

Новый штамм *Serratia* sp. ASf1, растущий при высоких концентрациях железа

Г.В.Хохлова, Т.В.Антипова, И.Ю.Филатова, А.Н.Звонарёв, Т.В.Кулаковская, М.Б.Вайнштейн

ФГБУН «Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К.Скрябина» РАН, Пушкино, Московская область, Российская Федерация

Из низкотемпературного природного источника, богатого гематитом, выделен штамм Asf1, отнесенный к роду *Serratia*, для которого авторы показали способность к росту при высоких концентрациях растворенного железа (5 мМ), отсутствие при этом у клеток сидерофор и обильное отложение бактериями неорганизованных внеклеточных окисленных форм железа (III).

Ключевые слова: микроаэрофилы, *Serratia*, трансформация железа (III)

Для цитирования: Хохлова Г.В., Антипова Т.В., Филатова И.Ю., Звонарев А.Н., Кулаковская Т.В., Вайнштейн М.Б. Новый штамм *Serratia* sp. ASf1, растущий при высоких концентрациях железа. Бактериология. 2018; 3(1): 18–21. DOI: 10.20953/2500-1027-2018-1-18-21

A new strain of *Serratia* sp. ASf1, growing at high iron concentrations

G.V.Khokhlova, T.V.Antipova, I.Yu.Filatova, A.N.Zvonarev, T.V.Kulakovskaya, M.B.Vainshtein

Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms RAS, Pushchino, Moscow region, Russian Federation

The strain Asf1 was isolated from the low-temperature natural spring, rich in hematite. The strain is referred by the authors to the genus *Serratia*. This strain is capable of growth at high concentrations of dissolved iron (5 mM), the absence of siderophore in the cells and abundant deposition of unorganized extracellular oxidized forms of iron (III) by the bacteria.

Keywords: microaerophiles, *Serratia*, transformation of iron (III)

For citation: Khokhlova G.V., Antipova T.V., Filatova I.Yu., Zvonarev A.N., Kulakovskaya T.V., Vainshtein M.B. A new strain of *Serratia* sp. ASf1, growing at high iron concentrations. Bacteriology. 2018; 3(1): 18–21. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2018-1-18-21

Известны бактерии, трансформирующие соединения железа и переносящие их высокие концентрации. Большинство таких бактерий высокоспецифичны, например, ацидофильные серо- и железooksисляющие *Acidithiobacillus ferrooxidans* и *Leptospirillum ferrooxidans*, анаэробные восстанавливающие железо *Geobacter*. Вместе с этим значительный интерес представляют неспециализированные факультативные анаэробы, способные к трансформации соединений железа в богатых им почвах, в том числе – в условиях заводнения почв со снижением аэрирования. Известным и малоизученным примером таких бактерий являются представители рода *Serratia* [1].

Цель данной работы – выделение и идентификация бактерий, участвующих в образовании окисленных форм желе-

за и способных к росту при больших концентрациях железа (III) в аэробных и микроаэрофильных условиях.

Материалы и методы

Источник выделения штамма. Пробы отбирали на территории государственного геологического памятника природы в Терском районе Мурманской области в августе 2017 г. (рис. 1). Наличие лимонита и гематита придает песчаникам, возраст которых около 1 млрд лет, характерную красновато-шоколадную окраску [2]. Стерильным шприцом из ручья отбирали образец воды, закапывали в стерильную пробирку Хангейта с заранее приготовленной питательной средой следующего состава (г/л): KH_2PO_4 0,1 г, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 0,15 г, K_2HPO_4 0,1 г,

Для корреспонденции:

Хохлова Галина Владимировна, младший научный сотрудник лаборатории физиологии микроорганизмов ФГБУН «Институт биохимии и физиологии микроорганизмов» РАН

Адрес: 142290, Московская область, Серпуховский р-н, г. Пушкино, пр-кт Науки, 5
Телефон: (4967) 73-2540
E-mail: galka889@gmail.com

Статья поступила 17.01.2018 г., принята к печати 30.03.2018 г.

For correspondence:

Galina V. Khokhlova, junior researcher of laboratory physiology of microorganisms, Skryabin Institute of biochemistry and physiology of microorganisms RAS

Address: 5 Nauki Ave., Pushchino, Serpukhov district, Moscow region, 142290, Russian Federation
Phone: (4967) 73-2540
E-mail: galka889@gmail.com

The article was received 17.01.2018, accepted for publication 30.03.2018

Таблица 1. **Использованные праймеры**

27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
1492R	ACGGYTACCTTGTACGACTT

NaNO₃ 0,34 г, дрожжевой экстракт, пептон 3 г, L-лактат калия 27 мМ без цитрата железа, pH 6,5–7,0 (среда FSM) [3].

Культивирование. Выделение и основное культивирование после выделения в чистую культуру проводили на полной среде FSM (цитрат Fe (III) от 100 мкМ до 5 мМ) при 25°C.

Молекулярно-генетические методы. Для идентификации штамма тотальную ДНК из клеток выделяли стандартным фенол-хлороформным методом по Мармору [4] с предварительным трехкратным замораживанием и оттаиванием осажденных клеток. Далее проводили ПЦР с универсальными бактериальными праймерами (табл. 1). Секвенирование 16s рРНК гена проводили в компании «Евроген». Далее последовательность анализировали, проводили поиск родственных штаммов через NCBI Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Nucleotides>).

Анализ сидерофоров. Поиск метаболитов, реагирующих с трехвалентным железом, проводили после куль-

тивирования штамма на среде FSM без цитрата железа (III) согласно методике, описанной в ранней работе коллег [5]. Супернатант культуральной жидкости трижды экстрагировали хлороформом при pH = 3 в соотношении 1 : 1. Хлороформный экстракт упаривали досуха на роторном испарителе. Полученный осадок анализировали с помощью ТСХ на пластинках силикагеля (Silica gel F₂₅₄, Merck, Германия) в системе хлороформ – метанол – 25% NH₄OH (90 : 10 : 0.1) и (80 : 20 : 0.2). Хроматограммы опрыскивали 5%-м раствором FeCl₃ в метаноле (реактив на фенольные соединения), далее анализировали под ультрафиолетом.

Флуоресцентная микроскопия. Флуоресцентную микроскопию использовали для визуализации полифосфатов с флуорохромом 4',6'-диамино-2-фенилиндол 2 HCl (DAPI; Sigma, USA) [6–9]. Клетки инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин с DAPI (10 мкг/мл). Затем образцы анализировали на флуоресцентном фазово-контрастном микроскопе (AXIO Imager A1, Zeiss, Germany) с фильтром 49 (Zeiss), с максимумом возбуждения 359 нм и максимумом излучения 460 нм.



Рис. 1. Лодочный ручей (Терский р-н Мурманской обл.), место отбора проб.

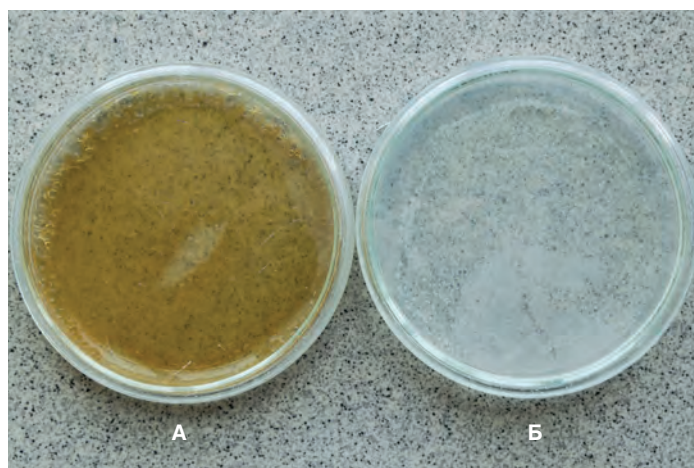


Рис. 2. Фото чашек с 5 мМ железом (А) и без (Б).

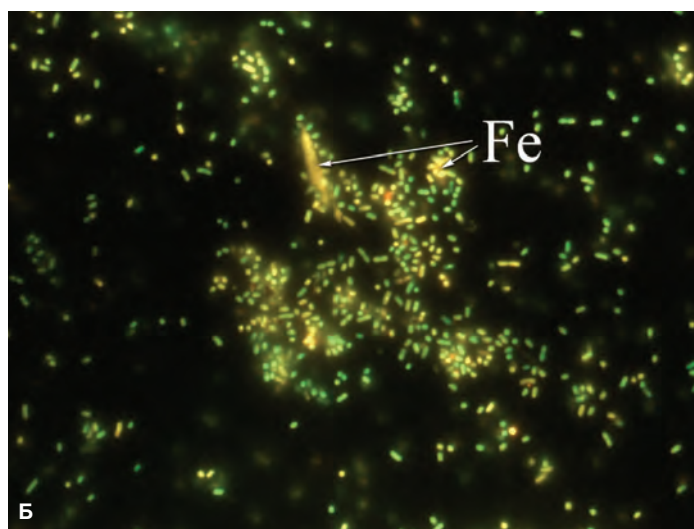
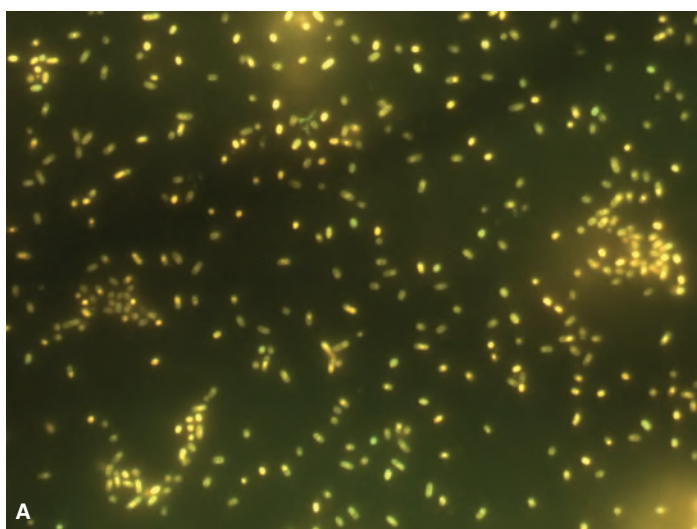


Рис. 3. Отложение полифосфатов в клетках *Serratia* sp. ASf1 при флуоресцентной микроскопии с окраской DAPI. А – в среде без Fe (III); Б – в среде с Fe (III).

Таблица 2. Ближайшие родственники, согласно NCBI Blast

Название родственного штамма	Сходство, %	Типовой номер
<i>S. quinivorans</i> strain 4364, 16S рPHK ген	97	NR_037112.1
<i>S. proteamaculans</i> штамм DSM 4543, 16S рPHK ген	97	NR_025341.1
<i>S. grimesii</i> штамм DSM 30063, 16S рPHK ген	97	NR_025340.1
<i>S. liquefaciens</i> штамм ATCC 27592, 16S рPHK ген	96	NR_025339.1
<i>S. entomophila</i> штамм DSM 12358, 16S рPHK ген	96	NR_025338.1
<i>S. fonticola</i> штамм DSM 4576, 16S рPHK ген	96	NR_025339.1

Результаты и обсуждение

Из природного образца была выделена культура, способная расти при высоких концентрациях железа: в присутствии в среде 5 мМ цитрата Fe(III). Выделенная чистая культура, штамм Asf1, по морфологии, культуральным признакам и по результатам секвенирования 16S рPHK гена отнесена к роду *Serratia* (табл. 2).

Согласно проведенной хлороформной экстракции, сидерофоры не были визуализированы, из чего можно предположить, что отложение окисного железа в колониях бактерий, приобретающих рыжий цвет ржавого железа (рис. 2), является неспецифической защитной реакцией выделенного штамма к большому количеству окисленного железа в окружающей среде. Отложение аморфных хлопьев железа в скоплениях клеток было подтверждено микроскопией.

Флуоресцентная микроскопия после окраски DAPI показала, что обильное образование полифосфатов в клетках происходило в условиях без Fe (III) и, возможно, подавлялось внесением цитрата Fe (III) (рис. 3).

Роль бактерий, способных трансформировать соединения железа, важна в глобальном круговороте железа, в том числе – в образовании железных руд и переотложении соединений железа в почве. Изучение физиологии и биохимии «железобактерий» в общем понимании этого термина актуально как для фундаментальной микробиологии, так и для развития геобиотехнологий, для защиты трубопроводов от коррозии и для биоремедиации почв. Формы железа и их подвижность имеют большое значение для почвы и растений, поэтому в перспективе возможно создание бакпрепаратов для ремедиации почв с высоким содержанием железа. Известно, что многие почвенные и водные микроорганизмы могут применяться для биоремедиации почв от тяжелых металлов, в том числе и относящиеся к роду *Serratia* [9, 10]. Бактерии рода *Serratia* особенно перспективны для заводняемых почв, так как являются факультативными анаэробами – эти же свойства факультативного анаэроба и переотложения железа демонстрирует выделенный нами штамм *Serratia* sp. Asf1, что подтверждает возможность его использования для биоремедиации в присутствии высоких концентраций железа.

Заключение

Из низкотемпературного природного источника, богатого гематитом, выделена микроаэрофильная бактерия штамм Asf1, отнесенная к роду *Serratia*, для которой показаны способность к росту при высоких концентрациях растворенного железа (5 мМ), отсутствие сидерофор и обильное отложение неорганизованных внеклеточных окисленных форм желе-

за (III). Предполагается, что штамм может быть использован для биоремедиации почв с высоким содержанием железа.

Литература

1. Thorpe C, Morris K, Boothman C, Lloyd J. Alkaline Fe (III) reduction by a novel alkali-tolerant *Serratia* sp. isolated from surface sediments close to Sellafield nuclear facility. FEMS Microbiol Lett. 2012 Feb;327(2):87-92. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2011.02455.x.
2. Жиров ДВ, Пожиленко ВИ, Белкина ОА, Костина ВА, Королева НЕ, Константинова НА, и др. Терский район (серия «Памятники природы и достопримечательности Мурманской области»). Издание 2-е, исправленное и дополненное. СПб.: Ника, 2006, 128 с.
3. Heyen U., Schuler D. Growth and magnetosome formation by microaerophilic *Magnetospirillum* strains in an oxygen-controlled fermentor. Appl Microbiol Biotechnol. 2003 Jun;61(5-6):536-44. DOI: 10.1007/s00253-002-1219-x
4. Marmur J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. Journal of Molecular Biology. 1961;3(2): 208-18.
5. Козловский АГ, Антипова ТВ, Желифонова ВП, Баскунов БП, Иванушкина НЕ, Кочкина ГА, Озерская СМ. Вторичные метаболиты грибов секции Usti рода *Aspergillus* и их использование в хемосистематике. Микробиология. 2017;86(2):164-71. DOI: 10.7868/S0026365617020112
6. Serafim L, Lemos O, Levantesi C, Tandoi V, Santos H, Reis MA. Methods for detection and visualization of intracellular polymers stored by polyphosphate-accumulating microorganisms. J Microbiol Meth. 2002;51(1):1-18.
7. Pavlov E, Aschar-Sobbi R, Campanella M, Turner RJ, Gómez-García MR, Abramov AY. Inorganic polyphosphate and energy metabolism in mammalian cells. J Biol Chem. 2010 Mar 26;285(13):9420-8. DOI: 10.1074/jbc.M109.013011
8. Ryazanova L, Andreeva N, Kulakovskaya T, Valiakhmetov A, Yashin V, Vagabov V, Kulaev I. The early stage of polyphosphate accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*: comparative study by extraction and DAPI staining. Adv Biosci Biotechnol. 2011;2(04):293-7.
9. Martin P, Van Mooy BA. Fluorometric quantification of polyphosphate in environmental plankton samples: extraction protocols, matrix effects, and nucleic acid interference. Appl Environ Microbiol. 2013 Jan;79(1):273-81. DOI: 10.1128/AEM.02592-12
10. Young Y, Cerniglia C. (eds.). Microbiological Transformation and Degradation of Toxic Organic Chemicals, In L. Y. Young and C. E. Cerniglia (eds.), Microbiological Transformation and Degradation of Toxic Organic Chemicals, Wiley-Liss, New York. (1995) pp. 301-324.

References

1. Thorpe C, Morris K, Boothman C, Lloyd J. Alkaline Fe (III) reduction by a novel alkali-tolerant *Serratia* sp. isolated from surface sediments close to Sellafield nuclear facility. FEMS Microbiol Lett. 2012 Feb;327(2):87-92. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2011.02455.x.
2. Zhiron DV, Pozhilenko VI, Belkina OA, Kostina VA, Koroleva NE, Konstantinova NA, et al. Terskii raion (seriya «Pamyatniki prirody i dostoprimechatel'nosti Murmanskoj oblasti»). Izdanie 2nd edition. St. Petersburg: "Nika", 2006, 128 p. (In Russian).
3. Heyen U., Schuler D. Growth and magnetosome formation by microaerophilic *Magnetospirillum* strains in an oxygen-controlled fermentor. Appl Microbiol Biotechnol. 2003 Jun;61(5-6):536-44. DOI: 10.1007/s00253-002-1219-x
4. Marmur J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. Journal of Molecular Biology. 1961;3(2): 208-18.
5. Kozlovskii AG, Antipova TV, Zhelifonova VP, Baskunov BP, Ivanushkina NE, Kochkina GA, Ozerskaya SM. Secondary metabolites of fungi of the Usti section, genus *Aspergillus* and their application in chemosystematics. Microbiology (Mikrobiologiya). 2017;86(2):176-82. DOI: 10.7868/S0026365617020112 (In Russian).

6. Serafim L, Lemos O, Levantesi C, Tandoi V, Santos H, Reis MA. Methods for detection and visualization of intracellular polymers stored by polyphosphate-accumulating microorganisms. *J Microbiol Meth.* 2002;51(1):1-18.
7. Pavlov E, Aschar-Sobbi R, Campanella M, Turner RJ, Gómez-García MR, Abramov AY. Inorganic polyphosphate and energy metabolism in mammalian cells. *J Biol Chem.* 2010 Mar 26;285(13):9420-8. DOI: 10.1074/jbc.M109.013011
8. Ryazanova L, Andreeva N, Kulakovskaya T, Valiakhmetov A, Yashin V, Vagabov V, Kulaev I. The early stage of polyphosphate accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*: comparative study by extraction and DAPI staining. *Adv Biosci Biotechnol.* 2011;2(04):293-7.
9. Martin P, Van Mooy BA. Fluorometric quantification of polyphosphate in environmental plankton samples: extraction protocols, matrix effects, and nucleic acid interference. *Appl Environ Microbiol.* 2013 Jan;79(1):273-81. DOI: 10.1128/AEM.02592-12
10. Young Y, Cerniglia C. (eds.). *Microbiological Transformation and Degradation of Toxic Organic Chemicals*, In L. Y. Young and C. E. Cerniglia (eds.), *Microbiological Transformation and Degradation of Toxic Organic Chemicals*, Wiley-Liss, New York. (1995) pp. 301-324.

Информация о соавторах:

Антипова Татьяна Валентиновна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории вторичных метаболитов ФГБУН «Институт биохимии и физиологии микроорганизмов» РАН Адрес: 142290, Московская область, Серпуховский р-н, г. Пушкино, пр-т Науки, 5
Телефон: (4967) 31-8596
E-mail: tatantip@rambler.ru

Филатова Ирина Юрьевна, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии ФГБУН «Институт биохимии и физиологии микроорганизмов» РАН Адрес: 142290, Московская область, Серпуховский р-н, г. Пушкино, пр-т Науки, 5
Телефон: (4967) 31-8661
E-mail: irafilatova24@gmail.com

Звонарёв Антон Николаевич, младший научный сотрудник лаборатории ВНТК трехмерных структур микроорганизмов ФГБУН «Институт биохимии и физиологии микроорганизмов» РАН Адрес: 142290, Московская область, Серпуховский р-н, г. Пушкино, пр-т Науки, 5
Телефон: (4967) 31-8516
E-mail: zvonarev@ibpm.pushchino.ru

Кулаковская Татьяна Валентиновна, доктор биологических наук, заведующая лабораторией регуляции биохимических процессов ФГБУН «Институт биохимии и физиологии микроорганизмов» РАН Адрес: 142290, Московская область, Серпуховский р-н, г. Пушкино, пр-кт Науки, 5
Телефон: (4967) 31-8578
E-mail: alla@ibpm.pushchino.ru

Вайнштейн Михаил Борисович, доктор биологических наук, заведующий лабораторией физиологии микроорганизмов ФГБУН «Институт биохимии и физиологии микроорганизмов» РАН Адрес: 142290, Московская область, Серпуховский р-н, г. Пушкино, пр-кт Науки, 5
Телефон: (4967) 73-2677
E-mail: vain@ibpm.pushchino.ru

Information about co-authors:

Tatyana V. Antipova, PhD (Biology) laboratory secondary metabolites, Skryabin Institute of biochemistry and physiology of microorganisms RAS Address: 5 Nauki Ave., Pushchino, Serpukhov district, Moscow region, 142290, Russian Federation
Phone: (4967) 31-8596
E-mail: tatantip@rambler.ru

Irina Yu. Filatova, junior researcher of Molecular microbiology laboratory, Skryabin Institute of biochemistry and physiology of microorganisms RAS Address: 5 Nauki Ave., Pushchino, Serpukhov district, Moscow region, 142290, Russian Federation
Phone: (4967) 31-8661
E-mail: irafilatova24@gmail.com

Anton N. Zvonarev, junior researcher of VNTK three-dimensional structures of microorganisms Skryabin Institute of biochemistry and physiology of microorganisms RAS Address: 5 Nauki Ave., Pushchino, Serpukhov district, Moscow region, 142290, Russian Federation
Phone: (4967) 31-8516
E-mail: zvonarev@ibpm.pushchino.ru

Tatyana V. Kulakovskaya, Doctor of Biological Sciences, head laboratory regulation of biochemical processes, Skryabin Institute of biochemistry and physiology of microorganisms RAS Address: 5 Nauki Ave., Pushchino, Serpukhov district, Moscow region, 142290, Russian Federation
Phone: (4967) 31-8578
E-mail: alla@ibpm.pushchino.ru

Mikhail B. Vainstein, Doctor of Biological Sciences, head of laboratory physiology of microorganisms Skryabin Institute of biochemistry and physiology of microorganisms RAS Address: 5 Nauki Ave., Pushchino, Serpukhov district, Moscow region, 142290, Russian Federation
Phone: (4967) 73-2677
E-mail: vain@ibpm.pushchino.ru

МЕЖДУНАРОДНАЯ МЕДИЦИНСКАЯ ПЕЧАТЬ

Атака на бактерии с помощью поверхностей, подобных коже акул

Исследователи разработали покрытие, которое наполнено противомикробными средствами и имеет узорчатую алмазо-подобную текстуру кожи акулы.

Пациенты в больницах подвержены риску развития инфекций, просто касаясь загрязненных постелей и дверных ручек. Ученые разрабатывают покрытия для этих часто касаемых поверхностей для борьбы с распространением и ростом микробов. Например, Sharklet AF™ – это покрытие, предназначенное для имитации кожи акулы и уменьшающее способность бактерий прилипать к поверхностям. Но долгосрочное использование приведет к накоплению бактерий. Ученые хотели посмотреть, будет ли добавление наночастиц диоксида титана (TiO₂), которые являются антибактериальными, к материалу кожи акулы, эффективно бороться с микробами.

Были напечатаны искусственные поверхности кожи акулы с полимерными и керамическими композитами, с добавкой к ним наночастиц диоксида титана. Поверхность кожи акулы без наночастиц уменьшала прикрепление *E. coli* на 70% по сравнению с гладкими пленками. Но поверхности кожи акулы с наночастицами TiO₂, подвергшимися воздействию ультрафиолетового излучения, за один час погибают более чем на 95% бактерий *E. coli* и 80% клеток золотистого стафилококка. Эту технологию предполагают передать в массовое производство.

Dundar Arisoy F, Kolewe KW, Homyak B, Kurtz IS, Schiffman JD, Watkins JJ
Bioinspired Photocatalytic Shark-Skin Surfaces with Antibacterial and Antifouling Activity via Nanoimprint Lithography.
ACS Appl Mater Interfaces. 2018;10(23):20055-20063. doi: 10.1021/acsami.8b05066.