

ИЗУЧЕНИЕ РАСПРОСТРАНЕНИЯ ПОЧВЕННЫХ БАКТЕРИЙ В 20 КМ ЗОНЕ АРМЯНСКОЙ АТОМНОЙ ЭЛЕКТРОСТАНЦИИ (ААЭС)

О. А. ПАНОСЯН

Кандидат биолог. наук, доцент

Л. А. БОЗОЯН

Магистр ЕГУ

А. А. МАРГАРЯН

Научный сотрудник ЕГУ

Кафедра микробиологии, биотехнологии микроорганизмов и растений

Ереванского государственного университета,

*Кафедра биологии и экологии Гаварского государственного
университета*

Вследствие развития атомных технологий, в частности, работы атомных электростанций, все более актуальной становится проблема биологического влияния ионизирующих излучений. Даже при нормальной эксплуатации атомных электростанций их радиоактивные отходы создают некоторую дозовую нагрузку на окружающую среду. В таких условиях, помимо выживаемости организмов, большое значение имеет и жизнеспособность потомства, т.е. существование популяции в пространстве и во времени [3, 6].

Репродуктивная функция организмов относится к числу наиболее радиочувствительных [2, 6]. Благодаря высокой скорости размножения в почве бактерии представляются удобной моделью для оценки экологических последствий дозовой нагрузки на биоту [3, 6].

Изыскание и изучение новых радиорезистентных микробных сообществ является одной из актуальных задач экологической микробиологии и биотехнологии, что обусловлено, с одной стороны, необходимостью выявления механизмов адаптации клеток к жизни в экстремальных условиях, а с другой - их большим биотехнологическим потенциалом в процессах очистки и утилизации радиоактивных отходов [3, 4, 10].

Целью настоящей работы было изучение количественного и качественного состава некоторых физиологических групп культивируемых почвенных микроорганизмов в 20 км зоне ААЭС и возможных механизмов, обеспечивающих их радиорезистентность.

Материалы и методы. Объектами изучения послужили образцы необрабатываемых и неорошаемых, преимущественно бурых полупустынных почв, отобранных в осенний период с территорий, разнородных от ААЭС, с учетом розы ветров (рис. 1). Контрольные пробы (аналогичный тип почвы) брались из участков, расположенных на расстоянии 45-50 км

от ААЭС. Для проведения исследований был выбран верхний слой почвы толщиной 0-5 см, соответствующий горизонту подстилок, дающий максимальную информацию о микробном сообществе почвы.

Выделение различных групп почвенных бактерий проводили методом накопительных культур и прямой инокуляции разведения навески образцов на соответствующие питательные среды. Для получения накопительных культур бацилл разведенные водные смеси почв пастеризовали в течение 10 мин при 800С в водяной бане. Численность бактерий в исследуемых образцах почвы определяли высевом на плотные среды, используя чашечный метод Коха [5,7]. Результаты количественного определения микроорганизмов выражали в условных колониеобразующих единицах (КОЕ).

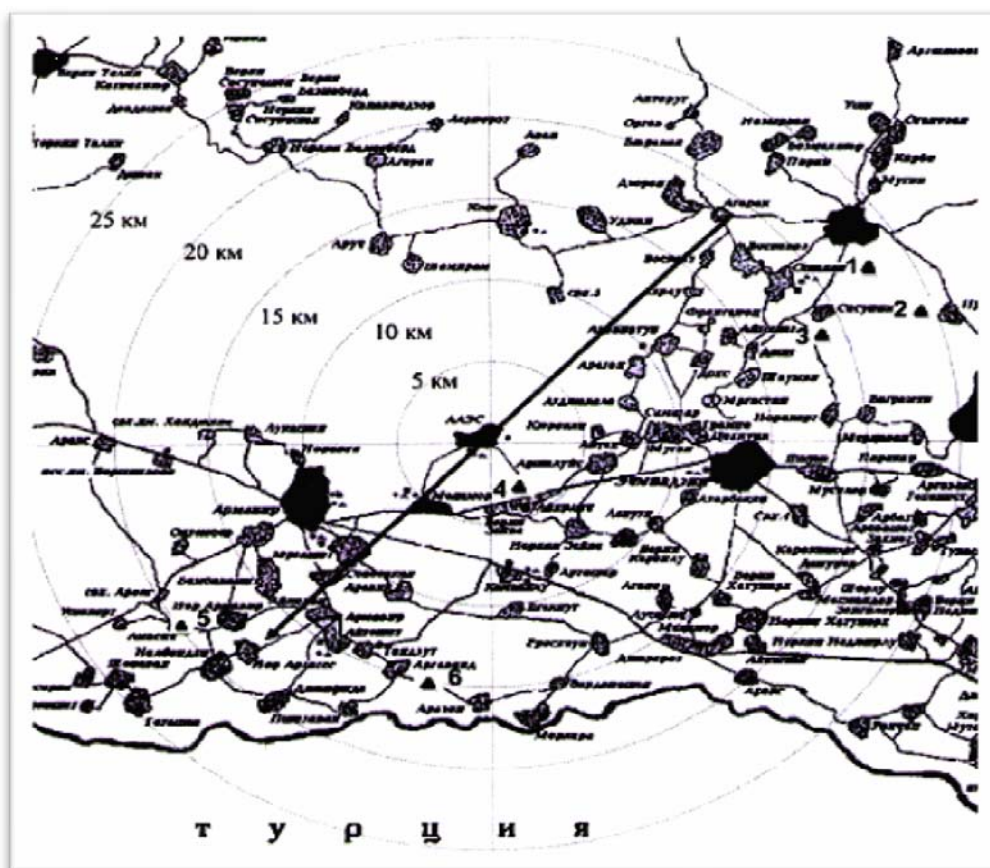


Рисунок 1. Карта-схема районов взятия проб, обозначенных цифрами в 20-км зоне ААЭС (стрелка показывает розу ветров).

Аэробные хемоорганотрофные бактерии выращивали на мясопептонном агаре (МПА), азотфиксирующие бактерии - на агаризованной среде Эшби, а целлюлозоразрушающие - на агаризованной среде Гетчинсона [5,7].

Изучение культуральных, морфологических, физиологических и биохимических особенностей культур осуществлялось методами, приведенными в [6]. Систематическое положение (родовую и/или видовую принадлежность) изолированных культур определяли по руководству Берге [8].

Для изучения выживаемости некоторых изолированных культур из разных физиологических групп бактерий к действию перекиси водорода (H_2O_2) в бактериальную суспензию (10^9 - 10^{10} кл/мл) добавляли раствор H_2O_2 до конечной концентрации 0.1М, 0.3М и 1.0М и инкубировали ее при комнатной температуре от 15 мин до нескольких часов. Через различные промежутки времени (0, 15, 30, 60 мин) пробу немедленно разводили до 10^{-3} - 10^{-7} . По 0.1 мл разведенной пробы высевали на чашки, содержащие соответствующие агаризованные среды и инкубировали при 37°C. Через двое суток подсчитывали количество колоний. В контрольных бактериальных суспензиях (до экспозиции с H_2O_2) определяли количество жизнеспособных клеток путем посева таких же разведений.

Результаты и обсуждение. Исследовались определенные физиологические группы почвенных бактерий в 20-км зоне ААЭС: аэробные хемоорганотрофные, целлюлозоразрушающие и азотфиксирующие бактерии. В таблице 1 представлены результаты определения численности исследованных групп бактерий в почвах, отобранных как с подветренной, так и надветренной сторон (осень 2007 г.).

Как видно из таблицы 1, численность целлюлозоразрушающих, азотфиксирующих и растущих на МПА аэробных хемоорганотрофных микроорганизмов в образцах из различных точек мониторинга, как с надветренной, так и с подветренной сторон, практически не отличалось от численности микроорганизмов контрольных участков.

В районе с. Ошакан общая численность бактерий несколько занижена по сравнению с остальными точками мониторинга, что подтверждается данными, полученными сотрудниками лаборатории ААЭС. Предполагается, что это обусловлено большим содержанием ^{137}Cs в этом районе как основного радионуклида. В силу достаточной удаленности с. Ошакан от АЭС (17 км) и расположением его относительно розы ветров очевидно, что большое содержание ^{137}Cs связано с какими-то другими факторами, а не действием самой АЭС [1].

Таблица 1

Численность некоторых физиологических групп бактерий в почвах 20-км зоны ААЭС и контрольных почвах (КОЕх10⁶/на 1 г почвы)

Район взятия пробы	Аэробные хемоорганотрофные бактерии, n=7	Спорообразующие бактерии, n=6	Азотфиксирующие бактерии, n=2	Целлюлозо-разрушающие бактерии, n=2
Подветренная сторона				
1 (Ошакан) *	0,15	0,64	3,0	5
2 (Сасуник)	2,5	16	4,8	5,2
3 (Айгешат)	6,85	53,5	3,8	2,3
4 (Мецамор 1) **	3,3	24	-	-
4 (Мецамор 2) **	5,6	42	-	-
Надветренная сторона				
4 (Мецамор) **	2,0	16	2	1,1
5 (Нор-Армавир)	3,5	25	1,3	1
6 (Аргаванд)	3,0	23,8	3,0	1,3
Контроль	2,14	16,9	2,6	1,2

* Район взятия проб (см. Рис. 1), ** Пробы были взяты из разных территорий Мецамор, как подветренной, так и надветренной стороны.

Основная группа аэробных хемоорганотрофов представлена спорообразующими бактериями рода *Bacillus* (70%). На основании изучения культуральных, морфологических, физиологических и биохимических особенностей спорообразующие бактерии были идентифицированы, в основном, как *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, *B. cereus* и *B. circulans*. Доминирование бацилл можно объяснить их большим метаболическим потенциалом, благодаря чему эта группа микроорганизмов осуществляет основные деструктивные процессы в почвах, является главным компонентом сапротрофного бактериального комплекса. Формированию такого моноспецифического ценоза возможно способствовало развитие бациллами эффективных механизмов защиты от длительного воздействия излучения. Это подтверждается известным законом, согласно которому чем экстремальнее физикохимические характеристики среды, тем меньше разнообразие видов, однако выше численность особей, относящихся к одному и тому же виду.

Радиорезистентные микроорганизмы развивают эффективные

механизмы, обеспечивающие их выживаемость в природных экосистемах с повышенным уровнем радиации [2, 3]. Известно, что ионизирующее излучение действует на организмы посредством продуктов радиолиза молекул воды, которые представлены свободными радикалами, активными формами кислорода и токсичными перекисными соединениями. Действие перекиси водорода в известной степени имитирует действие ионизирующего излучения. Одним из механизмов, обеспечивающих выживаемость бактерий (помимо механизмов репарации повреждений ДНК), является их высокая каталазная активность, хотя не исключаются и другие эффективные механизмы нейтрализации активных форм кислорода [2, 6, 9].

Предполагается, что бактерии, находясь под длительным воздействием ядерной радиации, приобрели устойчивость к H_2O_2 . В связи с этим было исследовано влияние H_2O_2 на выживаемость представителей разных физиологических групп бактерий. Сравнительное изучение выживаемости изолированных разных хемоорганотрофных бактерий после экспозиции до одного часа с 1,0 М H_2O_2 при комнатной температуре показало, что наиболее устойчивыми являются бактерии. Представители других групп характеризовались высокой чувствительностью к действию 1,0 М H_2O_2 .

Так как в выделенных нами физиологических группах бактерий доминировали бактерии, выживаемость бактерий после экспозиции от 15 мин. до нескольких часов с различными концентрациями H_2O_2 (0.1 М, 0.3 М, 1.0 М) более детально была изучена именно на их примере. Некоторые штаммы, изолированные из 10 км зоны ААЭС, имели высокий уровень устойчивости к H_2O_2 , что, возможно, связано с радиостимуляцией, а некоторые – тот же уровень, как и штаммы, изолированные из контрольных почв.

Таблица 2

Выживаемость клеточной культуры штамма *B. cereus* (% от числа жизнеспособных клеток) в зависимости от времени при экспозиции с разными концентрациями перекиси водорода

Время экспозиции (минута)	Контроль	Концентрация H_2O_2		
		0,1М	0,3М	1М
15	100	69	43	37
30	100	68	57	28.5
60	100	86	58	37

Из таблицы 2 видно, что оптическая плотность клеточной культуры одного из штаммов (*B. cereus*) при воздействии растворов перекиси раз-

ных молярностей резко уменьшается по сравнению с контролем. Это проявляется особенно ярко при 1М H_2O_2 . Численность жизнеспособных бактерий после экспозиции с растворами разных молярностей H_2O_2 определялась и методом посева на соответствующие питательные среды. Выживаемость бактериальных клеток резко уменьшается после экспозиции (60 мин) с 1М H_2O_2 и составляет 37%, а после экспозиции растворами 0,1М и 0,3М жизнеспособность сохраняли приблизительно 60-80% клеток.

В целом можно предположить, что дозовая нагрузка отражается на более тонких регулирующих системах клетки, в результате чего преимущество для выживания получили бактерии, обладающие эффективными системами нейтрализации перекисных соединений.

В нашей работе мы изучали определенный круг почвенных культивируемых бактерий. Однако для выявления полного физиологического и таксономического спектра почвенных бактерий, в том числе и некультивируемых микроорганизмов, необходимо детальное изучение микробного ценоза как целостной системы, с использованием молекулярно-биологических методов, что и планируется на следующих этапах наших исследований.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Аракелян В. Б., Пюскюян К. И., Авакян Ц. М., Варданян Р. А., Симонян Н. В., Хачатрян Г. Э., Мкртчян Н. И. Влияние ^{137}Cs на почвенные бактерии в районе размещения Армянской АЭС. // Тезисы 3-Сисякянские чтения при поддержке Венецианского офиса ЮНЕСКО, Ереван-Аштарак, 2004.
2. Виленчик М. М. Нестабильность ДНК и отдаленные последствия воздействия излучений. М.: Энергоатомиздат, 1987, 192 с.
3. Жизнь микробов в экстремальных условиях. Под ред. Д. Кашнера М., Мир, 1981, 519 с.
4. Назина Т. Н., Косарева И. М., Давыдов А. С., Турова Т. П., Новикова Е. В., Хафизов Р. Р., Полтараус. Физико-химическая и микробиологическая характеристика подземных вод из наблюдательных скважин глубинного хранилища жидких радиоактивных отходов. Микробиология, 2000, Т. 69, N 1, с. 105-112.
5. Нетрусов А. И., Егорова М. А. Захарчук Л. М. и др. Практикум по микробиологии. М.: Академия, 2005, с. 608.
6. Романовская В. А., Соколов И. Г., Рокитко П. В., Черная Н. А. Экологические последствия радиоактивного загрязнения для почвенных бактерий в 10-км зоне ЧАЭС // Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины. Киев, 1998.
7. Смайберт Р., Криг Н. Методы общей бактериологии. Под ред. Ф. Герхарда и др. М.: Мир, 1984, т. 3. гл. 20, с. 8-97.
8. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology / Sneath P.H.A., Editor; Mair N.S., Sharpe M.E., Holt J.G., associate editors. – 2. Edition. – Baltimore-Hong-Kong-London-Sydney: Williams & Willkins, 1986, Vol. 2, p. 1104-1139.
9. Riley P. A. Free radicals in biology: oxidative stress and the effect of ionizing radiation // Int. J. Radial. Biol. 1994, V. 65, N 1, p. 27-33.
10. West J. M., McKinley I. G., Chapman N. A. Microbes in deep geological systems and their pos-

sible influence on radioactive waste disposal // Rad. Waste Management Nuclear Fuel Cycle. 1982, V.3, p. 1-15.

**ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ԱՏՈՄԱՅԻՆ ԷԼԵԿՏՐԱԿԱՅԱՆԻ 20 ԿՄ ՇԱՌԱՎՐՈՎ ՏԱՐԱԾՔԻ ՀՈՂԱՅԻՆ
ՄԱՆՐԷՆԵՐԻ ՏԱՐԱԾՎԱԾՈՒԹՅԱՆ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ**

**Հ. Հ. ՓԱՆՈՍՅԱՆ
Լ. Ա. ԲՈԶՈՅԱՆ
Ա. Ա. ՄԱՐԳԱՐՅԱՆ**

Հողվածում ներկայացված են Հայաստանի ատոմային էլեկտրակայանի 20կմ շառավղով տարածքի աերոբ քենոօրգանոտրոֆ, ցելյուլոզ քայքայող, ազոտֆիքսող հողային մանրէների տարածվածության ուսումնասիրության արդյունքները: Հիմնավորվել է, որ զերակշռում են աերոբ քենոօրգանոտրոֆները՝ ներկայացված հիմնականում *Bacillus* ցեղի տեսակներով, որոնք օժտված են պերօքսիդային միացությունների չեզոքացման արդյունավետ համակարգերով:

**STUDY OF DISTRIBUTION OF SOIL BACTERIA IN THE 20-KM ZONE AROUND THE
ARMENIAN NUCLEAR POWER PLANT**

***H. H. PANOSYAN,
L. A. BOZOYAN,
A. A. MARGARYAN***

The diversity of aerobic chemoorganotrophic (capable of growing on nutrient agar), cellulose erosive, nitrifying soil bacteria sampled in the 20-km zone around Armenian Nuclear Power Plant was studied. It was shown that dominant group of studied bacteria was aerobic chemoorganotrophics mainly representatives of the genus *Bacillus* due to the functioning of efficient mechanisms of peroxide compounds' neutralization.