

## НОВЫЕ ШТАММЫ ГАЛОФИЛЬНЫХ БАЦИЛЛ

М.О.АЦАМЯН

*Институт микробиологии НАН и Республиканский Центр депонирования микробов НАН и Министерства образования и науки РА, 378510, г.Абовян*

Из различных почв, в том числе солончаков Армении и других стран, выделено и изучено 28 культур галофильных бактерий. Среди изученных культур - 5 штаммов облигатных галофилов, не развивающихся при содержании ниже 7% NaCl.

На основе результатов изучения морфологических характеристик исследованные штаммы выделены в отдельные группы с указанием типичных представителей и ранее описанных родственных таксонов.

Создана коллекция этих штаммов и их База данных, которые включены в коллекцию Республиканского Центра депонирования микроорганизмов Армении.

Տարբեր հողամուշներից, այդ թվում Հայաստանի և այլ երկրների աղուտներից մեկուսացվել և ուսումնասիրվել են 28 հալոֆիլ բացիլների կուլտուրաներ: Ուսումնասիրված կուլտուրաների թվում կան օրգանա հալոֆիլների 5 շտամներ, որոնք չեն աճում 7%-ից ցածր NaCl պարունակող միջավայրի վրա:

Սորձո-ֆիզիոլոգիական հատկությունների ուսումնասիրման հիման վրա մեկուսացված շտամները բաժանվել են առանձին խմբերի՝ մատնանշելով տիպիկ ներկայացուցիչները և նախկինում նկարագրված մերձավոր տարրերը:

Ստեղծված են այդ շտամների հավաքածու և Տվյալների բազան, որոնք ընդգրկված են Հայաստանի Մանրէների Ավանդադրման Հանրապետական Սենտրոնի հավաքածուի մեջ:

28 strains of halophilic bacilli have been isolated and studied from various soils including salted soils of Armenia and other countries. Among the cultures studied there are 5 strains of obligative halophiles not able to grow on media with less than 7 per cent of sodium chloride.

On the basis of morpho-physiological properties isolated cultures were divided into different groups with indication of typical strains and early described related taxa.

The Collection and Database of cultures studied were created and included in the Republican Centre for Deposition of Microorganisms of Armenia.

### *Галофильные бактерии - галофилы - База данных микробов*

Одним из основных направлений современной микробиологии и биотехнологии является изучение и применение экстремофильных форм, в частности галофильных микроорганизмов [4,9,13]. Галофилы описаны и изучены в основном среди представителей неспороносных микроорганизмов [ 2,12,14,15]. Другой важнейшей группой галофильных организмов являются аэробные спорообразующие бактерии сравнительно мало изученные, но нашедшие важное промышленное применение в производстве циклодекстринов и некоторых ферментов [11].

Целью настоящей работы являлось выделение галофильных бактерий из почв Армении и других регионов и изучение их физиолого-биохимических особенностей.

**Материал и методика.** Культуры выделяли из солончаков Казахстана, Армении, Болгарии, а также других типов почв Туркмении, Аджарии и Индии.

Выделение культур проводилось высевом из пастеризованных и непастеризованных разведений почв на агаризованные среды с различными концентрациями NaCl, от 12 до 23%, используемые для

культивирования галофильных микроорганизмов [2].

Состав питательной среды (г/л): пептон-10,0; дрожжевой экстракт-1,0; NaCl-150,0; KCl-2,0; натрий лимоннокислый трехзамещенный-3,0;  $MgSO_4$  -20,0; CaCl<sub>2</sub> -следи; агар-20,0; pH 7,2.

Чистые культуры получали рассевом накопительных культур на твердые среды того же состава с последующим высевом в пробирки с агаризованной средой.

Выращивание культур проводили в конических колбах Эрленмейера емкостью 300 мл, заполненных 50 мл жидкой среды. Инкубирование вели при 37° на водяной качалке с режимом работы 180 об/мин. С целью выявления галофилии культур их выращивали при содержании различных концентраций NaCl до насыщенных растворов соли.

Для изучения физиолого-биохимических особенностей использовали известные дифференциальные тесты, принятые для исследования аэробных спорообразующих бактерий [8,10].

**Результаты и обсуждение.** Работами Каннера и других авторов [2,4,7] установлена приуроченность распространения галофильных микроорганизмов в субстратах с высоким содержанием NaCl.

Сводные данные наших микробиологических анализов представлены в таблице. Как показывают результаты этих исследований, галофильные бациллы обнаруживаются в солончаках, сероземах, красноземах, иле и образцах ассенизационных отходов. Как правило, их обилие приурочено к субстратам с наиболее богатой микрофлорой и органикой. Например, галофилы широко представлены в ассенизационных отходах и в иле. Обнаруживается некоторое повышенное содержание их в солончаках.

В целом, можно отметить, что облигатные и в определенной степени факультативные галофильные бациллы выявляются в различных типах почв без какой-либо эколого-географической закономерности их распространения. Известно, что это явление было отмечено и в работах Мишустина и его сотрудников [5,6] в отношении распространения термофильных бацилл.

В наших опытах оптимум роста облигатных галофилов отмечался при концентрации NaCl в пределах 15-23%, а у факультативных культур галофилов - в пределах 15%. У галотолерантных штаммов оптимальный рост отмечался при концентрации соли 10-12%.

Исходя из изложенного и учитывая слабую изученность галофильных бацилл, в особенности в таксономическом плане, выделенные нами культуры условно разделены на отдельные группы в зависимости от их галофильности:

- штаммы облигатных галофилов, развивающиеся при концентрации NaCl в среде от 7 до 23% и не растущие в среде с содержанием 5% NaCl, всего 5 штаммов;
- штаммы факультативных галофилов, развивающиеся при содержании NaCl от 5 до 20%, всего 9 штаммов;
- штаммы галотолерантных микроорганизмов, развивающиеся при концентрации NaCl до 15%, всего 14 штаммов.

Внутри указанных групп выделены отдельные подгруппы в соответствии с некоторыми их морфофизиологическими особенностями.

За исключением единичных штаммов, каковыми являются представители облигатных галофилов - штг., штг. 3837', 3838 и некоторые другие, у остальных при спорообразовании спорангий раздувается по типу кластрициального и плекстрициального расположения. Форма спор у выделенных штаммов варьирует от

\* Здесь и далее номера штаммов представлены по коллекции Республиканского Центра депонирования микробов НАН и Министерства образования и науки РА (РЦДМ) с условным акронимом ИНМИА.

## Распространение различных групп галофилов в почве\*

Субстрат, регион	Количество обследованных образцов	Распространение отдельных групп галофилов		
		облигатные	факультативные	галотолеранты
Ассептизационные отходы и ил, Ияля (д.Насия, Шахбобад)	6	—	—	—
Серозем целинный, Туркмения	3	-	-	—
Соловчак, Болгария	4	-	-	—
Сульфатно-хлоридный соловчак-солончак, Армения	3	-	-	-
Лечебная грязь, г.Поморие, Болгария	2	-	-	-
Заброшенная шахта, Индия	4	-	-	-
Пруд, ил, Индия	5	-	-	—
Краснозем, Аджария	2	-	-	-
Соловчак, Казахстан	6	-	-	-
Термальный источник, Камчатка	3	-	-	-
Кислая торфяная почва, Венгрия	2	-	-	-
Карбонатный чернозем, Армения	3	-	-	-
Горнолуговая почва, Памир	2	-	-	-
Серозем целинный, Ашхабадский район	4	-	-	-
Почва с высоты 3300м, Тянь-Шань	3	-	-	-
Почва из-под хлопчатника, Ташкентская обл.	2	-	-	-
Почва из русла реки, Болгария	2	-	-	-

\* Условные обозначения: (-) - отсутствие указанной группы; (+++) - наличие в обильном, (++) - умеренном и (+) - единичном количествах.

сферических, округлых до овальных и эллипсоидных.

Что касается культуральных особенностей, то изученные штаммы бактерий на агаризованной среде Звягинцевой указанного выше состава образуют гладкие, влажно- и жирноблестящие, беловато-кремовые, округлые колонии различной степени роста. Штамм 3853 образует розоватые колонии без пигментации среды. Колонии в среду не врастают.

На основании комплекса морфологических и физиолого-биохимических особенностей изученные нами галофильные организмы могут быть распределены по следующим группам и подгруппам с указанием типичного штамма и родственных таксонов. Исследованная нами коллекция штаммов характеризуется обилием свойствами, ростом в анаэробных и микроаэрофильных условиях, отсутствием нитролообразования. За исключением штамма 3841, все изученные культуры дигидроксиацетон не образуют, в равной степени гидролиз казеина обнаружен лишь у штамма 3854. Помимо применения общепринятых микробиологических тестов, нами изучены образование дигидроксиацетона (ДГА) и реакция Вогеса-Проскауэра (VP).

Группа 1. Спорангий раздувается с образованием терминальных эллипсоидных спор. Культуры родственны *B. polymyxa*, *B. circulans* и *B. halophilus*.

- 3841-реакция V-P и денитрификация положительные, крахмал гидролизует, ДГА не образует;

- 3859-денитрификация положительная, крахмал, желатин гидролизует, ДГА не образует, реакция V-P отрицательная;

— 3839-крахмал не гидролизует;

- 3836, 3857-крахмал и желатин гидролизуют, реакция V-P и денитрификация отрицательные, ДГА не образуют;

Типичный штамм- 3836.

— 3858-крахмал не гидролизует.

Группа 2. Спорангий раздувается с образованием терминальных сферических спор. Культуры данной группы бактерий родственны *B. sphaericus*, *B. halophilus*.

- 3863-денитрификация и реакция V-P положительные, казеин, крахмал, желатин гидролизует;

— 3844-реакция V-P отрицательная;

— 3849-желатин не гидролизует;

— 3843-денитрификация отрицательная;

— 3842,3846,3856,3860,3861,3862-реакция V-P отрицательная;

Типичный штамм- 3846;

— 3840,3847-крахмал не гидролизуют;

Типичный штамм- 3847;

— 3848-желатин не гидролизует;

- 3845-казеин гидролизует, денитрификация, реакция V-P отрицательные, крахмал и желатин не гидролизует.

Группа 3. Спорангий не раздувается с образованием терминальных эллипсоидных спор. Культуры данной группы родственны *B. firmus*, *B. pumilus*.

- 3852-денитрификация положительная, реакция V-P отрицательная, крахмал и желатин гидролизует;

— 3837-денитрификация отрицательная.

Подгруппа 3.1. Спорангий не раздувается с образованием парацентральных эллипсоидных продолговатых спор.

-3850, 3853-денитрификация и реакция V-P отрицательные, крахмал и желатин гидролизуют.

Типичный штамм- 3853.

Подгруппа 3.2. Спорангий не раздувается с образованием овальных спор.

-3851- реакция V-P, денитрификация положительные, крахмал, желатин гидролизует;

—3838- реакция V-P, денитрификация отрицательные;

—3855- крахмал и желатин не гидролизует.

Группа облигатных галофильных бацилл представлена 5 штаммами, из которых 3 (3836,3839,3840) характеризуются образованием раздувающихся спорангиев с образованием овальных терминальных спор. Два других штамма облигатных галофилов характеризуются нераздуваемым спорангием с образованием овальных парацентральных спор (3837,3838). Оптимум роста этих штаммов при 12-15% NaCl.

Группа факультативных галофильных бацилл представлена 9 штаммами (3841-3849), которые характеризуются раздутым спорангием с образованием сферических или овальных спор. Оптимум роста культур данной группы при 12% NaCl.

Группа галотолерантных штаммов представлена 14 культурами (3850-3863), где выявляются бактерии как с раздувающимися, так и нераздувающимися клетками при их спорообразовании. Штаммы с нераздувающимися спорангиями представлены культурами 3850, 3851, 3852, 3855. Оптимум роста культур галотолерантных бацилл при содержании в среде 7% NaCl, однако некоторые из них хорошо растут при содержании 12% NaCl.

Следует подчеркнуть, что в наших опытах оптимум роста и вегетативного

развития изученных культур не всегда коррелирует с интенсивностью спорообразования. Так, для большинства исследованных культур спорообразование было более выраженным при содержании NaCl 7%, иногда 12%.

Изучение ферментативных свойств выделенных галофильных бацилл выявило наличие среди них активных продуцентов аспартазы (3841, 3843, 3850, 3851, 3855), бета-галактозидазы (3841, 3842) и цикломальтодекстрин-глюканотрансферазы (3848, 3849).

С использованием штамма 3849 было изучено образование циклодекстринов и установлен направленный биосинтез бета-циклодекстрина [1].

Подробное изучение морфофизиологических и биохимических свойств выделенных штаммов даст основание выделить некоторые из них в новые таксоны, описанию которых будет посвящена отдельная статья.

Все указанные штаммы с соответствующей характеристикой депонированы в Республиканском Центре депонирования микробов Армении [3].

Данная работа частично финансировалась за счет гранта 93-3512 ИНГАС.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Абелян В.А., Адамян М.О., Абелян Л.А., Балаян А.М., Африкян Э.К. Биохимия, 60, 6, 891-897, 1995.
2. Звягинцева И.С., Тарасов А.Л. Микробиология, 56, 5, 839-844, 1987.
3. Каталог культур микроорганизмов. Республиканский Центр депонирования микробов (РЦДМ). Под ред. Африкяна Э.Г., Хачатурян А.А., изд-во "Гитутюн" НАН Армении. 260, Ереван, 1996.
4. Жизнь микробов в экстремальных условиях. Под ред. Д. Кашнера, 520, М., 1981.
5. Мишустин Е.И. Термофильные микроорганизмы в природе и практике. 390, М., 1950.
6. Мишустин Е.И., Перцовская М.И. Микроорганизмы и самоочищение почвы. 659, М., 1954.
7. Хачатурян А.А., Казанчян Н.Л., Хачатурян И.С., Адамян М.О., Хачикян Л.А. Биол. журн. Армении, 48, 1, 12-18, 1995.
8. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, 2, 1104-1139, 1986.
9. Dundas I.F.D. Physiology of Halobacteriaceae. In: Advances in microbial physiology, L., N.Y., S.F.: Academic Press, 85-120, 1977.
10. Gordon R.E., Haynes W.C., Pang C.H.W. The Genus Bacillus. USD of Agriculture, Washington D.C., 283, 1973.
11. Horikoshi K., Akiba T. Alkalophilic microorganisms. A new microbial world. Tokyo: Springer Verlag., 215, 1982.
12. Javor B., Requadi C., Stoeckenius W. J. Bacteriol., 151, 3, 1532, 1982.
13. Larsen H. The Procarvates. Berlin-Heideeburg-New York: Springer-Verlag, 1, 78, 985-994, 1981.
14. Rodrigues-Valera F., Guadalupe J., Kushner D.J. Syst. Appl. Microbiol., 4, 3, 369, 1983.
15. Tindall B.J., Ross H.N.M., Grant W.D. Syst. Appl. Microbiol., 5, 11, 41, 1984.

Получила 16.VIII.1995.