

Г.Т. Джанузакова^{1*} , Д.Э. Карабалаева² 

¹Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы

²Казахский научно-исследовательский институт проблем экологии, Казахстан, г. Алматы

*e-mail: gulnazdzhanuzakova@gmail.com

ВЫДЕЛЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ И ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПСИХРОФИЛЬНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

За последние несколько лет возрос интерес к микроорганизмам, обитающим в экстремальных экосистемах. Стало очевидным, что они могут служить важными объектами для изучения самых глубоких аспектов клеточной и молекулярной биологии и могут использоваться в различных отраслях биотехнологии. Кроме того, исследования таких микроорганизмов расширяют представления о многообразии используемых живыми существами физиологических и биохимических механизмов. На сегодняшний день психрофильные и психротрофные микроорганизмы имеют большое значение в пищевой промышленности, химической индустрии, сельском хозяйстве. Психрофильные и психротрофные микроорганизмы признаны потенциальным источником холодоактивных ферментов и биоактивных соединений. Такие параметры помогают данным ферментам выполнять каталитические действия при низкой кинетической энергии в холодных средах. Энзимы психрофилов эффективно работают в различных областях промышленности при низких температурах. Благодаря большей гибкости в структуре белка и более высокой связывающей способности с субстратами, в целом, психрофильные ферменты (экстремозимы/психрозимы) обладают большей каталитической активностью (примерно в 10 раз больше, чем мезофильные ферменты) при низкой температуре.

Нами были проведены исследования морфологических, физиологических и биохимических свойств 14 культур микроорганизмов, выделенных из районов Восточной Антарктиды и 12 культур, изолированных с высот 3000 м н.у.м. и 3500 м н.у.м. Малоалматинского ущелья.

Проведен отбор культур выделенных микроорганизмов на присутствие важных энзимов, обнаружены потенциальные биотехнологически значимые продуценты протеолитических, амилитических, липолитических ферментов, определена оксидазная и каталазная активность.

Ключевые слова: психрофильные микроорганизмы, экстремальные экосистемы, Антарктида.

G.T. Januzakova^{1*}, D.E. Karabalayeva²

¹Al-Farabi Kazakh National University, Kazakhstan, Almaty

²Kazakh Scientific Research Institute of Ecological Problems, Kazakhstan, Almaty

*e-mail: gulnazdzhanuzakova@gmail.com

Isolation and research of morphological, physiological and biochemical properties of psychrophilic microorganisms

Over the past few years, the interest in microorganisms living in extreme ecosystems has increased. It is obvious, that the microorganisms can be research objects of the deeper aspects in cell and molecular biology. Moreover, research of such microorganisms expand the understanding of the variety of physiological and biochemical mechanisms used by living things. Currently, psychrophilic and psychrotrophic microorganisms are significant in the food industry, chemical industry, and agriculture. Psychrophilic and psychrotrophic microorganisms are recognized as a potential source of cold-active enzymes and bioactive compounds. Psychrophilic enzymes work effectively in various industries at low temperatures. Due to the greater flexibility in the protein structure and higher binding capacity with substrates, in general, psychrophilic enzymes (extremozymes / psychrozymes) have a higher catalytic activity (about 10 times more than mesophilic enzymes) at low temperatures.

We have investigated the morphological, physiological and biochemical properties of 14 cultures of microorganisms isolated from the regions of East Antarctica. Additionally, there has been isolated 12 cultures from altitudes of 3000-3500 metres above sea level in Maloalmatinsky gorge.

The cultures of the isolated microorganisms were screened for the presence of biotechnologically important enzymes. Furthermore, potential producers of proteases, amylases and lipases were identified. Oxidase and catalase activity was determined.

Key words: psychrophilic microorganisms, extremal ecosystems, Antarctica.

Г.Т. Джанузакова^{1*}, Д.Э. Карабалаева²

¹Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Қазақстан, Алматы қ.

²Экология мәселелері Қазақ ғылыми-зерттеу институты, Қазақстан, Алматы қ.

*e-mail: gulnazdzhanuzakova@gmail.com

Психрофильді микроорганизмдердің физиология-биохимиялық, морфологиялық қасиеттерін зерттеу және бөліп алу

Соңғы бірнеше жылда экстремалды экожүйелерде өмір сүретін микроағзаларға деген қызығушылық артты. Олар жасушалық және молекулалық биологияның терең аспектілерін зерттеу үшін маңызды объект бола алатындығы және оларды биотехнологияның әртүрлі салаларында қолдануға болатындығы белгілі болды. Сонымен қатар, мұндай микроағзаларды зерттеу тірі тіршілік иелері қолданатын физиологиялық және биохимиялық механизмдердің әртүрлілігі туралы түсінікті кеңейтеді. Бүгінгі таңда психрофильді және психротрофты микроағзалар тамақ өнеркәсібінде, химия өнеркәсібінде және ауыл шаруашылығында үлкен маңызға ие. Психрофильді және психротрофты микроорганизмдер суыққа белсенді ферменттер мен биоактивті қосылыстардың тиімді көзі ретінде танылған микроорганизмдер. Мұндай параметрлер осы ферменттерге суық орта жағдайында төмен кинетикалық энергияда каталитикалық әрекеттерді орындауға көмектеседі. Психрофильді ферменттер төмен температурада әртүрлі өндіріс саласында тиімді жұмыс атқарады. Ақуыз құрылымындағы икемділік және субстраттармен байланысу жоғарылығы есебінде, жалпы алғанда, психрофильді ферменттер (экстремозимдер/психрозималар) төмен температурада каталитикалық белсенділікке ие (мезофильді ферменттерге қарағанда шамамен 10 есе көп).

Біз Шығыс Антарктида аймақтарынан оқшауланған 14 микроағзалар дақылының және 3000 м т.д.ж. және 3500 м т.д.ж. Кіші Алматы шатқалының биіктігінен бөлінген 12 дақылдың морфологиялық және физиологиялық-биохимиялық қасиеттерін зерттедік.

Бөлінген микроағзалар дақылдарының биотехнологиялық маңызды ферменттерінің болуына скрининг жүргізілді, протеазалардың, амилазалардың, липазалардың әлеуетті продуценттері анықталды, оксидазалық және каталаза белсенділігі анықталды.

Түйін сөздер: психрофильді микроағзалар, экстремалды экожүйелер, Антарктида.

Введение

Микроорганизмы могут расти в широком диапазоне температур. Соответственно, они были разделены на три широкие категории – термофилы, мезофилы и психрофилы. Последняя категория подразделяется на психрофилов с оптимальной температурой роста ниже 15°C и выше (предел 20°C), и психротрофов (психротолерантов) со способностью расти при 0°C или ниже, но оптимально данные микроорганизмы могут расти при температуре около 20–25°C. Адаптированные к холоду микроорганизмы также могут быть классифицированы как стенопсихрофилы, которые растут в узком диапазоне низких температур ($T_{max} \sim 20^\circ\text{C}$ и $T_{opt} 5\text{--}15^\circ\text{C}$) и эврипсихрофилы, которые могут расти в широком диапазоне температур (психротрофы / психротолеранты; $T_{max} > 20^\circ\text{C}$ и $T_{min} < 0^\circ\text{C}$ с $T_{opt} > 20^\circ\text{C}$). И психрофилы, и психротрофы важны в глобальной экологии, так как большинство водных и наземных экосистем нашей планеты постоянно или сезонно подвержены низким температурам [1].

Психрофильные микроорганизмы широко распространены в мире и играют значительную

роль в эволюции и поддержании баланса биосферы Земли. Психрофилы обитают в зонах вечной мерзлоты, замерзшей почве, океанах, озерах, ледниках и т.п. [2].

Ранее считалось, что горные районы не содержат никакой жизни, но достижения в области науки и техники открыли множество микроорганизмов, обитающих в условиях экстремально низких температур (ледники, снег, лед и т. д.) и играющих ключевые роли в экологических процессах. Криосфера в целом стала значительной частью глобальной экологии. К примеру, микробное разнообразие Гималаев проявило сходство с засушливыми почвами Антарктики и другими высокогорными регионами, что указывает на тесную взаимосвязь их климатических условий. Такие сравнительные исследования имеют преимущество для понимания распространения биогеохимических процессов по всему миру [3]. Холодоактивные энзимы (экстремозимы/психрозимы), продуцируемые психрофильными и психротрофными микроорганизмами, отличаются от энзимов, синтезируемых мезофилами и термофилами, ввиду их способности катализировать биохимические реакции при низких температурах [4]. Благодаря широкому биотехноло-

гическому потенциалу, энзимы психрофильных микроорганизмов привлекают особое внимание. Перспективы применения адаптированных к холоду ферментов включают переработку пищевых продуктов, преобразование биомассы и биоремедиацию окружающей среды. Помимо применения в биотехнологии, важно выяснить механизм молекулярной адаптации к холоду. Ранние исследования механизма адаптации к низким температурам в основном были сосредоточены на выделении и характеристиках адаптированных к холоду ферментов. Ферменты, адаптированные к холоду, демонстрируют более высокую каталитическую эффективность и более низкие значения константы Михаэлиса при низких температурах. Благодаря высокой гибкости структура позволяет ферменту иметь более высокую афинность – способность связывания субстрата и термическую нестабильность.

Психрофильные и психротолерантные микроорганизмы имеют определенный биотехнологический потенциал, благодаря особым энзимам. Психрофильные микроорганизмы вырабатывают ферменты, которые могут выдерживать низкие температуры и другие стрессы холодных климатических условий. В последние годы повысился интерес к изучению холодоактивных энзимов. Холодоактивные энзимы обладают огромным потенциалом для фундаментальных исследований, инновационных промышленных и биотехнологических приложений, вследствие характеристик данных энзимов и их адаптивных функций. Энзимы психрофилов эффективно работают в различных областях промышленности при низких температурах [5]. Благодаря большей гибкости в структуре белка и более высокой связывающей способностью с субстратами, в целом, психрофильные ферменты (экстремозимы/психрозимы) обладают большей каталитической активностью (примерно в 10 раз больше, чем мезофильные ферменты) при низкой температуре [6]. Другие свойства, такие как стабильность и активность в определенном диапазоне pH, адаптация к солености и гидростатичность, давление и т. д. являются важными параметрами для адаптации психрофильных микроорганизмов [7].

Рентабельность благодаря меньшему количеству требований, отсутствие требований дополнительной тепловой помощи, селективная инактивация мягким жаром, высокая удельная активность – вот некоторые из преимуществ холодоактивных ферментов. Для таких желаемых свойств психрозимы представляют собой широ-

кий спектр биотехнологических агентов, например, добавки в моющие средства [8], в пищевой промышленности (ферментация, хлебобулочные изделия) [9], в биоремедиации (компостирование, биодеградация ксенобиотиков) [10] и биотрансформация и приложения молекулярной биологии, экспрессия гетерологичных генов в психрофилах [5]. Коммерчески доступные ферменты такие как протеазы, амилазы, липазы используются при низких температурах [10]. Повышенное внимание уделяется обработке пищевых продуктов при низких температурах для сохранения вкуса, текстуры и питательной ценности, а также для экономии энергии производственных процессов. В целом, основные преимущества холодоактивных ферментов заключаются в их эффективности при низкой температуре окружающей среды тем самым избегая нагрева во время процесса, а также благодаря их термоллабильности. В пищевой промышленности ферменты, адаптированные к холоду, представляют особый интерес для переработки из-за их высокой каталитической активности при температурах, которые сводят к минимуму порчу и изменения вкуса пищевых продуктов [11]. Ферменты широко используются в пищевой промышленности для приготовления напитков, молочных продуктов, выпечки и пивоваренных продуктов. В молочной промышленности используются β -галактозидазы, для производства безлактозных продуктов – β -D-галактозидазы или лактаза, специфически гидролизующая молочный сахар лактозу до глюкозы и галактозы. Это полезно при непереносимости лактозы, для гидролиза лактозы, при хранении молока при низких температурах [12]. Следует отметить, что интерес к изучению многообразия таксонов и биотехнологического потенциала микроорганизмов, населяющих экстремальные экосистемы, возрастает. Тем не менее, структурный состав и функциональные особенности микробных сообществ множества уникальных биотопов остаются почти не изученными. В особенности, в литературе малочисленны сравнительные сведения о микробиоте Восточной части Антарктиды и горных местностей. Также, отсутствуют сведения об исследованиях микробных сообществ Малоалматинского ущелья и гор Республики Казахстан в целом.

Целевыми задачами настоящей работы было выделение, физиологическая, биохимическая характеристика, рассмотрение метаболической активности и идентификация микроорганизмов, населяющих Восточную Антарктиду и горы Ма-

лоалматинского ущелья на высотах 3000м н.у.м. и 3500м н.у.м.

Материалы и методы исследования

14 культур было выделено с Восточной части Антарктиды в рамках научно-исследовательской экспедиции Казахского Географического Общества «Полюс Независимости».

С высоты 3000м н.у.м. было выделено 9 культур, 3 культуры – с высоты 3500м н.у.м. Малоалматинского ущелья (рис.1).

Материалом для изолирования чистых культур психрофильных и психротолерантных микроорганизмов послужили пробы, взятые из разнообразных природных источников: снег (пробы были отобраны методом «конверта»), воздух. Отбор проб проводили, следуя соблюдением стерильных условий. Чистые культуры микроорганизмов получали общеустановленным ме-

тодом [13]. Для выделения и культивирования микроорганизмов применяли питательную среду МПА – мясопептонный агар в виде порошка (TMMEDIA, Индия), а также среду Сабуро в порошковой форме (TMMEDIA, Индия); культивирование проводили при 30 °С в течение 72–140ч. Морфология колоний изучалась визуально.

Микроморфологию клеток культур изолированных микроорганизмов исследовали с помощью световой микроскопии препаратов, окрашенных по Граму [13]. Для данного метода был использован микроскоп «МОТIC В1-220 А» при инструментальном увеличении x100.

Было проведено микроскопическое определение спорообразования путем окрашивания препарата метиленовой синью. Споры в клетках микроорганизмов можно обнаружить в окрашенных препаратах. Подвижность микроорганизмов была определена традиционным методом «наблюдение в висючей капле».

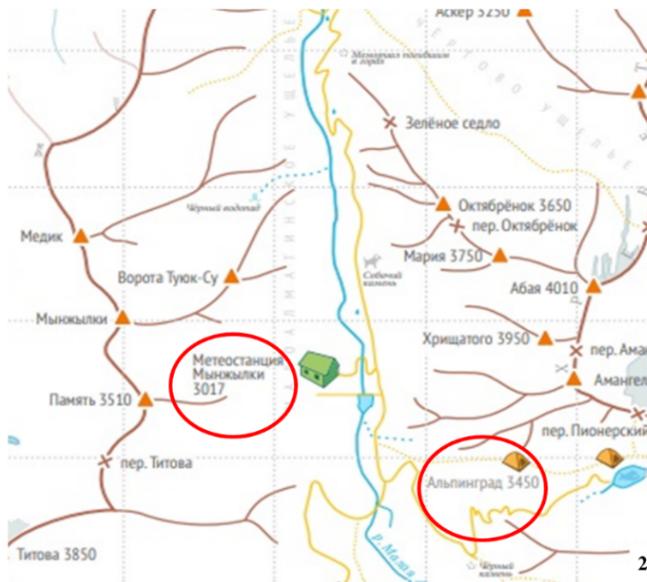


Рисунок 1 – места отбора проб: 1 – Восточная Антарктида [15]; 2 – Малоалматинское ущелье [16]

Физиолого-биохимические характеристики микроорганизмов включают в себя описание использования микроорганизмами различных соединений макро- и микроэлементов, отношение к молекулярному кислороду, рост на питательных средах и реакции превращения веществ, входящих в состав этих сред.

Образование пузырьков газа после нанесения 3% раствора перекиси водорода на культуру свидетельствовало о каталазной активности.

Оксидазный тест проводился при использовании оксидазных дисков TBL030 (VELD, Казахстан) из фильтровальной бумаги, пропитанных оксалатом N,N-диметил-парафенилендиамина, аскорбиновой кислотой и а-нафтолом. Тест на оксидазу был проведен путем снятия колонии микроорганизмов и растирания ее по оксидазному диску. Анализ результатов проводился в течение 5–10 секунд при 24–30 °С. Положительные реакции возникали через 15–60 секунд.

При отсутствии изменения цвета на оксидажном диске, а также при наличии окраски через минуту и более оценивалось как отрицательная реакция.

Активность протеолитических ферментов определяли, используя желатину в качестве субстрата (рис.3). Культуры высевались в пробирки на мясопептонную желатину (МПЖ). Посев проводился уколом. Визуально отмечали разжижение желатины. Также, указали степень разжижения и форму (кратеровидное, реповидное, воронковидное, мешковидное, послойное).

Липолитическая активность была определена путем добавления в питательную среду Tween-80 – эфира олеиновой кислоты. Способность к гидролизу субстрата отмечали при образовании вокруг колонии непрозрачной зоны нерастворимых кальциевых солей жирных кислот, высвобожденных из твина.

Амилолитическую активность выявляли путем посева культур на агаризованную среду с добавлением крахмала. Состав среды был следующий (г/л): пептон – 10,0; K_2HPO_4 – 5,0; растворимый крахмал – 2,0; агар – 15,0; pH среды 6,8-7,0. Гидролиз крахмала устанавливали методом обрабатывания пластинки агара раствором Люголя. Область гидролиза становилась бесцветной, либо красной, при расщеплении крахмала до декстринов.

Для того, чтобы определить способность аэробных микроорганизмов фиксировать молекулярный азот, была приготовлена среда Эшби, не содержащая азот и имеющая следующий состав (г/л): маннит – 20,0; агар – 20,0; K_2HPO_4 – 0,2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2; NaCl – 0,2; K_2SO_4 – 0,1; CaCO_3 – 5,0; pH – 7,1-7,3. Обильный рост на среде Эшби свидетельствовал о принадлежности микроорганизмов к азотфиксаторам.

Сравнительное исследование изолированных культур проводили по морфологическим, культуральным, физиологическим и биохимическим свойствам, применяя определитель Берджи [14].

Результаты исследования и их обсуждение

Исследование макро и микроморфологических, физиолого-биохимических особенностей культур выделенных микроорганизмов обнаружило, расположение микроорганизмов в виде кокков, коротких палочек, расположенных в виде групп и цепей (рис.2). Опираясь на лите-

ратурные данные, выявлено, что большая часть микроорганизмов, населяющих экстремальные экосистемы, в том числе и Восточную Антарктиду и высокогорные биотопы, образуют биологические пленки с развитым внеклеточным матриксом вне клетки, функциональность которых состоит в обеспечении регуляции роста и развития клеток, их защиты от условий внешней среды благодаря «чувству кворума» [17].

Грамм-окраска микроорганизмов выявила, что 9 антарктических культур и 10 культур, выделенных с разных высот Малоалматинского ущелья являются грамположительными и оксидазоотрицательными, 5 антарктические культуры и 2 культуры, выделенные с высот Малоалматинского ущелья являются грамотрицательными, оксидазоположительными.

Результаты исследования макро- и микроморфологических, физиологически и биохимических характеристик выделенных культур представлены в таблицах 1, 2. Выявлено, что культуры выделенных микроорганизмов Восточной Антарктиды обладают высокой каталазной, липолитической и протеолитической активностью. Как видно из таблицы 2, изоляты выделенные с высот 3000м н.у.м. и 3500м н.у.м. Малоалматинского ущелья также обладают высокой каталазной, липолитической, протеолитической и амилолитической активностью.

Механизмы адаптации микроорганизмов к условиям окружающей среды привлекают внимание в поиске новых энзимов, таких как амилазы и другие стабильные при холодной температуре биомолекулы, называемые экстремозимами, или психрозимами [18], [19], [20]. Психрофильные и психротолерантные микроорганизмы, продуцирующие энзимы обладают особыми механизмами адаптации к холодным условиям среды, высокой текучестью мембран и синтезом белков, ответственных за адаптацию к низким температурам [21]. Стабильность амилаз, протеаз и липаз при низких температурах является очень важной характеристикой для процессов сохранения энергии в индустрии. Научный интерес к холодоактивным α -амилазам увеличился вследствие возможностей их обширного применения в аналитической, медицинской, клинической химии, производстве крахмала, детергентов, пищевой и текстильной промышленности, очистке сточных вод, размягчении древесины при производстве бумаги, биоремедиации в холодном климате [22], [23].

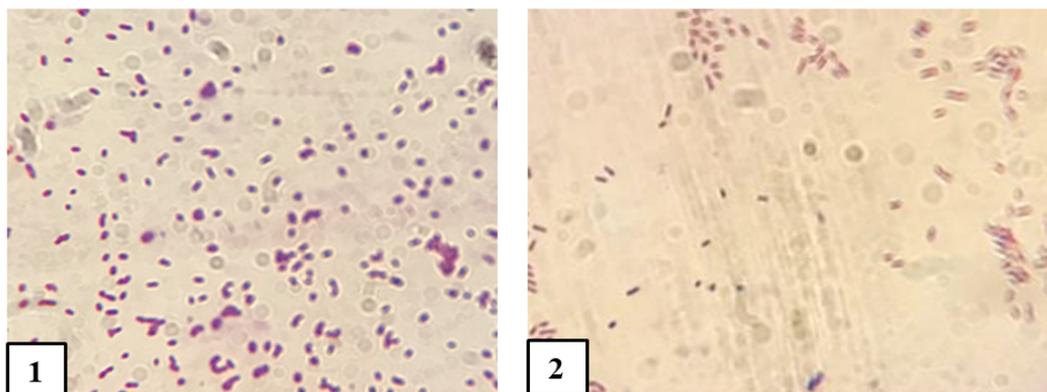


Рисунок 2 – Микрофотографии клеток изолированных культур: 72 ч культивирования на среде МПА при 30 °С, световая микроскопия, ×100: 1 – изолят Е-2 (Антарктида); 2 – изолят 3-3000А (Мынжилки, Малоалмагинское ущелье)

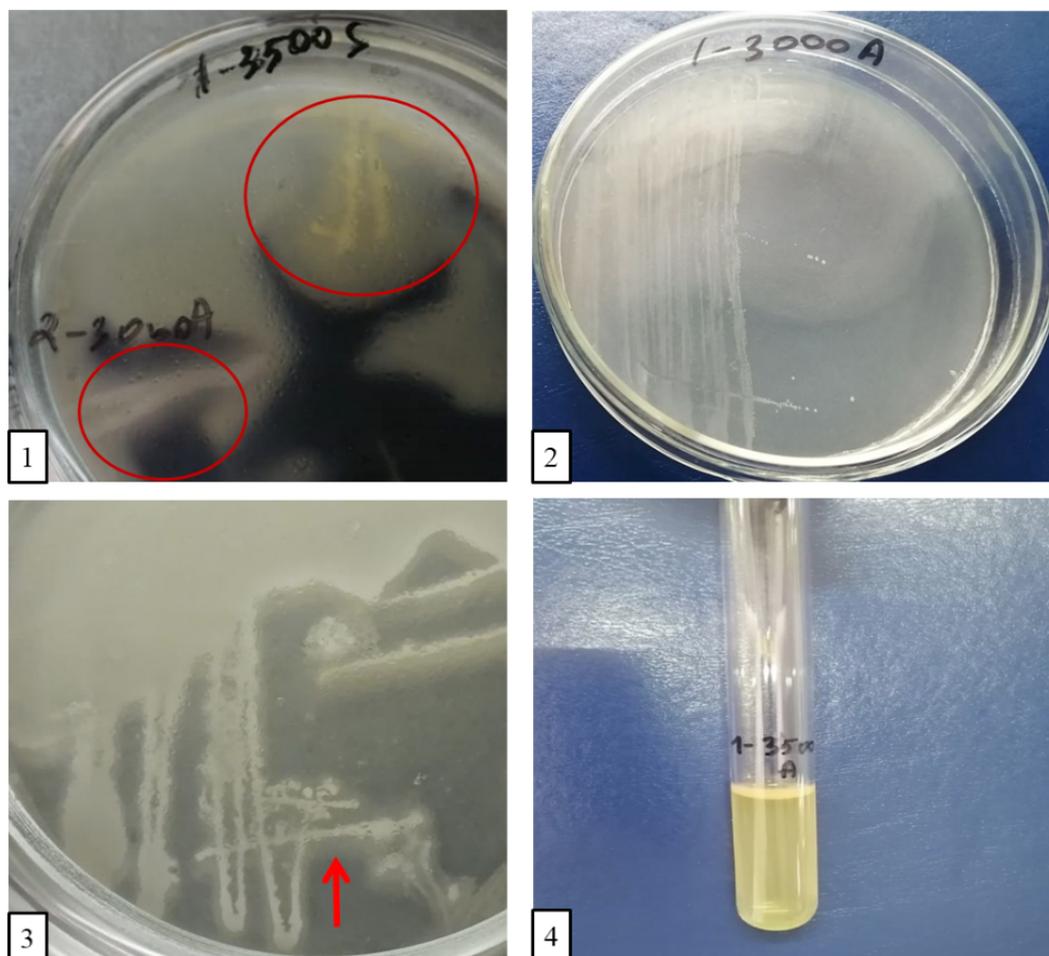


Рисунок 3 – Физиолого-биохимическая характеристика выделенных культур:
1 – амилолитическая активность (красным выделены зоны гидролиза крахмала);
2 – фиксация молекулярного азота (рост на безазотистой среде Эшби);
3 – липолитическая активность (стрелкой указаны зоны расщепления олеиновой кислоты);
4 – протеолитическая активность

Таблица 1 – Физиолого-биохимические характеристики культур, выделенных с Восточной Антарктиды

Наименование	Подвижность	Спорообразование	Окраска по Граму	Каталитическая активность	Липолитическая активность	Амилитическая активность	Протеолитическая активность	Тест на оксидазу	Фиксация молекулярного азота	Форма клеток
C-1	-	-	-	-	++	+	+++	+	+	Кокки
C-2	-	-	+	+	+	-	+	-	+	Шаровидные (дрожжи)
C-3	+	-	-	+	+++	+	+	-	+	Кокки
C-4	-	-	+	-	-	+	+	-	+	Шаровидные (дрожжи)
C-5	-	+	+	+	++	-	+	-	+	Бациллы
C-6	+	+	+	-	-	-	+	-	+	Бациллы
M-1	-	+	+	-	+++	-	+	-	+	Бациллы
M-2	+	-	+	+	-	-	+	-	+	Кокки
E-1	-	+	+	+	+	-	+++	-	+	Бациллы
P-1	+	-	+	+	+	-	+++	-	+	Бациллы
A-1	+	+	+	+	+	-	++	-	+	Бациллы
M-4	+	-	-	-	++	+	++	+	+	Кокки
M-3	-	-	-	-	+	+	+	+	+	Кокки
E-2	+	+	-	+	+	+	++	+	+	Бациллы

Таблица 2 – Физиолого-биохимические характеристики культур, выделенных с высот 3000-3500 м н.у.м. в Малоалматинском ущелье

Наименование	Подвижность	Спорообразование	Окраска по Граму	Каталитическая активность	Липолитическая активность	Амилитическая активность	Протеолитическая активность	Тест на оксидазу	Фиксация молекулярного азота	Форма клеток
1-3000A	+	-	-	+	-	-	+	+	+	Бациллы
1-3000S	-	-	+	+	-	-	+	-	-	Шаровидные (дрожжи)
2-3000A	-	-	+	+	+++	+	+	-	+	Кокки
2-3000S	-	+	+	+	-	-	+	-	+	Шаровидные (дрожжи)
3-3000S	-	+	+	+	-	+	+	-	-	Бациллы
4-3000S	-	-	+	-	+	+	+	-	-	Бациллы
3-3000A	-	-	+	+	+	+	+	-	-	Бациллы
4-3000A	-	+	+	+	++	-	+	-	+	Кокки
5-3000A	-	+	+	-	-	-	+	-	-	Бациллы
1-3500S	+	-	+	-	-	+++	+	-	+	Бациллы
1-3500A	-	-	+	+	+	-	+	-	-	Бациллы
2-3500A	-	+	-	-	+	-	+	+	+	Кокки

Как видно из таблиц 1 и 2, все 14 антарктических культур являются азотфиксаторами, либо способны усваивать ничтожное количество азота из воздуха, что находит свое отражение в литературных данных [24].

Наука и индустрия сконцентрировались на исследовании нового поколения амилаз, синтезируемых психрофильными микроорганизмами [25].

Использование амилаз, активных при низких температурах может быть выгодно в биотехнологических и промышленных процессах благодаря сокращению затрат на отопление, рисков микробной контаминации с мезофилами. Основываясь на литературных данных, липолитические ферменты психрофильных и психротолерантных микроорганизмов являются универсальными биокатализаторами, используемыми в энергоэффективных процессах. В соответствии с этим, липолитические психрозимы – перспективные биоинструменты для расщепления загрязняющих веществ [26].

Более 50% изучаемых антарктических и горных изолятов имели липолитическую и протеолитическую активность. Амилолитическая активность, в свою очередь, была обнаружена у 6 антарктических культур и 5 культур, выделенных с высот 3000м н.у.м. и 3500м н.у.м. Малоалматинского ущелья.

Литературные данные свидетельствуют об относительно узких диапазонах местообитаний психрофильных и психротолерантных микроорганизмов – ледники, глубины океанов и морей [27]. Психротолерантные микроорганизмы, населяющие поверхность Земли, обладают механизмами адаптации к годовым колебаниям температуры. В теплые сезоны микроорганизмы показывают быстрый рост (оптимум от 20 до 30 °С). Также, психротолеранты могут расти и при низких температурах (1–15 °С), когда другие организмы неактивны [28], [29]. Данные факты подтверждают исследования, показывающие что 25–70% микроорганизмов, выделенных из многообразных антарктических биотопов, являются психротолерантами и могут расти в широком температурном диапазоне (1–30 °С). При более низкой температуре культивирования по-

вышается продолжительность лаг-фазы роста и развития микроорганизмов Антарктиды. Несмотря на данный факт, уровень синтеза биомассы не меняется [30], [31].

Выделенные штаммы являются продуцентами внеклеточных амилолитических, протеолитических и липолитических ферментов. На основе полученных данных и анализа морфологических характеристик клеток микроорганизмов, интервала роста температур, метаболических особенностей, штаммы распределены по их принадлежности к следующим родам: *Psychrobacter* (8 культур), *Azomonas* (2 культуры), *Amphibacillus* (2 культуры). В связи с тем, что в результате схожести биохимических характеристик при установлении видовой принадлежности культур выделенных микроорганизмов могут появляться трудности, необходимо провести молекулярно-генетические исследования.

Заключение

Таким образом, полученные данные показали перспективность и биотехнологический потенциал культур выделенных микроорганизмов.

Нами была проведена морфологическая, физиолого-биохимическая идентификация выделенных культур и получены 26 штаммов психрофильных и психротолерантных микроорганизмов. Также были определены таксоны 12 культур.

Дальнейшее исследование данных культур открывает возможности для использования их в различных областях биотехнологии, таких как – биоремедиация, пищевая и текстильная промышленность.

Конфликт интересов

Авторы не имеют конфликт интересов.

Благодарности

Авторы статьи благодарны Ерназаровой Алие Кулахметовне за ценные рекомендации по написанию статьи.

Литература

- 1 Pandey A. 16S rRNA gene sequencing and MALDI-TOF mass spectrometry based comparative assessment and bio-prospection of psychrotolerant bacteria isolated from high altitudes under mountain ecosystem //SN Applied Sciences. – 2019. – Т.1. – №. 3. – С. 278.
- 2 Morita R. Y. Psychrophilic bacteria //Bacteriological reviews. – 1975. – Т. 39. – №. 2. – С. 144.

- 3 Dhakar K., Pandey A. Microbial Ecology from the Himalayan Cryosphere Perspective //Microorganisms. – 2020. – Т.8. – №. 2. – С. 257
- 4 Ohgiya S. et al. Biotechnology of enzymes from cold-adapted microorganisms //Biotechnological applications of cold-adapted organisms. – Springer, Berlin, Heidelberg, 1999. – С. 17-34.
- 5 Feller G. Psychrophilic enzymes: from folding to function and biotechnology //Scientifica. – 2013. – Т. 2013.
- 6 Feller G. Protein stability and enzyme activity at extreme biological temperatures //Journal of Physics: Condensed Matter. – 2010. – Т. 22. – №. 32. – С. 323101.
- 7 Srimathi, S., Jayaraman, G., Feller, G., Danielsson, B., Narayanan, P.R., Intrinsic halotolerance of the psychrophilic α -amylase from *Pseudoalteromonas haloplanktis* //Extremophiles. – 2007. – Т. 11. – №. 3. – С. 505-515.2007
- 8 Aehle W. (ed.). Enzymes in industry: production and applications. – John Wiley & Sons, 2007.
- 9 Kuddus M., Roohi A. J. M., Ramteke P. W. An overview of cold-active microbial α -amylase: adaptation strategies and biotechnological potentials //Biotechnology. – 2011. – Т. 10. – №. 3. – С. 246-58.
- 10 Cavicchioli R. et al. Life and applications of extremophiles //Environmental Microbiology. – 2011. – Т. 13. – №. 8. – С.1903-1907.
- 11 Huston A. L. Biotechnological aspects of cold-adapted enzymes //Psychrophiles: from biodiversity to biotechnology. – 2008. – С. 347-363.
- 12 Hoyoux A. et al. Cold-adapted β -galactosidase from the Antarctic psychrophile *Pseudoalteromonas haloplanktis* //Applied and Environmental Microbiology. – 2001. – Т. 67. – №. 4. – С. 1529-1535.
- 13 Нетрусов А.И. Практикум по микробиологии. – М.: Издательский центр «Академия», 2005. – 608 с.
- 14 Дж Х. и др. Определитель бактерий Берджи //М.: Мир. – 1997. – Т. 1. – С. 1-429.
- 15 <https://bigenc.ru/geography/text/391058> (Большая Российская энциклопедия, электронная версия, дата обращения 23.01.2021)
- 16 <https://steelinside.com/tuyuk-su-map/> (Белоцерковский К. Схема вершин района Туяук-Су, дата обращения 23.01.2021)
- 17 Бактериальные сообщества в почвах криптогамных пустошей Восточной Антарктиды (оазисы Ларсеманн и Холмы Тала) / А. Г. Кудинова [и др.] // Почвоведение. – 2015, № 3 – С. 317
- 18 Ladygina N., Dedyukhina E. G., Vainshtein M. B. A review on microbial synthesis of hydrocarbons //Process Biochemistry. – 2006. – Т. 41. – №. 5. – С. 1001-1014.
- 19 Sarmiento F., Peralta R., Blamey J. M. Cold and hot extremozymes: industrial relevance and current trends //Frontiers in bioengineering and biotechnology. – 2015. – Т. 3. – С. 148.
- 20 Frias A. et al. Membrane vesicles: a common feature in the extracellular matter of cold-adapted Antarctic bacteria //Microbial ecology. – 2010. – Т. 59. – №. 3. – С. 476-486.
- 21 Kuddus M. et al. Cold-active extracellular α -amylase production from novel bacteria *Microbacterium foliorum* GA2 and *Bacillus cereus* GA6 isolated from Gangotri glacier, Western Himalaya //Journal of Genetic Engineering and Biotechnology. – 2012. – Т. 10. – №. 1. – С. 151-159.
- 22 Anduaem B. Isolation and screening of amylase producing thermophilic spore forming Bacilli from starch rich soil and characterization of their amylase activities using submerged fermentation //International Food Research Journal. – 2014. – Т. 21. – №. 2.
- 23 Keto-Timonen R. Cold shock proteins: a minireview with special emphasis on Csp-family of enteropathogenic *Yersinia* //Frontiers in microbiology. – 2016. – Т. 7. – С. 1151.
- 24 Shiozaki T. Biological nitrogen fixation detected under Antarctic sea ice //Nature Geoscience. – 2020. – Т. 13. – №. 11. – С. 729-732
- 25 Ewert M., Deming J. W. Selective retention in saline ice of extracellular polysaccharides produced by the cold-adapted marine bacterium *Colwellia psychrerythraea* strain 34H //Annals of Glaciology. – 2011. – Т. 52. – №. 57. – С. 111-117.
- 26 Kumar A. Microbial lipolytic enzymes—promising energy-efficient biocatalysts in bioremediation //Energy. – 2020. – Т.192. – С. 116674.
- 27 D'Amico S. et al. Psychrophilic microorganisms: challenges for life //EMBO reports. – 2006. – Т. 7. – №. 4. – С. 385-389.
- 28 Hoover R. B., Pikuta E. V. Psychrophilic and psychrotolerant microbial extremophiles in polar environments //Polar Microbiology: The Ecology, Biodiversity and Bioremediation Potential of Microorganisms in Extremely Cold Environments/Ed. by AK Bej, J. Aislabie, RM Atlas.–Boca Raton (Florida): CRC Press. – 2010. – С. 115-156.
- 29 Andersen D. T. et al. Discovery of large conical stromatolites in Lake Untersee, Antarctica //Geobiology. – 2011. – Т.9. – №. 3. – С. 280-293.
- 30 Диапазон температур для роста антарктических микроорганизмов / В. А. Романовская [и др.] // Микробиол. журн. – 2012. – № 74, N 4 – С. 13–19.
- 31 Мямин В. Е. Характеристика микроорганизмов, выделенных из «зеленого снега» прибрежной зоны Восточной Антарктиды //МИКРОБНЫЕ BIOTEХНОЛОГИИ: ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ И ПРИКЛАДНЫЕ АСПЕКТЫ. – 2016. – С. 106-125.

References

- 1 Pandey A. 16S rRNA gene sequencing and MALDI-TOF mass spectrometry based comparative assessment and bioprospection of psychrotolerant bacteria isolated from high altitudes under mountain ecosystem //SN Applied Sciences. – 2019. – Т.1. – №. 3. – С. 278.
- 2 Morita R. Y. Psychrophilic bacteria //Bacteriological reviews. – 1975. – Т. 39. – №. 2. – С. 144.
- 3 Dhakar K., Pandey A. Microbial Ecology from the Himalayan Cryosphere Perspective //Microorganisms. – 2020. – Т.8. – №. 2. – С. 257

- 4 Ohgiya S. et al. Biotechnology of enzymes from cold-adapted microorganisms //Biotechnological applications of cold-adapted organisms. – Springer, Berlin, Heidelberg, 1999. – S. 17-34.
- 5 Feller G. Psychrophilic enzymes: from folding to function and biotechnology //Scientifica. – 2013. – T. 2013.
- 6 Feller G. Protein stability and enzyme activity at extreme biological temperatures //Journal of Physics: Condensed Matter. – 2010. – T. 22. – №. 32. – S. 323101.
- 7 Srimathi, S., Jayaraman, G., Feller, G., Danielsson, B., Narayanan, P.R., Intrinsic halotolerance of the psychrophilic α -amylase from *Pseudoalteromonas haloplanktis* //Extremophiles. – 2007. – T. 11. – №. 3. – S. 505-515.2007
- 8 Aehle W. (ed.). Enzymes in industry: production and applications. – John Wiley & Sons, 2007.
- 9 Kuddus M., Roohi A. J. M., Ramteke P. W. An overview of cold-active microbial α -amylase: adaptation strategies and biotechnological potentials //Biotechnology. – 2011. – T. 10. – №. 3. – S. 246-58.
- 10 Cavicchioli R. et al. Life and applications of extremophiles //Environmental Microbiology. – 2011. – T. 13. – №. 8. – S.1903-1907.
- 11 Huston A. L. Biotechnological aspects of cold-adapted enzymes //Psychrophiles: from biodiversity to biotechnology. – 2008. – S. 347-363.
- 12 Hoyoux A. et al. Cold-adapted β -galactosidase from the Antarctic psychrophile *Pseudoalteromonas haloplanktis* //Applied and Environmental Microbiology. – 2001. – T. 67. – №. 4. – S. 1529-1535.
- 13 Netrusov A.I. Praktikum po mikrobiologii. – M.: Izdatel'skij centr «Akademiya», 2005. – 608 s.
- 14 Dzh H. i dr. Opredelitel' bakterij Berdzhii //M.: Mir. – 1997. – T. 1. – S. 1-429.
- 15 <https://bigenc.ru/geography/text/391058> (Bol'shaya Rossijskaya enciklopediya, elektronnyaya versiya, data obrashcheniya 23.01.2021)
- 16 <https://steelinside.com/tuyuk-su-map/> (Belocerkovskij K. Skhema vershin rajona Tuyuk-Su, data obrashcheniya 23.01.2021)
- 17 Bakterial'nye soobshchestva v pochvah kriptogamnyh pustoshej Vostochnoj Antarktidy (oazisy Larsemann i Holmy Tala) / A. G. Kudinova [i dr.] // Pochvovedenie. – 2015, № 3 – S. 317
- 18 Ladygina N., Dedyukhina E. G., Vainshtein M. B. A review on microbial synthesis of hydrocarbons //Process Biochemistry. – 2006. – T. 41. – №. 5. – S. 1001-1014.
- 19 Sarmiento F., Peralta R., Blamey J. M. Cold and hot extremozymes: industrial relevance and current trends //Frontiers in bioengineering and biotechnology. – 2015. – T. 3. – S. 148.
- 20 Frias A. et al. Membrane vesicles: a common feature in the extracellular matter of cold-adapted Antarctic bacteria //Microbial ecology. – 2010. – T. 59. – №. 3. – S. 476-486.
- 21 Kuddus M. et al. Cold-active extracellular α -amylase production from novel bacteria *Microbacterium foliorum* GA2 and *Bacillus cereus* GA6 isolated from Gangotri glacier, Western Himalaya //Journal of Genetic Engineering and Biotechnology. – 2012. – T. 10. – №. 1. – S. 151-159.
- 22 Andualet B. Isolation and screening of amylase producing thermophilic spore forming Bacilli from starch rich soil and characterization of their amylase activities using submerged fermentation //International Food Research Journal. – 2014. – T. 21. – №. 2.
- 23 Keto-Timonen R. Cold shock proteins: a minireview with special emphasis on Csp-family of enteropathogenic *Yersinia* //Frontiers in microbiology. – 2016. – T. 7. – S. 1151.
- 24 Shiozaki T. Biological nitrogen fixation detected under Antarctic sea ice //Nature Geoscience. – 2020. – T. 13. – №. 11. – S. 729-732
- 25 Ewert M., Deming J. W. Selective retention in saline ice of extracellular polysaccharides produced by the cold-adapted marine bacterium *Colwellia psychrerythraea* strain 34H //Annals of Glaciology. – 2011. – T. 52. – №. 57. – S. 111-117.
- 26 Kumar A. Microbial lipolytic enzymes—promising energy-efficient biocatalysts in bioremediation //Energy. – 2020. – T.192. – S. 116674.
- 27 D'Amico S. et al. Psychrophilic microorganisms: challenges for life //EMBO reports. – 2006. – T. 7. – №. 4. – S. 385-389.
- 28 Hoover R. B., Pikuta E. V. Psychrophilic and psychrotolerant microbial extremophiles in polar environments //Polar Microbiology: The Ecology, Biodiversity and Bioremediation Potential of Microorganisms in Extremely Cold Environments/Ed. by AK Bej, J. Aislabie, RM Atlas.–Boca Raton (Florida): CRC Press. – 2010. – S. 115-156.
- 29 Andersen D. T. et al. Discovery of large conical stromatolites in Lake Untersee, Antarctica //Geobiology. – 2011. – T.9. – №. 3. – S. 280-293.
- 30 Diapazon temperatur dlya rosta antarkticheskikh mikroorganizmov / V. A. Romanovskaya [i dr.] // Mikrobiol. zhurn. – 2012. – № 74, N 4 – S. 13–19.
- 31 Myamin V. E. Harakteristika mikroorganizmov, vydelennyh iz "zelenogo snega" pribrezhnoj zony Vostochnoj Antarktidy //MIKROBNIYE BIOTEKHNOLOGII: FUNDAMENTAL'NYE I PRIKLADNYE ASPEKTY. – 2016. – S. 106-125.