицированы и отнесены к подгруппе 1 филогенетической группы *Acidobacteria*. Исследована гидролитическая активность двух штаммов, выделенных из живой зоны и зоны деструкции таллома лишайника. Они были способны к росту на ксилане, крахмале, пектине, ламинарине и лишайниковом экстракте. Впервые установлено, что ацидобактерии являются постоянным и многочисленным компонентом микробных сообществ болотных и тундровых лишайников.

**Ключевые слова:** лишайники, *Acidobacteria*, деструкция полисахаридов, сфагновые болота, тундра.

Бореальные ландшафты России в значительной мере представлены болотными экосистемами и тундрами. Площадь болотных массивов в России оценивается в 1.6 млн. км<sup>2</sup>, а тундровые территории занимают 2.4 млн. км<sup>2</sup> (13% территории) [1]. Значительная доля этих площадей покрыта кустистыми и листоватыми эпигейными лишайниками. Эта группа симбиотических организмов давно привлекала внимание микробиологов. В 1930-е годы российскими учеными было показано наличие в талломах лишайников азотфиксирующих бактерий, в частности *Azotobacter* [2]. Интерес к лишайникам возник вновь в работах зарубежных исследователей в 2000-е годы с применением молекулярных методов. В них талломы лишайников рассматриваются как места обитания новых видов бактерий [3] и концентраторы азотфиксирующих бактерий [4]. В талломе лишайника *Cladonia arbuscula* около 13% всех клеток бактерий, учтенных с использованием флуоресцентного красителя акридинового оранжевого, оказались неидентифицированными [5]. В микробных сообществах того же лишайника были обнаружены культивируемые бактерии с хитиноподобными, глюканолитическими и протеолитическими свойствами, способностью к образованию индоллил-3-уксусной кислоты [6].

Ходкинсон и Луцони [7], исследуя молекулярными методами бактерии, ассоциированные с лишайником *Cladonia arbuscula*, обнаружили в составе библиотек клонов последовательности генов

16S рРНК, принадлежащих филогенетической группе *Acidobacteria*.

*Acidobacteria* – это группа трудно культивируемых бактерий, выделенных в отдельный филум в 1992 г. вскоре после описания ее первого представителя – *Acidobacterium capsulatum* [8]. За 18 лет филогенетическая группа *Acidobacteria* пополнилась лишь 6 новыми родами и 10 видами. Обилие клонов ацидобактерий, обнаруженных в экосистемах с широкой амплитудой физико-химических факторов, позволило сделать вывод об их широком распространении во всех типах наземных экосистем [9]. Несмотря на это, выделение и поддержание чистых культур ацидобактерий, которые относятся к так называемым трудно культивируемым организмам, остается сложной задачей.

В 2006 г. на разлагающемся талломе лишайника *Cladonia* sp., собранного на сфагновом болоте Бакчар Томской области, нами были обнаружены обильные бактериальные разрастания красного цвета. Выделение из них чистых культур бактерий привело к описанию нового рода и вида ацидобактерий *Granulicella paludicola* [10], обладающего рядом гидролитических свойств. Этот факт послужил отправной точкой для исследования процессов микробной деструкции талломов лишайников и поиска в них гидролитических ацидобактерий.

Целью данной работы был анализ бактериальных сообществ эпигейных, болотных лишайников, произрастающих на севере России – Карелии и в заполярной тундре, получение чистых культур ацидобактерий и выявление у них гидролитической активности.

<sup>1</sup> Автор для корреспонденции (e-mail: tpankratov@mail.ru).

Таблица 1. Характеристики образцов

Номер	Образец	Описание	pH водной вытяжки гомогената
1	<i>Cladonia</i> sp., верхняя часть	Верховое болото “Верхнее”, Карелия	3.8
2	<i>Cladonia</i> sp., зона деструкции	“_”	4.0
3	Торф	<i>Sphagnum</i> sp., Верховое болото “Верхнее”, Карелия	4.0
B7	<i>Cladonia rangiferina</i> , верхняя часть	Воркута, Тальник, сайт № 1	4.8
B8	<i>C. rangiferina</i> , зона деструкции	“_”	6.7
B9	Торф	<i>Polytrichum uniperinum</i> , Воркута, Тальник, сайт № 1	7.2
B10	<i>C. rangiferina</i> , верхняя часть	Воркута, Тальник, сайт № 2	5.0
B11	<i>C. rangiferina</i> , зона деструкции	“_”	5.1
B12	Торф	<i>Sphagnum papillosum</i> , Воркута, Тальник, сайт № 2	5.1
B13	<i>Sphaerophorus globosa</i> , верхняя часть	Воркута, Тальник	4.5
B14	<i>S. globosa</i> , зона деструкции	“_”	5.3
B15	Торф	<i>Sphagnum</i> sp., Воркута, Тальник	5.3

### ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Образцы** лишайников и торфа были отобраны в 2009 г. в окрестностях Беломорской биологической станции (ББС, 66°33' N; 33°06' E), на верховом болоте озера “Верхнее” и в 2010 г. вблизи станции Тальник (67°19' N; 63°44' E) Воркутинской области. Талломы лишайников были изъяты целиком и далее транспортировались в стерильных пластиковых стаканах для сохранения их целостности. В лаборатории талломы разделяли на три части: верхняя живая часть, средняя часть на стадии разложения, торф под талломом. Каждый образец лишайника был осмотрен и разделен стерильными ножницами согласно степени разложения таллома на 2 части – живой таллом и таллом в стадии деструкции. Торф под лишайником был освобожден от фрагментов таллома и обработан отдельно. Водные экстракты образцов имели величину pH от 3.8 до 7.2 (табл. 1). Наиболее низкими величинами pH характеризовались верхние, живые части лишайников.

**Фиксация.** 1 г материала помещали в пакет для обработки на гомогенизаторе и добавляли 20 мл дистиллированной воды. Экстракцию микробных клеток проводили с использованием гомогенизатора “MiniMix” (модель 100, “Interscience”, Франция) в течение 10 мин при максимальной интенсивности, и прилагающихся к нему стерильных пакетов BagFilter<sup>®</sup>, разделенных на два отделения внутренней фильтрующей вставкой. 5 мл суспензии отбирали для определения величины pH. Другую аликвоту суспензии объемом 0.5 мл помещали в стерильную пробирку (V = 1.5 мл) и центрифугировали при 5000 g в течение 5 мин. Надосадочную жидкость отбрасывали, а осадок заливали 1 мл формальдегида (4% раствор) в PBS буфере: NaCl – 8.0 г, KCl – 0.2 г, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 1.44 г, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 0.2 г, H<sub>2</sub>O – 1 л, pH 7.0. Фиксацию проводили в течение

1.5 ч, периодически перемешивая суспензию. Формальдегид удаляли центрифугированием (5000 g, 5 мин), а осадок дважды промывали PBS буфером. Полученный осадок ресуспендировали в 0.5 мл этанола (50%) и хранили при –20°C до использования.

**Общая численность и FISH.** Определение общей численности бактерий в образцах и гибридизацию с олигонуклеотидными зондами проводили согласно ранее описанной процедуре [11]. Подсчет клеток проводили с использованием флуоресцентного микроскопа AxioPlan Imaging (“Zeiss”, Германия) в 40 полях зрения для каждого образца.

**Выделение изолятов.** Культуры бактерий получали прямым посевом из образцов на питательные среды LE1 и M3. LE1: экстракт лишайников *Cladonia* и *Cetraria*, полученный нагреванием при 115°C под давлением (100 г сухих талломов, 1000 мл дистиллированной воды), gellan-gum – 10 г, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O – 0.8 г. M3: крахмал – 0.5 г, глюкоза – 0.5 г, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O – 0.04 г, KН<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 0.1 г, казаминные кислоты – 0.1 г, дрожжевой экстракт – 0.1 г, NaNO<sub>3</sub> – 0.02 г, Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> – 0.02 г, дистиллированная вода – 1 л, gellan-gum – 10 г. 80 мг MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O добавляли в каждые 100 мл среды для полимеризации gellan-gum. Величина pH сред была 4–5.

**Идентификацию изолятов** осуществляли путем секвенирования гена 16S рРНК. Для экстракции ДНК изолятов использовали модификацию ранее описанного метода, основанного на применении додецилсульфата натрия (SDS) в качестве лизирующего агента [12]. ПЦР-амплификацию генов 16S рРНК проводили с использованием универсальных для эубактерий праймеров 9f и 1492r [13] на термоциклере PE GeneAmp PCR System 9700 (“Perkin-Elmer Applied Biosystems”, США). Нуклеотидные последовательности амплифицированных фрагментов определяли на секвенаторе ABI

**Таблица 2.** Общая численность клеток бактерий, выявленных окраской ДАФИ, и численность представителей наиболее репрезентативных групп бактерий, идентифицированных путем гибридизации с группоспецифичными зондами ALF46 (*Alphaproteobacteria*: AlphaPB), BET42a (*Betaproteobacteria*: BetaPB), HGC69 (*Actinobacteria*) и HoAc1402 (*Acidobacteria*)

Номер	Общая численность (ДАФИ), $N \times 10^8$	Численность наиболее репрезентативных групп бактерий ( $N \times 10^8$ ) Доля от общей численности микроорганизмов (%)			
		AlphaPB	BetaPB	<i>Actinobacteria</i>	<i>Acidobacteria</i>
1	44.1 ± 7.3	6.6 ± 1.8 15	0.2 ± 0.1 <1	20.7 ± 9.8 47	3.8 ± 1.1 9
2	79.1 ± 15.3	4.3 ± 1.3 5	0.7 ± 0.3 1	10.9 ± 3.9 14	6.4 ± 2.1 8
3	10.1 ± 1.9	1.1 ± 0.7 9	0.4 ± 0.1 3	12.2 ± 4.2 78	1.3 ± 0.5 10
B7	7.8 ± 1.4	1.8 ± 0.7 22	0.3 ± 0.1 4	0.1 ± 0.1 1.5	1.9 ± 1.2 24
B8	19.8 ± 2.8	2.9 ± 1.0 15	2.0 ± 1.0 11	0.4 ± 0.2 2	1.2 ± 0.8 6
B9	28.45 ± 9.2	3.0 ± 0.9 11	2.3 ± 0.8 8	0.1 ± 0.1 <1	1.6 ± 0.8 6
B10	5.7 ± 1.2	3.4 ± 1.3 59	0.2 ± 0.1 5	0.03 ± 0.03 <1	1.2 ± 0.7 20
B11	11.6 ± 5.4	0.9 ± 0.3 8	0.3 ± 0.2 2	0.2 ± 0.2 2	3.7 ± 1.7 32
B12	17.4 ± 5.9	1.9 ± 1.3 11	0.4 ± 0.3 2	0.2 ± 0.2 1	1.8 ± 1.1 10
B13	12.8 ± 1.9	6.3 ± 2.1 49	0.2 ± 0.1 2	0.04 ± 0.04 <1	1.1 ± 0.4 9
B14	15.5 ± 5.6	4.6 ± 2.4 30	0.4 ± 0.2 2	0.2 ± 0.1 1	3.3 ± 1.3 21
B15	18.2 ± 6.6	2.7 ± 1.3	0.5 ± 0.2	0.2 ± 0.1	1.3 ± 0.5

377A (“Perkin-Elmer Applied Biosystems”, США). Сравнение нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК болотных изолятов с таковыми в базе данных GenBank проводили с использованием программы Blast2 (<http://www.ebi.ac.uk/blast2/>). Определенные в работе последовательности генов 16S рРНК изолятов депонированы в GenBank.

**Рост на полимерах, олигосахаридах и моносахарах.** 1 мл суспензии клеток с оптической плотностью 0.05–0.1 (спектрофотометр Cary 50-Scan, “Varian”, 600 нм) добавляли к 20 мл среды М3. Затем во флаконы носили 1 мл раствора или водной суспензии коллоидного хитина, коллоидной целлюлозы, лишайнана, пуллулана, ламинарина, крахмала, пектина и ксилана до их конечной концентрации 0.5–1 г/л. Основные компоненты среды М3 вносили в водный экстракт лишайников, полученный приведенным ранее способом. Для оценки способности к гидролизу олигосахаридов и росту на моносахарах использовали целлобиозу, раффинозу, мальтозу, трегалозу, ацетилглюкозамин и глюкозу (0.5 г/л). Отрицательным контро-

лем служила среда М3 без добавления полимеров и сахаров. Инкубацию проводили во флаконах объемом 120 мл в течение 2 недель. Способность к использованию полимеров и сахаров как источников углерода оценивали измерением интенсивности дыхания растущей культуры [14].

## РЕЗУЛЬТАТЫ

**Анализ общей численности.** Численность бактерий в образцах варьировала в зависимости от степени разложения таллома и типа субстрата, на котором рос лишайник. Наибольшая численность бактерий характерна для разлагающегося таллома лишайника *Cladonia* sp. из сфагнового болота озера “Верхнее” ( $79 \times 10^8$  кл./г), а наименьшая – для живой части тундрового лишайника *Cladonia rangiferina* ( $5.7 \times 10^8$  кл./г) (табл. 2). Для болотных лишайников выявлена тенденция к увеличению общей численности бактерий в зоне разложения таллома и снижению в сфагновом торфе. Эта разница могла достигать 12%. Для тундровых образцов характерно

постепенное увеличение общей численности бактерий от верхней части таллома к торфу. При этом максимальная разница ( $\Delta N = 20.65 \times 10^8$  кл./г) обнаружена в образце из бугорковой тундры. Именно в нем наиболее резко изменяется величина pH: от 4.8 в живой части таллома до 7.2 в субстрате (табл. 1). Численность бактерий неразрушенной зоны болотного лишайника в 3–8 раз превышала количество бактерий, населяющих тот же локус тундровых лишайников.

**Выявление доминирующих групп бактерий методом FISH.** Применение групповых олигонуклеотидных зондов позволило обозначить доминирующие группы бактерий в талломах лишайников и в субстрате под ними. Наиболее многочисленными оказались представители *Alphaproteobacteria*, *Actinobacteria* и *Acidobacteria*. Независимо от происхождения образца максимальная численность альфапротеобактерий отмечена в живой части лишайника. Их доля в составе бактериального сообщества варьирует от 15 до 59% в болотном и тундровом образце соответственно (табл. 2). Численность бактерий этой группы в разлагающемся талломе колеблется от 0.9 до  $4.6 \times 10^8$  кл./г и от 5 до 30% от общей численности. Близкие величины характерны для торфа.

Актинобактерии представляли доминирующую группу в торфе (78%) и живом талломе (47%) образцов из верхового болота озера “Верхнее”. В зоне деградации они менее многочисленны – 14% от общего числа учтенных бактерий (табл. 2). В тундровых образцах актинобактерии являются минорным компонентом бактериальных сообществ (1–2%).

Вклад представителей подгруппы *Betaproteobacteria* был невелик во всех образцах. Наибольшее количество клеток, идентифицированных зондом ВЕТ42а, пришлось на зону разложения лишайника тундрового образца и составило в абсолютном значении  $2.0 \times 10^8$  кл./г или 11% всего микробного населения. Минимальное количество бетапуртеобактерий найдено в образцах из сфагнового болота –  $0.2–0.7 \times 10^8$  кл./г (табл. 2).

Численность бактерий группы *Bacteroidetes* оказалась на уровне  $0.2–1 \times 10^8$  кл./г (менее 2% от общей численности). Представители групп *Gammaproteobacteria* и *Firmicutes* оказались минорными участниками ассоциаций, а в ряде случаев они не могли быть достоверно идентифицированы.

Численность метаболически активных клеток, принадлежащих филогенетической группе *Acidobacteria*, была не менее  $1.8 \times 10^8$  кл./г и 6% от общего количества клеток. Максимальное количество клеток ацидобактерий отмечено на уровне  $3.8 \times 10^8$  кл./г в живой зоне лишайника из сфагнового болота, а максимальная доля – в составе бактериального сообщества зоны деградации тундрового образца (32%) (табл. 2).

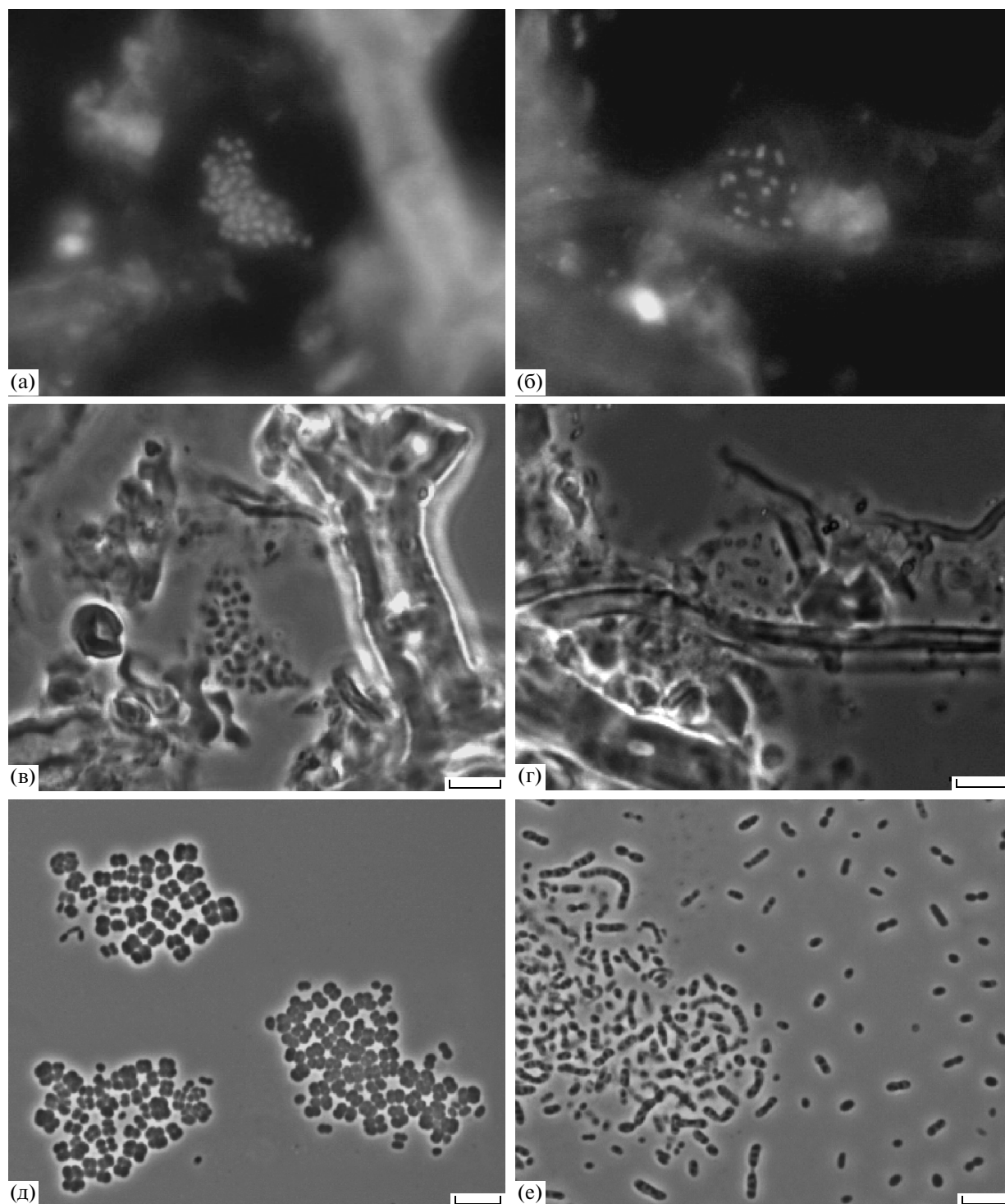
#### Локализация и морфология ацидобактерий.

Клетки ацидобактерий были представлены короткими палочками, лежащими поодиночке или организованными в агрегаты или микроколонии (рис. 1а–1г). Чаще всего встречались агрегаты, адсорбированные на поверхности интактных и деградирующих гиф микобионта, реже – рассеянные одиночные клетки. Часто клетки ацидобактерий были погружены в капсульный матрикс, своего рода “мешок”, содержащий клетки разного возраста (рис. 1г).

#### Выделение и характеристика чистых культур.

Следующей задачей было выделение ацидобактерий из разлагающихся и живых частей таллома *Cladonia* путем прямого высева на среды с экстрактом лишайников или с крахмалом. После двух недель инкубации при 15°C было выявлено обилие мелких ( $d = 0.5–2$  мм) колоний, которые имели круглую форму и слизистую консистенцию. Из более чем 100 колоний было отобрано 50, содержащих морфологически однородные клетки. Для проверки чистоты и принадлежности штаммов к группе *Acidobacteria* была проведена гибридизация с зондом НоАс1402. Для 10 наиболее типичных и часто встречающихся колоний проведена дополнительная проверка на чистоту методом посева на плотные питательные среды. Установление их филогенетического положения проводилось посредством определения нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК (табл. 3). Все они были отнесены к первой подгруппе филогенетической группы *Acidobacteria*. Наиболее филогенетически близкими таксономически описанными видами были *Acidobacterium capsulatum* и *Granulicella aggregans*. Четыре из 10 штаммов обладали сходной морфологией и на 98–100% были близки к описанному нами новому роду и виду *Granulicella aggregans* [10]. Три штамма (К5, С27, В1415) были морфологически и филогенетически близкими к выделенному нами ранее штамму ССО287 (*Acidobacterium polymorpha*) из целлюлозолитического сообщества сфагнового болота Обуховское [15]. Штамм СU2 (рис. 1д) был на 95–96% близок к описанной недавно *Acidipila rosea* [16]. Штаммы СЕ1 и СЕ14 были сходны по нуклеотидным последовательностям гена 16S рРНК на 99%, но фенотипически отличались. Клетки штамма СЕ1 (рис. 1е) в массе были бесцветными, культура в жидкой среде росла негетерогенно. Колонии штамма СЕ14 были окрашены в розовый цвет, в жидкой среде культура росла гетерогенно. Оба штамма имели максимальный уровень сходства с *A. capsulatum* (95%).

Для выявления гидролитических способностей полученных изолятов нами были отобраны два штамма – СU2 и СЕ1. Первый был выделен из верхней (живой) части лишайника *Cladonia* sp. (сфагнового болота), а второй – из разлагающегося таллома *Cladonia* sp.



**Рис. 1.** Микроколонии ацидобактерий в гомогенате живой (а, в) и разлагающейся (б, г) части лишайника *Cladonia* sp. Детекция с флуоресцентно-меченым олигонуклеотидным зондом HoAc1402 (а, б), фазовый контраст (в, г). Фазово-контрастные микрофотографии штаммов CU2 (д) и CE1 (е) при росте на ксилане. Масштаб – 5 мкм.

Наиболее интенсивно гидролитическая активность обеих культур проявлялась в отношении ксилана и крахмала. Максимальная величина интенсивности дыхания при росте штамма CE1 на ксилане и крахмале достигала 3.1 и 2.3 мкг С–СО<sub>2</sub> мл<sup>-1</sup>

жидкой среды соответственно. Штамм CU2 рос медленнее – 0.8 мкг С–СО<sub>2</sub> мл<sup>-1</sup>. Рост на лишайнике, пектине, ламинарине был умеренным, а на хитине, целлюлозе и пуллулане практически отсутствовал (рис. 2). Штамм CU2 отличался от штамма

**Таблица 3.** Филогенетическая принадлежность штаммов, полученных из образцов лишайников сфагнового болота “Верхнее” и тундрового лишайника путем высева на плотные питательные среды

Штамм	Номер депонирования в GBank	Источник выделения/среда	Микроорганизм с наибольшим уровнем сходства гена 16S рРНК	
			Вид	% сходства
CE1	JF490071	<b>Болото “Верхнее”</b> Разлагающаяся часть лишайника <i>Cladonia</i> /МЗ крахмал	<i>Acidobacterium capsulatum</i>	95
CS23	Нет		<i>Granulicella aggregans</i>	100
CS07	Нет	Разлагающаяся часть лишайника <i>Cladonia</i> /МЗ экстракт лишайника	<i>G. aggregans</i>	98
C27	JF490072		<i>G. aggregans</i>	95
C02	Нет		<i>G. aggregans</i>	99
CE14	Нет		<i>A. capsulatum</i>	95
K5	JF490073		<i>A. capsulatum</i>	93
CU2	JF290434	Живая часть лишайника <i>Cladonia</i> /МЗ экстракт лишайника	<i>Acidipila rosea</i>	94.7
C1	Нет	<b>Воркута, Тальник</b> Разлагающаяся часть лишайника <i>Cladonia</i> /МЗ экстракт лишайника	<i>G. aggregans</i>	99
V1415	Нет		<i>A. capsulatum</i>	96

CE1 по его способности расти на лишайниковом экстракте с той же эффективностью, что и на ксилане ( $0.9 \text{ мкг C-CO}_2 \text{ мл}^{-1}$ ). Исследуемые культуры были протестированы на способность к гидролизу олигосахаридов (раффинозы, целлобиозы, трегалозы и мальтозы) и использованию моносахаров (глюкозы и N-ацетилглюкозамина). Штамм CE1 интенсивно рос на целлобиозе, N-ацетилглюкозамине и глюкозе (рис. 2в), тогда как штамм CU2 мог расти только на раффинозе, обнаруживая крайне низкую интенсивность дыхания (рис. 2г).

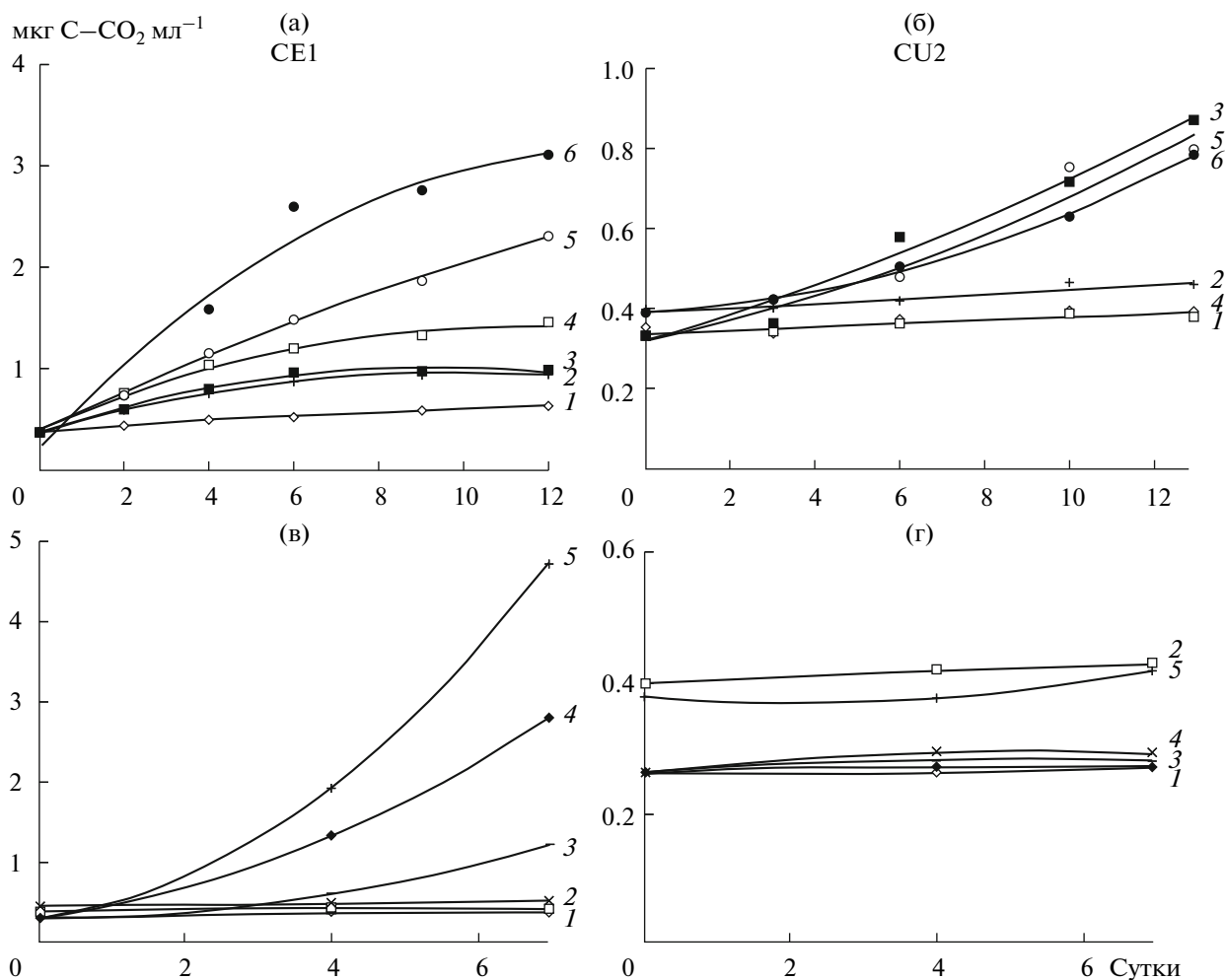
## ОБСУЖДЕНИЕ

Общая численность бактерий болотных и тундровых лишайников на 1–2 порядка превышала численность бактерий, обнаруженных Кардинале и соавторами в образцах лишайника *Cladonia arbuscula*, собранных в горах Австрии [5]. Такой результат не вызывает удивления, поскольку водный режим местообитаний сравниваемых ассоциаций лишайников различен. Обитающие на болотах и в бугорковой тундре лишайники обеспечены не только дождевой, но и поступающей из болота капиллярной водой. Такой тип увлажнения способствует более активному росту таллома лишайника и более интенсивной деструкции отмерших микробных клеток. Увеличение общего количества клеток бактерий в грунте или торфе тундровых образцов по сравнению с талломом носит закономерный характер из-за изменения величины pH и уровня минерализации грунта. Напротив, в болотных образцах численность бактерий в торфе снижается из-за уменьшения концентрации солей и доступных для потребления субстратов.

Возрастание численности бактерий, населяющих таллом лишайника, вероятно увеличивает и количество прокариот, способных к азотфиксации. Высокая численность альфапротеобактерий во всех изученных нами образцах лишайников подтверждает многочисленные данные об их доминировании [4–7]. Согласно нашим данным они особенно многочисленны в растущих частях талломов лишайников, где наиболее активно протекает процесс фотосинтеза у фикобионта. Фактически – это “царство” микрофлоры рассеяния, которая, как известно, представлена главным образом бактериями порядка *Rhizobiales: Hyphomicrobiales: Bradyrhizobiaceae, Xanthobacteraceae*.

Обилие актинобактерий в образцах также не является неожиданным [17]. В наших работах ранее было показано, что актинобактерии в сфагновых болотах являются одной из наиболее численно значимых групп и отвечают за процессы деструкции целлюлозы и других полимерных компонентов растительной массы [18]. Об отсутствии или низкой численности в талломах лишайников представителей филогенетических групп *Gamma* и *Betaproteobacteria*, а также *Firmicutes* сообщалось ранее [5, 6]. Как показано в ряде работ, лишайники содержат набор биологически активных полисахаридов, кислот, хинонов и гликопептидов [19, 20]. В сумме эти соединения являются факторами специфической селекции бактерий и эволюции микробных сообществ в таких “медленных биологических реакторах” как лишайники.

Присутствие большого количества метаболически активных клеток ацидобактерий в микробных сообществах лишайников позволяет предположить, что низкие температуры, низкие значения pH и наличие доступных полисахаридов являются



**Рис. 2.** Кумулятивные кривые дыхания при росте культур CE1 и CU2 на полимерах (а, б) и сахарах (в, г). Обозначения: а, б: 1 – контроль, 2 – пектин, 3 – экстракт лишайника, 4 – ламинарин, 5 – крахмал, 6 – ксилан; в, г: 1 – контроль, 2 – раффиноза, 3 – N-ацетилглюкозамин, 4 – глюкоза, 5 – целлобиоза. Стандартная ошибка измерений во всех случаях не превышала 5% от средней величины.

главными селективными факторами для развития именно этой группы. Ацидобактерии являются субдоминирующей бактериальной группой как в живых, так и в разлагающихся частях таллома лишайника.

Выделение ацидобактерий в чистые культуры из лишайников бореальной зоны доказывает тот факт, что их “некультивируемость” является следствием низкой скорости роста, а также субстратной специфичности, проявляемой в отношении олиго- и полисахаридов. Интересно, что культура, полученная из апикальной зоны лишайника, обладала гораздо менее выраженной гидролитической активностью и низкой скоростью роста как на сахарах, так и на полимерах, в то время как штамм, выделенный из зоны деструкции лишайника, обладал высокой гидролитической активностью и рос быстро как на полимерах, так и на сахарах. И вместе с тем, культура из живой части ли-

шайника проявляла большую гидролитическую активность в отношении лишайникового экстракта, чем штамм, выделенный из зоны деструкции. Время генерации медленно растущих ацидобактерий сопоставимо со скоростью роста таллома лишайника и составляет несколько суток. Такие скорости роста характерны и для других доминирующих в лишайниках групп бактерий, например, представителей порядка *Rhizobiales* и актинобактерий. Лишайники – это медленно растущие симбиотические организмы, и скорость роста таллома должна коррелировать со скоростью разложения отмирающих частей лишайников.

В данной работе впервые с использованием метода FISH показана высокая численность бактерий филогенетической группы *Acidobacteria* в лишайниках болотных и тундровых ассоциаций. Ацидобактерии являются постоянным и многочисленным компонентом бактериальных сообществ.

ществ как живой части таллома лишайников, так и зоны их деструкции. Их высокую численность можно связать с рядом сочетающихся факторов: скоростью роста лишайников, режимом увлажнения в зоне их роста, низкой величиной рН, разнообразием олиго- и полисахаридов в составе таллома, наличием антибиотических веществ. Обнаружение большого количества метаболически активных клеток ацидобактерий в растущих и деградирующих частях талломов лишайников севера России представляет большой теоретический и практический интерес. По этой причине экологические и таксономические исследования *Acidobacteria* в лишайниках бореальной и тундровой зон России должны быть продолжены.

Работа выполнена при финансовой поддержке программ фундаментальных исследований Президиума РАН “Молекулярная и клеточная биология”, проекта Минобрнауки “Современные технологии оценки функционального разнообразия микробных сообществ биосферно-значимых экосистем России” и проекта РФФИ 09-04-00004-а. Автор благодарит к.б.н. Ю.Ю. Берестовскую за предоставленные образцы тундровых лишайников, д.б.н. А.Б. Цетлина, инженера О.А. Грум-Гржимайло за содействие в работе на Беломорской биологической станции МГУ и академика Г.А. Заварзина за обсуждение материалов статьи.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кудяров В.Н., Демкин В.А., Комаров А.С. Природная и антропогенная эволюция почв, круговорот углерода в ландшафтах в связи с изменениями климата и катастрофическими явлениями // Изменение окружающей среды и климата. 2008. Т. 4. С. 13–35.
2. Генкель П.А., Южакова Л.А. Азотфиксирующие бактерии в лишайниках // Изв. Биол. инст. Пермск. гос. ун-та. 1936. В. 10. С. 9–10.
3. Li B., Xie C.H., Yokota A. *Nocardioides exalbidus* sp. nov., a novel actinomycete isolated from lichen in Izu-Oshima Island, Japan // Actinomycetologia. 2007. V. 1. P. 22–26.
4. Liba C.M., Ferrara F.I.S., Manfio G.P., Fantinatti-Garbuggini F., Albuquerque R.C., Pavan C., Ramos P.L., Moreira-Filho C.A., Barbosa H.R. Nitrogen-fixing chemo-organotrophic bacteria isolated from cyanobacteria-deprived lichens and their ability to solubilize phosphate and to release amino acids and phytohormones // J. Appl. Microbiol. 2006. V. 101. № 5. P. 1076–1086.
5. Cardiale M., Jr J.V.C., Müller H., Berg G., Grube M. In situ analysis of the bacterial community associated with the reindeer lichen *Cladonia arbuscula* reveal predominance of *Alphaproteobacteria* // FEMS Microbiol. Ecol. 2008. V. 66. P. 63–71.
6. Grube M., Cardinale M., Jr J.V.C., Müller H., Berg G. Species-specific structural and functional diversity of bacterial communities in lichen symbioses // ISME J. 2009. V. 3. P. 1105–1115.
7. Hodkinson B.P., Lutzoni F. A microbiotic survey of lichen-associated bacteria reveals a new lineage from the *Rhizobiales* // SYMBIOSIS. 2009. V. 49. P. 163–180.
8. 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.
9. Barns S.M., Takala S.L., Kuske C.R. Wide distribution and diversity of members of the bacterial kingdom *Acidobacterium* in the environment // Appl. Environ. Microbiol. 1999. V. 65. P. 1731–1737.
10. Pankratov T.A., Dedysh S.N. *Granulicella paludicola* gen. nov., sp. nov., *G. pectinivorans* sp. nov., *G. aggregans* sp. nov. and *G. rosea* sp. nov., novel acidophilic, polymer-degrading acidobacteria from *Sphagnum* peat bogs // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2010. V. 60. P. 2951–2959.
11. Панкратов Т.А., Белова С.Э., Дедыш С.Н. Оценка филогенетического разнообразия прокариотных микроорганизмов в сфагновых болотах методом FISH // Микробиология. 2005. Т. 74. № 6. С. 831–837.
12. Dedysh S.N., Panikov N.S., Tiedje J.M. Acidophilic methanotrophic communities from *Sphagnum* peat bogs // Appl. Environ. Microbiol. 1998. V. 64. № 3. P. 922–929.
13. Weisburg W.G., Barns S.M., Pelletier D.A., Lane D.J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study // J. Bacteriol. 1991. V. 173. P. 697–703.
14. Панкратов Т.А., Дедыш С.Н. Целлюлозолитические стрептомицеты из сфагновых болот и факторы, определяющие их активность // Микробиология. 2009. Т. 78. № 2. С. 261–267.
15. Pankratov T.A., Serkebaeva Y.M., Kulichevskaya I.S., Liesack W., Dedysh S.N. Substrate-induced growth and isolation of *Acidobacteria* from acidic *Sphagnum* peat // ISME J. 2008. V. 2. P. 551–560.
16. Okamura K., Kawai A., Yamada T., Hiraishi A. *Acidipila rosea* gen. nov., sp. nov., an acidophilic chemoorganotrophic bacterium belonging to the phylum *Acidobacteria* // FEMS Microbiol. Lett. (Accepted Article: doi: 10.1111/j.1574-6968.2011.02224.x).
17. González I., Ayuso-Sacido A., Anderson A., Genilloud O. Actinomycetes isolated from lichens: evaluation of their diversity and detection of biosynthetic gene sequences // FEMS Microbiol. Ecol. 2006. V. 54. P. 401–415.
18. Панкратов Т.А., Дедыш С.Н., Заварзин Г.А. Ведущая роль представителей *Actinobacteria* в процессах аэробной деструкции целлюлозы в сфагновых болотах // ДАН. 2006. Т. 410. № 4. С. 564–567.
19. Подтероб А.П. Химический состав лишайников и их медицинское применение // Химико-фармацевтический журнал. 2008. Т. 42. № 10. С. 32–38.
20. Müller K. Pharmaceutically relevant metabolites from lichens // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2001. V. 56. P. 9–16.