НОВЫЕ ЭКСТРЕМОФИЛЬНЫЕ ФОРМЫ БАЦИЛЛ ИЗ ПОЧВ АРМЕНИИ

О.А. ПАНОСЯН*, П.В. ТОЗАЛАКЯН**, А.В. ГАСПАРЯН***, Ю.Г. ПОПОВ*

**Ереванский государственный университет,
кафедра микробиологии и биотехнологии, 375025*

***Научно-исследовательская компания "Геориск", 375019, Ереван*

****Республиканский Центр депонирования микробов НАН и
Министерства науки и образования Армении, 378510, Абовян*

Изучен качественный и количественный состав почвенной микрофлоры участка термальной и геохимической аномалии Дилижана. Выделены новые штаммы экстремофильных бацилл, в том числе - термофильные, алкалофильные, галофильные и термогалофильные. Определены некоторые ферментативные активности этих штаммов и отобраны активные продуценты ферментов.

Անուճանասիրվել է Դիլիջանի ջերմային և երկրաքիմիական անոմալիայով տեղանասի հողային միկրոֆլորայի որակական և քանակական կազմը: Անջատվել են էքստրեմոֆիլ էնզիմատիվ բացիլների նոր շտամներ, այդ թվում ջերմասեր, հիմնասեր, աղասեր և ջերմաաղասեր: Որոշվել են նրանց մի շարք ֆերմենտային ակտիվությունները և ընտրվել են ֆերմենտների ակտիվ արտադրիչները:

The qualitative and quantitative composition of soil microflora from the site of thermal and geochemical anomaly of Dilijan has been investigated. The new extremophilic strains of bacilli, including thermophilic, alcalophilic, halophilic and thermohalophilic forms, have been isolated. Some enzymatic activities of these strains were determined and active producers of enzymes were selected.

*Почвенная микрофлора - термальные и геохимические аномалии -
экстремофильные формы бацилл - ферментативная активность*

В настоящее время изучению биоразнообразия экстремофильных форм микроорганизмов придается большое значение. В частности, особенности метаболизма этих микроорганизмов могут быть использованы в биотехнологических производствах [4]. Установлена приуроченность экстремофильных форм микроорганизмов к разнообразным естественным местообитаниям с экстремальными условиями внешней среды [6, 10].

Большое разнообразие эколого-географических условий Армении и активно идущие геологические процессы, зачастую сопровождаемые антропогенными воздействиями, приводят к проявлению геохимических и биологических аномалий [9, 11]. Это создает прекрасную возможность для изучения экологии экстремофильных микроорганизмов, а участки с аномалиями являются источником выделения их новых перспективных форм [7, 8].

В 1999 г. в Дилижане в результате наложения оползневых процессов и антропогенного фактора произошла утечка бытовых сточных вод. Таким образом, создались условия для бурного роста биомассы, что привело к локальному повышению температуры почвы.

В представленной работе изучена почва участка термальной и геохимической аномалии Дилижана, выявлен состав микрофлоры, в том

числе экстремофильных форм бацилл. Обобщены результаты определения ряда ферментативных активностей, проявляемых термофильными, алкалофильными, галофильными и термогалофильными формами бацилл.

Материал и методика. Исследовали почву из разных глубин с участка термальной и геохимической аномалии. Температуру, pH и Eh, электропроводность и степень минерализации почвы измеряли в полевых условиях с помощью pH-метра WTW-320, оксиметра WTW-OX1-96 и кондуктометра WTW-LF-95.

Выделение аэробных спороносных и неспороносных бактерий, в том числе их экстремофильных форм, и микромицетов проводили методами накопительных культур и прямого посева разведения навески образцов на питательные среды. Мезофильные культуры выращивали на мясопептонном агаре при 37° в течение 24 ч; термофильные - на пептонно-кукурузном агаре [6] при 56° в течение 24 ч; алкалофильные - на среде Хориоши [10] с начальным pH среды 9-10 при 30-37° в течение 2-5 суток; галофилы и термогалофилы - на специальной среде [12] с содержанием 12% NaCl при 37° и 56° соответственно в течение 2-5 суток.

Микромицеты выращивали на сусло-агаре при 30° в течение 5-7 суток.

Колонии описывали по размеру, поверхности, блеску, цвету, краям, структуре и консистенции. Морфологические особенности клеток микроорганизмов (форма вегетативных клеток, спорообразование, форма и расположение спор) исследовали под микроскопом марки Olympus CH-2.

Для выявления ряда ферментативных активностей исследуемые микроорганизмы высевали на средах, содержащих соответствующие субстраты (1%): картофельный крахмал, микрокристаллическую целлюлозу (MN300 0,002-0,02 мм), яблочный пектин, инулин, лактоза, казеинат Na, разные жиры (маргарин, сливочное, пальмовое, оливковое, подсолнечное масла). О ферментативных активностях - амилолитической, целлюлолитической, пектинолитической, инулиназной, β-галактозидазной, казеинолитической и липолитической судили по характеру роста и образованию прозрачной зоны вокруг колонии микроорганизмов. Гидролиз крахмала контролировали обработкой агаровой пластинки раствором Люголя [6].

Определение цикломальтодекстрин глюканотрансферазной (ЦГТ-аза) активности и наличия циклодекстринов (ЦД) проводили в жидких средах с крахмалом методами Тильден-Хадсона [13] и Кестнера [5]. Продукты гидролиза крахмала в реакционной смеси определяли методом тонкослойной хроматографии в системе n-бутанол-уксусная кислота-вода (4:3:3). Сахара и ЦД на хроматограммах проявляли раствором анилинфталата в водонасыщенном n-бутаноле и газообразным йодом.

Желатиназную активность определяли экспресс-методом с использованием стерильных фотопленок [3].

Результаты и обсуждение. В литературе детально описаны все эколого-географические зоны и типы почв в Армении [8], а также дана характеристика бациллярной [2], в том числе экстремофильной микрофлоры [7]. Однако специфика обследованного участка, являющаяся следствием антропогенного воздействия, требовала его изучения. Характеристика физико-химических параметров и микрофлоры почвы с участка термальной и геохимической аномалии Дилижана приведены в таблицах.

В табл. 1 обобщены физико-химические показатели образцов почв.

Как видно из таблицы, температура почвы с глубиной повышается, pH становится более щелочным, одновременно повышаются минерализация и электропроводность. Такие физико-химические особенности почвы должны способствовать развитию экстремофильных форм микроорганизмов. Так, высокая температура почвы позволяет ожидать наличие термофилов, высокое значение pH и высокая степень минерализации - соответственно алкалофилов и галофилов. Более того, одновременное воздействие нескольких

экстремальных факторов внешней среды может способствовать проявлению специфических физиологических свойств экстремофильных форм микроорганизмов.

Таблица 1. Физико-химические показатели образцов почв участка термальной и геохимической аномалии Дилижана

Глубина почвы, м	Температура, °С	pH	Электропроводность, мкС/см	Минерализация, мг/л
0,2	17,4	7,98	130	79
0,5-1	25	8,4	423	257
1,5-2	36	8,75	962	1205
2,5-3	>40	8,83	-	-

Примечание: (-) - определение не проводилось.

В табл. 2 обобщены результаты определения количества микроорганизмов из образцов почв с участка термальной и геохимической аномалии Дилижана.

Таблица 2. Количество микроорганизмов, выделенных из разных глубин образцов почвы с участка термальной и геохимической аномалии Дилижана

Глубина почвы, м	Число образцов	Споровые и неспоровые бактерии, млн/г	Микромицеты, тыс/г	Мезофильные бациллы, млн/г	Экстремофильные бациллы, тыс/г			
					Т	А	Г	Т-Г
0,2	4	24	260	14	1,4	0	0	0
0,5-1	3	56	180	27	1	0,2	0,2	0
1,5-2	3	19,6	90	10	0,8	0,4	0	0,2
2,5-3	1	10,2	80	7	0,4	0	0	0

Условные обозначения: Т-термофилы, А-алкалофилы, Г-галофилы, Т-Г-термогалофилы.

Как видно из таблицы, на глубине 0,2 м общее число спороносных и неспороносных бактерий доходит до 24 млн/г почвы, из них мезофильные бациллы составляют 14 млн/г почвы, число термофильных бацилл - до 1,4 тыс/г. Других форм экстремофильных бацилл не обнаружено.

На глубине 0,5 - 1 м общее число аэробных спороносных и неспоровых бактерий доходит до 56 млн/г почвы. Помимо мезофильных бацилл (27 тыс/г почвы), почва на этих глубинах заселена также экстремофильными штаммами: термофилами - 0,8 тыс/г, алкалофилами - 0,4 тыс/г и галофилами - 0,2 тыс/г почвы. Аналогичная картина наблюдается на глубинах 1,5 - 2 м, где количество мезофильных бацилл достигает до 10 млн/г, термофильных - 0,8 тыс/г, алкалофильных - 0,4 тыс/г, термогалофильных - 0,2 тыс/г почвы. По всей вероятности, на этих глубинах почва обладает сравнительно высокой биологической активностью (что подтверждается физико-химическими показателями - см. табл. 1), чем и обусловлено разнообразие экстремофильных форм бацилл. С другой стороны, численность аэробных микроорганизмов по мере увеличения глубины уменьшается и на глубинах

2,5 – 3 м доходит до 10,2 млн/г почвы. Наряду с немногочисленными мезофильными (7 млн/г почвы), встречаются и термофильные бациллы (0,4 тыс/г почвы). Следует ожидать, что на этих глубинах начинают превалировать анаэробные микроорганизмы, что косвенно подтверждается интенсивным выделением метана с поверхности обследуемого участка (годовой отчет НИ компании “Геориск”).

Среди почвенных микроорганизмов количество микромицетов доходит до 260 тыс/г на глубине 0,2 м, 180 тыс/г - 0,5 – 1 м, 90 тыс/г - 1,5-2 м и 80 тыс/г - 2,5-3 м. Сравнительно небольшое количество микромицетов и его снижение по мере углубления можно объяснить воздействием совокупности факторов (недостаточная аэрация, высокое значение рН среды, высокая температура).

Таким образом, в результате проведенных работ из обследованных почвенных образцов участка термальной и геохимической аномалии Дилижана выделены и морфологически охарактеризованы культуры экстремофильных форм бацилл, в том числе термофилов - 19 штаммов, алкалофилов - 3 штамма, галофилов - 1 штамм и термогалофилов - 1 штамм.

Согласно литературным данным, экстремофильные формы бацилл являются активными продуцентами амилаз, ЦГТ-аз, β -галактозидаз, протеаз, липаз [1, 6]. Нами были проверены некоторые ферментативные активности выделенных экстремофильных форм бацилл. Результаты изучения представлены в табл. 3.

Среди изученных нами культур наиболее ярко выраженной амилолитической активностью обладают термофилы (9 штаммов), β -галактозидазной активностью - термофильные (3 штамма) и алкалофильные штаммы (3 штамма). Особенно сильно проявляется ЦГТ-азная активность. Почти все культуры являются продуцентами α -, β - и γ -ЦД, что соответствует литературным данным [1]. Способностью синтезировать активные протеазы обладают 11 штаммов термофилов, алкалофилов и галофилов.

В литературе имеются и данные, свидетельствующие о наличии целлюлолитической, пектинолитической и инулиназной активностей у экстремофильных форм микромицетов, однако данные об этом ограничены [6, 10]. Среди изученных штаммов активными продуцентами целлюлаз являются 1 термофильный и 2 алкалофильных штамма, пектиназ - 1 алкалофильный и инулиназ - 3 термофильных и 1 алкалофильный.

Выделенные штаммы экстремофильных форм бацилл из почвенных образцов с участка термальной и геохимической аномалии Дилижана включены в коллекцию культур микроорганизмов кафедры микробиологии и биотехнологии ЕГУ и научно-исследовательской компании “Геориск”. Они послужат объектом дальнейших исследований с целью их идентификации и изучения возможностей использования в биотехнологических производствах.

Таблица 3. Характеристика ферментативных активностей выделенных экстремофильных форм бактерий

N культур	Ферментативные активности												
	Амилолитическая	ЦГГазная (наличие ЦД)	Целлюлолитическая	Пектинолитическая	Инулиназная	Протеолитическая			Липолитическая				
						Казеинолитическая	Желатиная	β -галактозидазная	Маргарин	Сливочное масло	Пальмовое масло	Оливковое масло	Подсолнечное масло
T-1	+	$\alpha/\beta/\gamma$	-	-	-	+	-	-	++	+	-	-	-
T-2	+++	α/β	-	-	-	+	+	-	-	+	-	++	-
T-2'	++	α	-	-	-	++	++	-	-	+	-	+	-
T-3	+	α/β	-	-	-	-	-	-	+	++	-	-	+
T-3'	+++	α/β	++	++	++	++	+++	-	-	++	+	+	+
T-4	++	α/β	++	++	+++	+	-	-	-	+	-	+	++
T-5	++	α	++	++	-	+	-	-	++	-	-	++	-
T-6	+	α/β	++	++	+	++	+++	-	-	++	+	+	-
T-7	+++	$\alpha/\beta/\gamma$	+	-	+	+++	+++	+	+	+	++	+	+
T-7'	+++	$\alpha/\beta/\gamma$	+	-	+++	+++	++	+	+	+	++	+	+
T-8	++	$\alpha/\beta/\gamma$	+++	-	++	++	+++	+++	-	-	++	++	+
T-9	+	$\alpha/\beta/\gamma$	+	-	+++	+	-	+	++	-	-	+	+
T-10	+++	$\alpha/\beta/\gamma$	-	-	+	+++	+++	+	-	-	+++	+	-
T-11	+++	$\alpha/\beta/\gamma$	-	-	++	++	+	+	-	+	+++	++	-
T-12	+	$\alpha/\beta/\gamma$	-	-	+	+	-	-	-	++	-	+++	-
T-13	+++	$\alpha/\beta/\gamma$	-	-	+	+++	+++	+	+	-	+++	++	++
T-14	++	$\alpha/\beta/\gamma$	-	-	+	+++	++	++	+++	+	++	+++	++
T-15	+	α/β	++	-	-	+++	+++	++	-	-	++	+	-
T-16	+++	α/β	-	++	-	+	-	+	-	++	-	-	+++
T-17	++	α/β	++	-	+	+++	-	-	+	-	+++	++	+++
T-18	+++	α/β	++	-	+	+	+	+	++	-	+++	+	-
T-19	+	α/β	++	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-
A-20	++	α/β	+	++	++	++	+++	+	+++	+++	-	++	+
A-21	++	α/β	+++	++	+++	+++	+++	+	+++	+++	+	+++	+
A-22	++	α/β	+++	+++	++	++	+++	+	+++	++	+++	++	-
T-Г-23	++	α/β	+	++	+	++	+	-	+++	+++	-	+	+++
Г-24	++	α/β	+	++	++	+	-	-	++	+	-	-	-

Условные обозначения: Т-термофилы, А-алкалофилы, Г-галофилы, Т-Г-термогаллофилы. (-) - отсутствие роста, (+) - слабый рост, (++) - средний рост, (+++) - сильный рост.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Абелян В.А., Авакян З.Г., Мелкумян А.Г., Балаян А.М., Узунян Л.В., Гаспарян А.В.* Биохимия, 57, 3, 430-437, 1992.
2. *Африкян Э.Г.* Тр. сектора микробиол. АН Арм ССР, 21-35, 1953.
3. *Вайтенлавичус А.И.* Лабораторное дело, 10, 626-627, 1977.
4. *Кашнер Д.* Жизнь микробов в экстремальных условиях. 519, М., Мир, 1981.
5. *Кестнер А.И., Вокк Р.А., Паппель К.Э., Пейпман Э.М.* Прикл. биохимия и микробиология, 25, 3, 425-430, 1989.
6. *Логинова Л.Г., Головчева Р.С., Егорова Л.А.* Жизнь микроорганизмов при высоких температурах. 240, М., Наука, 1966.
7. *Хачатурян А.А., Казанчян Н.Л., Хачатурян Н.С., Адамян М.О., Хачикян Л.А.* Биолог. журн. Армении, 48, 1, 12-18, 1995.
8. *Эдилян Р.А., Петросян Г.П., Розова Н.Н.* Почвы Армянской ССР (Краткая характеристика). 383, Ереван, Айастан, 1976.
9. *Djrbashian R., Karakhanian A., Philip H., Tozalakyan P., Arakelian S. and Abgarian Y.* In: The Resolution of Geological Analyses and Models for earthquake faulting studies. Comerino, 41-42, 1998.
10. *Horikoshi K., Akiba T.* Alkalophilic microorganisms - a new microbial world. Tokyo, Berlin, Heidelberg, New York. Springer-Verlag, 213, 1982.
11. *Karakhanian A., Tozalakyan P., Grillot J.-C., Philip H., Melkonyan D., Paronyan R., Arakelyan S.* Environmental Geology, 40 (3), 279-288, 2001.
12. *Larsen H.* In: The procarriots, 1, 985-994, 1981.
13. *Tilden E.B., Hudson C.S. J.* Bacteriol., 43, 2, 527-544, 1942.

Поступила 02.XII.2001