

Биология

УДК 576.8:579.852.2

Օ. Ա. ՓԱՆՕՅԱՆ, Ա. Ա. ՄԱՐԳԱՐՅԱՆ

НОВЫЕ ШТАММЫ МЕТАЛЛОУСТОЙЧИВЫХ ТЕРМОФИЛЬНЫХ
БАЦИЛЛ

Выделены и изучены металлоустойчивые термофильные бациллы из иловых образцов, отобранных из Ереванского водохранилища и термального минерального источника Анкавана. Показана устойчивость выделенных культур при наличии в среде по 1 мг/л ионов Cu^{++} , Zn^{++} , Cd^{++} и Ni^{++} . На основании комплекса морфокультуральных и физиолого-биохимических свойств установлена видовая принадлежность изолятов.

Исследование экстремофильных микроорганизмов является одной из важных задач современной экологической микробиологии [1–4]. Это обусловлено, с одной стороны, необходимостью выявления механизмов адаптации клеток к жизни в экстремальных условиях, а с другой – большим биотехнологическим потенциалом таких микроорганизмов [5, 6]. Уникальные метаболические особенности термофильных микроорганизмов, которые приспособились выживать при наличии ионов тяжелых металлов, создают возможность их использования для биоремедиации загрязненных почв и грунтов, в биогеотехнологии металлов, получении биосорбентов и биodeградации ксенобиотиков [3–7].

Целью представленной работы является выделение и изучение ряда металлоустойчивых термофильных бактерий.

Материалы и методы. Источниками термофильных бацилл служили образцы воды и ила со дна Ереванского водохранилища и из наземного термального минерального источника Анкавана. Для выделения термофильных бацилл вначале были получены накопительные культуры. Инкубация проводилась на качалке в конических колбах с питательной средой следующего состава: пептон – 0,5%; дрожжевой экстракт – 0,5%; глюкоза – 1% ; Cu^{++} , Zn^{++} , Cd^{++} и Ni^{++} – 1 мг/л. Чистые культуры получались рассевом накопительных культур на твердые среды. Проверка чистоты выделенных культур осуществлялась методом микроскопического контроля [8].

Изучение культуральных, морфологических, физиологических и биохимических особенностей культур осуществлялось методами, приведенными в [8–10]. Для выяснения систематического положения выделенных бактерий

использовался определитель Берджи [11], при этом учитывались характеристики этих бактерий в [10].

Результаты и обсуждения. Из разных образцов ила были изолированы 8 термофильных культур металлоустойчивых бацилл: 1А, 1В, 1С, 2А, 2В, 3, Met1, Met5.

Культуры образовывали в основном округлые, гладкие, влажные, однородные, плоские колонии с ровными краями и диаметром 3–5 мм. Штамм 1А образовывал желтые колонии, штаммы 1В, 1С, 2А и Met5 – слизистые колонии. Все культуры были представлены подвижными спорообразующими прямыми палочками, окрашивающимися по Граму положительно. Их споры имели овальную или эллипсоидальную форму с центральным или субтерминальным расположением.

Изучены также некоторые физиологические особенности выделенных бацилл. Среди изолятов встречались аэробные формы (штаммы 1А, 1С и Met5), а остальные были факультативными анаэробами.

Штаммы отличались способностью к росту на средах с различными концентрациями NaCl, интервалами pH и температурами (рис. 1, 2 и 3).

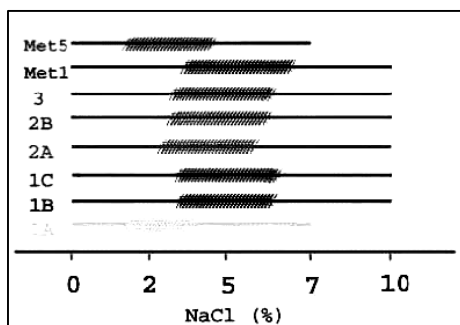


Рис. 1. Рост культур при разных концентрациях NaCl.

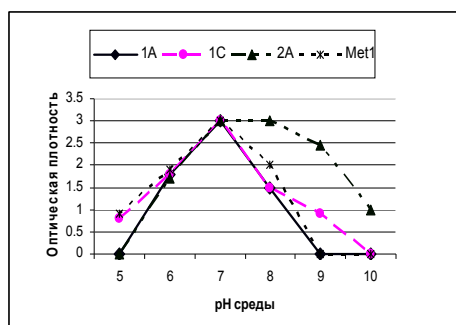
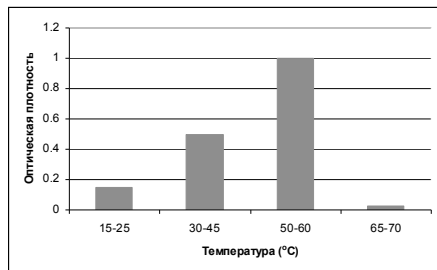


Рис. 2. Рост культур при разных значениях pH среды.

Для штаммов 1А и Met5 оптимальная концентрация NaCl лежит в пределах 2,5–3,5%, а для штаммов 1В, 1С, 2А, 2В, 3 и Met1 – 5–6%. Однако последние выдерживали NaCl с концентрацией около 10%, что подтверждается литературными данными о связи галофильности и термотолерантности [12].



Для штаммов 1А, 1В, 1С, Met1 и Met5 оптимальной для роста была pH 7, а для штаммов 2А, 2В и 3 – pH 7,5–8, причем последние продолжали слабо расти и при pH 10. На рис. 2 приведены зависимости роста культур от pH для штаммов 1А, 1С, 2А и Met 1.

На рис. 3 приведена диаграмма зависимости роста культуры от температуры на примере штамма 1А, так как для всех культур она почти одинакова. Как видно из рис. 3, выделенные бациллы являются факультативными термофилами с оптимумом температурного роста 50–55°C.

Сочетание высокой температуры с высокой рН дестабилизирует белки [12]. Видимо поэтому сочетание термофиллии и алкалофиллии встречается очень редко.

Для идентификации выделенных микроорганизмов изучались их биохимические свойства. Эта часть работы важна еще и потому, что термофильные бациллы могут служить ценными источниками стабильных ферментов и соответствующих им генов. Результаты изучения гидролитических активностей изолятов по показателям роста на соответствующих субстратах представлены на рис. 4. Гидролиз крахмала обнаруживали после обработки агаровой пластинки раствором Люголя. На наличие амилолитической и протеолитической активности указывало образование прозрачных зон вокруг штриха, а липолитической активности – образование непрозрачной зоны кальциевых солей жирных кислот.

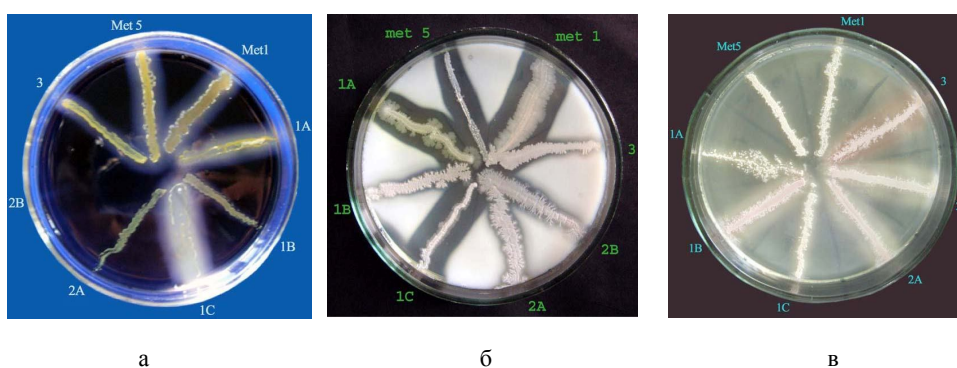


Рис. 4. Гидролиз субстратов: а) крахмала; б) казеина; в) твина

Среди изученных нами культур наиболее активными по амилазе являлись штаммы 1А, 1С, Met1 и Met5. Эти же штаммы обладали и протеолитической активностью, но в различной степени. Все культуры обладали также липолитической активностью, особенно ярко выраженной у штаммов 1В, 2А, 2В и 3.

Все изоляты являлись хемоорганотрофными, каталазо-положительными бактериями, которые не образовывали газ на среде с глюкозой, нитрат до нитрита не восстанавливали, в качестве источника углерода пропионат не усваивали, ассимилировали D-глюкозу с образованием кислоты. Изоляты 1В, 3, Met1 и Met5 не образовывали ацетилметилкарбинол.

На основании морфокультуральных, физиологических и биохимических свойств были идентифицированы изолированные термофильные бациллы. Полученные данные позволяют отнести исследуемые штаммы к следующим видам: *Bacillus subtilis* (1А, 1С, Met1, Met5), *B. megaterium* (1В), *B. brevis* (2В), *B. circulans* (3). Фенотипические анализы не позволяют окончательно идентифицировать штамм 2А. С целью уточнения таксономического статуса изолятов предполагается провести анализ 16S рРНК и определение жирнокислотного состава их мембран.

Штаммы включены в коллекцию культур микроорганизмов кафедры микробиологии, биотехнологии микроорганизмов и растений ЕГУ. Они послужат объектами дальнейших исследований с целью изучения возможнос-

тей их использования для биосорбции металлов из растворов и применения в биогеотехнологических и природоохранных производствах.

Кафедра микробиологии, биотехнологии микроорганизмов и растений

Поступила 01.10.2007

ЛИТЕРАТУРА

1. **Кашнер Д.** Жизнь микробов в экстремальных условиях. М.: Мир, 1981, с. 519.
2. **Varnam A.H., Evans M.G.** Environmental Microbiology. London: Manson Publishing Ltd., 2000, p. 160.
3. Экология микроорганизмов. Под ред. А.Н. Петрусова. М.: Академия, 2004, 272 с.
4. **Rothschild L.J., Mancinelli R.L.** – Nature, 2001, v. 409, p. 1092–1101.
5. **Niehaus F., Bertoldo C., Kahler M., Antranikian G.** – Appl. Microbiol. Biotechnol., 1999, v. 51, p. 711–729.
6. **Van den Burg B.** – Current Opinion in Microbiology, 2003, v. 6, p. 213–218.
7. **Riaz-ul-Haq and Shakoori A.R.** – Folia biologica (Krakow), 2000, v. 48, № 3–4, p. 143–147.
8. **Петрусов А.И., Егорова М.А., Захарчук Л.М.** и др. Практикум по микробиологии. М.: Академия, 2005, с. 608.
9. **Смайберг Р., Криг Н.** Методы общей бактериологии. Под ред. Ф. Герхардта и др. М.: Мир, 1984, т. 3, гл. 20, с. 8–97.
10. **Логинова Л.Г., Головачева Р.С., Егорова Л.А.** Жизнь микроорганизмов при высоких температурах. М.: Наука, 1966, 240 с.
11. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. V. 2. (Ed. by Mair N.S., Sharpe M.E., Holt J.G.). Baltimore: Williams & Willkins, 1986, p. 1104–1139.
12. Современная микробиология: Прокариоты. Т. 2. Под ред. Й. Ленгелера, Г. Дрекса, Г. Шлегеля. М.: Мир, 2005, 496 с.

Հ. Հ. ՓԱՆՈՍՅԱՆ, Ա. Ա. ՄԱՐԳԱՐՅԱՆ

ՄԵՏԱՂԱԿԱՅՈՒՆ ԹԵՐՄՈՖԻԼ ԲԱՑԻԼՆԵՐԻ ՆՈՐ ՇՏԱՍՆԵՐ

Ամփոփում

Երևանյան լճի և Հանքավանի տաք հանքային աղբյուրի տիղմի նմուշներից մեկուսացվել և ուսումնասիրվել են որոշ մետաղակայուն թերմոֆիլ բացիլներ: Ցույց է տրված մեկուսացված կուլտուրաների կայունությունը սննդամիջավայրում Cu^{++} , Zn^{++} , Cd^{++} և Ni^{++} իոնների 1 մգ/լ կոնցենտրացիայի առկայության պայմաններում: Ձևաբանական, կուլտուրային, ֆիզիոլոգիական և կենսաքիմիական հատկությունների հիման վրա որոշվել է մեկուսացված կուլտուրաների տեսակային պատկանելիությունը:

O. A. PANOSYAN, A. A. MARGARYAN

NEW HEAVY METAL RESISTANT THERMOPHILIC STRAINS OF BACILLI

Summary

Some heavy metal resistant thermophilic bacilli isolated from samples of silt of Lake Yerevan and thermal mineral source of Hankavan have been investigated. The stability of isolated cultures was demonstrated in the presence of 1 mg/l Cu^{++} , Zn^{++} , Cd^{++} and Ni^{++} ions in growth medium. On the basis of the complex of morphological, cultural, physiological and biochemical properties the taxonomical position of isolated cultures was established.