

Биология

УДК 576.809.51:577.472 (28)

Օ. Ա. ՓԱՆՕՅԱՆ, Ս. Վ. ԾՕՂԱԿՅԱՆ, ՅՈՒ. Գ. ՓՕՓՈՎ

ХАРАКТЕРИСТИКА ЭКСТРЕМОФИЛЬНЫХ ФОРМ БАЦИЛЛ,
РАСПРОСТРАНЕННЫХ В ВОДАХ БАСЕЙНА ОЗЕРА СЕВАН

Изучен видовой состав экстремофильных бацилл вод Севанского бассейна. На основании комплекса морфолого-культуральных и физиолого-биохимических свойств установлено таксономическое положение наиболее распространенных изолятов. Показано, что экстремофильная бациллярная микрофлора в основном представлена видами *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, *B. stearothermophilus* и *B. alcalophilus*.

Жизнь водоема – это непрерывная цепь превращения органических и минеральных веществ, как образующихся в самом водоеме, так и привносимых извне. Микроорганизмы обеспечивают цикличность круговорота всех главных элементов и осуществляют энергетическую взаимосвязь процессов, происходящих в разных экологических зонах единой экосистемы [1–3]. Для оценки экологического состояния водоема важно выявление частоты встречаемости, доминирования того или иного вида или рода, а также таксономической структуры отдельных экологических ниш [2].

Состав микробных ассоциаций и направление доминирующих микробиологических процессов в значительной степени определяются геоэкологической характеристикой местности (рельефом, уровнем грунтовых вод, физико-химическими параметрами и т.д.) [4–6]. Кроме того, уникальная экосистема оз. Севан и его бассейна подвержена сильному влиянию антропогенных и природных воздействий, связанных с колебаниями уровня озера, геохимическими аномалиями, тектонической активностью и др. [6]. Такие условия среды обитания способствуют формированию экологических ниш с характерными сообществами экстремофильных микроорганизмов. Эти ниши служат источником для получения культур указанных организмов [7, 8].

Представленная работа является продолжением наших исследований [7, 8] по микробиологии вод Севанского бассейна и имеет цель изучить видовое разнообразие выделенных экстремофильных культур бацилл.

Материал и методика. Выделение экстремофильных форм бацилл проводили путем получения накопительных культур [9]. Чистые культуры получали рассевом накопительных культур на соответствующие твердые среды. Термофильные культуры выращивали на пептонно-кукурузном агаре

(ПКА) [10] при 56°С в течение 24 ч; алкалофильные – на среде Хорикоши [11] с начальным рН 10 при 30–37°С в течение 2–5 суток; термогалофильные – на специальной среде [12] с содержанием 12% NaCl при 56°С в течение 24 ч. Монокультуры сохраняли на специфических для каждой формы питательных средах.

Изучение физиолого-биохимических особенностей для диагностики культур осуществляли методами, описанными в [13] и [14], с корректировкой условий в зависимости от потребностей изучаемой экстремофильной формы бактерий. Штаммы идентифицировали до вида с помощью диагностических ключей определителя Берге [15, 16] и с учетом характеристик экстремофильных бактерий в первоисточниках [10–12].

Результаты и обсуждения. Из разных образцов воды и ила Севанского бассейна выделены 24 культуры экстремофильных аэробных спорообразующих бактерий, в том числе 15 термофильных (Т), 6 алкалофильных (А) и 3 галофильных (Г) [8].

Таблица 1

Физико-химические характеристики некоторых экологических ниш Севанского бассейна и выделенные штаммы экстремофильных форм бактерий (сентябрь, 2000 г.)

Место отбора пробы (координаты, субстрат, глубина)	T, °C	pH	Eh, мВ	Минерализация, мг/л	Эл. проводность, мкСм/см	Содержание кислорода, мг/мл	Штаммы
Фонтанирующая скважина № 5 на берегу р. Дзкнагет, вода [7]	18	7,0	-128	2418	4030	8	Т-Г-28
ненапорная скважина № 7 на берегу р. Дзкнагет, наблюдается эмиссия метана, ил, 3 м [7]	9,7	9,4	-220	1216	2020	8	А-Х-2
Малый Севан N40°35,150', E45°3,838', иловая вода, 60–70 м	7,8	8,7	139	488	806	9,4	Т-25
Большой Севан N40°23,91', E45°23,03', наблюдается эмиссия метана с поверхности воды, ил, 20 м	17,9	9,2	180	492	805	7,4	Т-М-Б

Примечание: N – северная широта, E – восточная долгота.

Физико-химические показатели окружающей среды и данные о наиболее распространенных экстремофильных формах бактерий приведены в таблице 1. Из нее видно, что корреляция между экстремофильными свойствами выделенных штаммов и физико-химическими параметрами окружающей среды наблюдается не всегда. Алкалофильные культуры выделены из проб с щелочной средой, а термофильные культуры – из проб, отобранных из мест с температурой не выше 18°С. Обнаружение термофильных бактерий в иловых образцах оз. Севан не является неожиданностью, так как известно, что их нахождение не всегда связано с термальными зонами: они встречаются в разно-

образных и часто необычных условиях окружающей среды, включая арктические ледники и только что выпавший снег. Выявление термофильных бактерий показывает влияние природных (напр., существование на дне озера термальных источников) или антропогенных (напр., слив сельскохозяйственных и бытовых отходов) факторов на экосистему озера.

Таблица 2

Некоторые морфологические, физиологические и биохимические признаки выделенных экстремофильных бактерий

Признаки бактерий	Штаммы			
	T-25	T-Г-28	T-М-Б	A-X-2
Размеры клеток				
ширина, мкм	0,7	1	<1	0,8
длина, мкм	3,2	3,2	2,8	2,3
Форма спор	O	O	O	O
Расположение спор	Тр	СТр	Ц	СТр
Раздувание спорангия	+	-	-	-
Анаэробный рост	-	+	-	-
Реакция Фогеса-Проскауэра	-	+	+	+
Кислота из				
D-глюкозы	+	+	+	±
L-арабинозы	-	+	+	-
D-ксилозы	+	+	+	-
D-маннита	-	+	+	-
D-рафинозы	-	+	+	+
D-сорбита	-	+	+	-
мальтозы	-	+	+	-
D-галактозы	-	+	+	-
дульцита	-	+	+	+
целлобиозы	-	+	+	-
D-фруктозы	+	+	+	-
L-рамнозы	-	+	+	-
сорбозы	-	-	±	-
лактозы	-	+	+	±
инозита	-	+	+	-
Гидролиз				
казеина	-	+	+	-
желатины	+	+	+	-
крахмала	+	+	+	-
твин-20	+	+	+	-
твин -40	-	+	+	-
твин -60	-	+	-	-
Усвоение цитрата	-	+	+	-
Нитратредукция	+	+	+	-
Образование				
дигидроксиацетона	-	+	+	-
лецитиназы	-	+	+	-
Рост в присутствии NaCl:				
2%	+	+	+	+
7%	-	+	+	+
10% и 12%	-	+	-	-
Интервалы pH	6,5-8,5	6-9,5	6,5-9	6,5-11
Диапазон температуры роста, °C	35-75	20-65	5-60	25-40

Условные обозначения: O – овальная или эллипсоидальная форма спор; Ц – центральное, Тр – терминальное, СТр – субтерминальное расположение спор.

Высокая степень минерализации способствует развитию термогалофилов. Развитие этих микроорганизмов – результат одновременного воздействия нескольких экстремофильных факторов внешней среды.

Доминирование того или иного вида экстремофильных бактерий определяли по тому, насколько обильно он был представлен в изучаемых экологических нишах. Для определения таксономического статуса выделенных штаммов исследованы диагностически важные морфолого-культуральные, физиологические и биохимические признаки. Термофильный штамм Т-М-Б и термогалофильный штамм Т-Г-28 на ПКА и синтетических средах с углеводами и аммонийным азотом образуют округлые, непрозрачные, гладкие, но позже становящиеся морщинистыми, влажные, однородные и плоские колонии диаметром 3–5 мм. На ПКА, картофельном и мясопептонном агаре колонии штамма Т-М-Б образуют беловато-кремовую, а штамма Т-Г-28 – розовато-коричневую пигментацию. Округлые колонии термофильного штамма Т-25 на ПКА гладкие, однородные, бесцветные с ровным краем и диаметром до 3 мм, вначале прозрачны, но в результате спорообразования становятся opakовыми. Алкалофильный штамм А-Х-2 на среде Хорикиши образует округлые, непрозрачные, гладкие, гомогенные и плоские колонии желтоватого цвета с неровными краями. Все изученные бактерии представлены подвижными спорообразующими прямыми палочками, окрашивающимися положительно по Граму. Образуются в основном овальные споры с терминальным (штамм Т-25), центральным (штамм Т-М-Б) или субтерминальным расположением (штаммы Т-Г-28 и А-Х-2).

Штаммы различаются по способности к росту на средах с различными источниками углерода и концентрациями NaCl, имеют разные интервалы pH и температуры роста (табл. 2). Так, среди термофилов, наряду с термотолерантным или факультативным термофилом (штамм Т-М-Б), выявлена облигатная форма (штамм Т-25), диапазон температуры роста которой находится в пределах 35–75°C, с оптимумом 60–65°C. Облигатным алкалофилом можно считать штамм А-Х-2, рост которого происходит в среде pH 7–11,5. Штамм Т-Г-28 является факультативным галофилом, который выдерживает NaCl в концентрации до 15%. Одновременно он является факультативным термофилом, максимальная температура роста которого достигает 65°C, хотя он может расти и при комнатной температуре.

Для идентификации выделенных микроорганизмов необходимо было изучить их биохимические свойства. Эта часть работы была важна еще и потому, что экстремофильные микроорганизмы могут служить ценным источником стабильных ферментов и соответствующих генов. Результаты изучения их ферментативной активности по показателям роста на соответствующих субстратах представлены в табл. 2.

Проверка биохимических свойств штаммов выявила значительную гидролизную активность, которая особенно высока по отношению к крахмалу, желатине, казеину и липидам среди термофильных культур.

Все новые изоляты являлись хемоорганотрофными каталазоположительными бактериями, которые газ на среде с глюкозой, азот на среде с нитратом, а также индол или сероводород не образовывали, пропионат не

усваивали, тирозин, фенилаланин и мочевины не расщепляли. Все штаммы были способны использовать в качестве источника азотного питания нитраты. Штаммы Т-25, Т-Г-28 и Т-М-Б накапливали нитриты.

При определении таксономической принадлежности, наряду с широко известными видами бактерий *Bacillus subtilis subsp. thermophilus* (штамм Т-М-Б), *B. licheniformis subsp. halothermophilus* (штамм Т-Г-28), установлено наличие облигатной термофильной бактерии *B. stearothermophilus* (штамм Т-25). Фенотипические анализы не позволяют окончательно идентифицировать штамм А-Х-2, хотя по некоторыми физиолого-биохимическим признакам он похож на *B. alcalophilus*, известный как облигатный алкалофил.

Для уточнения таксономического положения изолятов предусматриваются хемотипические (изучение жирно-кислотного профиля) и генотипические (определение содержания ГЦ-оснований в ДНК и уровня сходства ДНК, секвенирование 16S рРНК) анализы.

Выделенные культуры экстремофильных бактерий сохраняются в коллекции культур микроорганизмов кафедры микробиологии, биотехнологии микроорганизмов и растений ЕГУ и научно-исследовательской компании «Геориск» для дальнейших исследований с целью изучения возможностей их использования в биотехнологических производствах.

Кафедра микробиологии,
биотехнологии микроорганизмов и растений

Поступила 07.11.2005

ЛИТЕРАТУРА

1. Wetzel R.G. Limnology: Lake and River Ecosystems. III edition. San Diego and London: Academic Press, 2001.
2. Экология микроорганизмов. Под ред. А.И. Нетрусова. М.: Издательский центр "Академия", 2004.
3. Громов Б.В., Павленко Г.В. Экология бактерий. Л.: Изд-во Ленинградского университета, 1989.
4. Varnam A.H., Evans M.G. Environmental Microbiology. London: Manson Publishing Ltd, 2000.
5. Жизнь микробов в экстремальных условиях. Под ред. Д. Кашнера. М.: Мир, 1981.
6. Karakhanian A., Tozalakyan P., Grillot J.C., Philip H., Melkonyan D., Paronyan R., Arakelyan S. – Environmental Geology, 2001, v. 40, № 3, p. 279–288.
7. Паносян О.А., Тозалакян П.В., Агаджанян Дж.А., Попов Ю.Г. – Ученые записки ЕГУ, 2002, № 2, с. 116–120.
8. Паносян О.А., Тозалакян П.В., Попов Ю.Г. – Ученые записки ЕГУ, 2005, № 1, с. 106–111.
9. Егоров Н.С. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. Практ. пособие, 2-е изд. М.: Изд-во Моск. Ун-та, 1983.
10. Логинова Л.Г., Головачева Р.С., Егорова Л.А. Жизнь микроорганизмов при высоких температурах. М.: Наука, 1966.
11. Horikoshi K., Akiba T. Alkalophilic Microorganisms: A New Microbial World. Tokyo, Berlin, Heidelberg, New York: Jpn. Sci. Press, Springer - Verlag, 1982.
12. Larsen H. The prokaryotes: A Handbook of Habitats, Isolation and Identification of Bacteria. Berlin, Heidelberg, New York: Springer - Verlag, 1981.
13. Gordon R.E., Haynes W.C., Pang C.H.W. The Genus *Bacillus*. Agric. Handbook Washington: D.C., 1973.

14. Смайберт Р., Криг Н. Общая характеристика. В кн. Методы общей бактериологии. (под редакцией Ф. Герхардта и др.). Т. 3. М.: Мир, 1984.
15. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Eds. Sneath P.H.A, Mair N.S., Sharpe M.E., Holt J.G.). V. 2. Baltimore: The Williams and Willkins Co., 1986, p. 1104-1139.
16. Краткий определитель бактерий Берге (под ред. Дж.М. Хоулота). М.: Мир, 1980.

Հ. Հ. ՓԱՆՈՍՅԱՆ, Պ. Վ. ԹՈՋԱԼԱԿՅԱՆ, Յու. Գ. ՊՈՊՈՎ

ՄԵՎԱՆԱ ԼՃԻ ԱՎԱԶԱՆԻ ՋՐԵՐՈՒՄ ՏԱՐԱԾՎԱԾ ԷՔՏՐԵՄՓԻԼԻԿ ԲԱՑԻԼՆԵՐԻ ԲՆՈՒԹԱԳԻՐԸ

Ամփոփում

Հետազոտվել է Սևանա լճի ավազանի ջրերում էքստրեմոֆիլ մանրէների տեսակային բազմազանությունը: Մորֆոլոգիական, կուլտուրային, կենսաքիմիական և ֆիզիոլոգիական հատկանիշների համախմբի հիման վրա որոշվել է առավել տարածված բացիլների տեսակային պատկանելիությունը: Ցույց է տրվել, որ էքստրեմոֆիլ բացիլների միկրոֆլորան ներկայացված է հիմնականում *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, *B. stearothermophilus* և *B. alcalophilus* տեսակներով:

H. H. PANOSYAN, P. V. TOZALAKYAN, Yu. G. POPOV

DESCRIPTION OF THE MOST COMMON EXTREMOPHILIC BACILLI IN WATERS OF LAKE SEVAN BASIN

Summary

The diversity of extremophilic bacilli in waters of Lake Sevan basin was studied. On the base of morphological, cultural, physiological and biochemical properties the taxonomic position of the most common isolates was determined. It was shown that the microflora of extremophilic bacilli was represented by species *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, *B. stearothermophilus* and *B. alcalophilus*