

Сагателян А.Р.<sup>1</sup>, Маргарян А.А.<sup>2</sup>, Паносян О.А.<sup>3</sup>, Трчунян А.А.<sup>4</sup>©

<sup>1</sup>Магистрант; <sup>2</sup>м.н.с.; <sup>3</sup>к.б.н., доц., <sup>4</sup>д.б.н., проф., чл.-корр. НАН РА  
Кафедра микробиологии и биотехнологии растений и микроорганизмов,  
Ереванский государственный университет

## ВЫДЕЛЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ *THERMUS SCOTODUCTUS* KARVACHAR-1 ИЗ ГОРЯЧЕГО ИСТОЧНИКА КАРВАЧАР

### Аннотация

Статья посвящена выделению и изучению облигатно-термофильных аспорогенных бактерий из геотермального источника Карвачар. Выделен штамм названный *Karvachar-1* и на основании фенотипических и генотипических признаков идентифицирован как *Thermus scotoductus*.

**Ключевые слова:** *Thermus scotoductus*; 16S рДНК; геотермальный источник Карвачар.

**Keywords:** *Thermus scotoductus*; 16SrDNA; Karvachar geothermal spring.

В природе термофильные аспорогенные микроорганизмы, которые растут при относительно высоких температурах представляют экологически обособленную группу [6]. Среди них представители рода *Thermus*, являющиеся активными продуцентами термозим [1], часто выделяются из наземных и морских геотермальных источников [5].

На территории Армении и Нагорного Карабаха обнаружены многочисленные наземные геотермальные источники [10], микробиота которых представляет уникальный природный резервуар для получения новых биотехнологических ресурсов. В настоящее время довольно детально изучено таксономическое разнообразие термофильных аэробных эндоспорообразующих бактерий этих геотермальных источников [2]. При этом, облигатно-термофильные аспорогенные бактерии, в том числе представители рода *Thermus* в этих источниках мало изучены.

Целью исследования являлось выделение и идентификация облигатно-термофильных аспорогенных бактерий из геотермального источника Карвачар (Нагорный Карабах).

### Материалы и методы

Для выделения термофильных бактерий источником служили образцы ила отобранные из горячего источника Карвачар (N 40°17.417', E 46°27.500', pH 7.3, T 70°C). Выделение облигатно-термофильных бактерий осуществлялось методом накопительных культур и прямого высева разведенного образца на специальную питательную среду для получения культур *Thermus* sp. [12]. Инкубация культур проводилась при 65 и 70°C. Чистую культуру выделяли путем посева на чашки Петри с той же средой, содержащей 3% агара.

Изучение некоторых морфокультуральных и физиолого-биохимических особенностей осуществляли по методам Kalab et al. и Pěčková [3; 4].

Чувствительность культуры к антибиотикам определяли с помощью готовых бумажных дисков, пропитанных определенными антибиотиками (пенициллин, ампициллин, гентамицин, эритромицин, канамицин, стрептомицин).

Идентификация выделенных культур проводилась на основании анализа гена 16S рПНК. Амплификацию гена 16S рПНК проводили универсальными бактериальными праймерами 16SF (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') и 16SR (5'-GAAAGGAGGTGATCCAGCC-3'). ПЦР продукты секвенированы в ABI PRISM капиллярном секвенаторе согласно протоколу ABI Prism BigDye Terminator Kit (Perkin Elmer). Полученная нуклеотидная последовательность была сравнена с последовательностями базы данных GenBank с применением BLAST анализа (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) [8]. Филогенетическое древо построено методом Neighbor-joining программы MEGA 6.06 [7; 13].

### Результаты и обсуждение

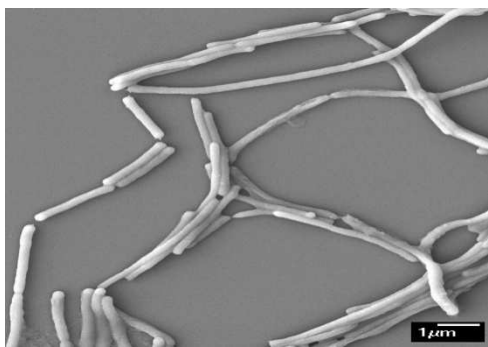


Рис. 1. Клетки *T. scotoductus* Karvachar-1 под электронным микроскопом

Из образца ила геотермального источника Карвачар (Нагорный Карабах) выделена аэробная грамотрицательная, аспорогенная, неподвижная, содержащая оксидазу и каталазу бактерия рода *Thermus*, образующая желтые колонии. Клетки изолята имеют вид длинных нитей, которые образуют филаменты (Рис. 1). Температурный диапазон роста культуры в пределах 40-80°C, с оптимумом при 65°C, а диапазон pH в пределах 6.0-10, с оптимумом при pH 7.5-8.0. Культура способна расти при высоких концентрациях NaCl (до 12%), однако оптимальная концентрация NaCl для роста составляет 2%. Выделенная культура обладает липолитической активностью, гидролизует казеин и крахмал, но не разжижает желатин. Культура резистентна к пенициллину и ампициллину, что не характерно для представителей рода *Thermus* [9].

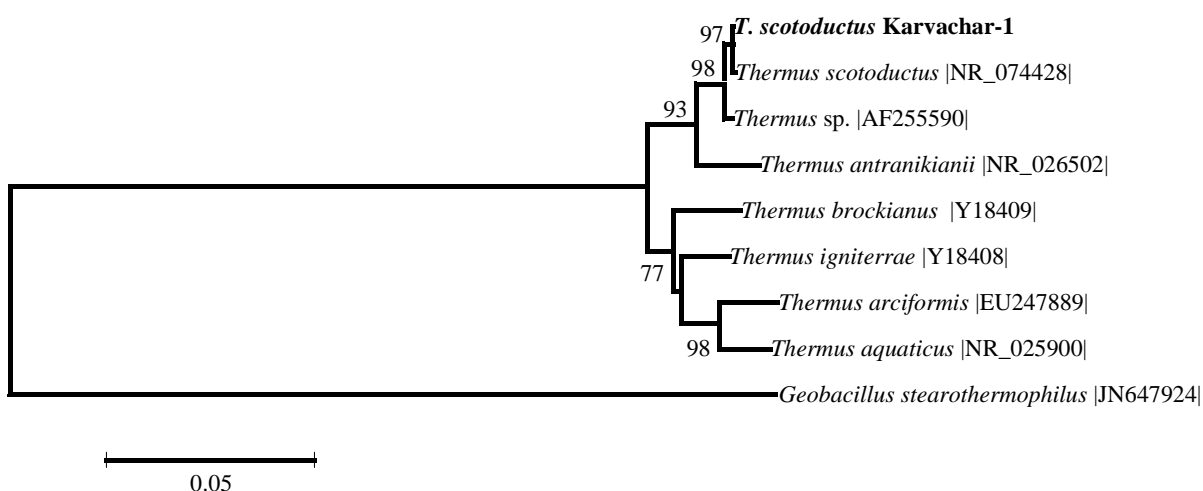


Рис. 2. Филогенетическое древо близкородственных видов штамма *T. scotoductus* Karvachar-1. Масштаб (0.05) соответствует пяти нуклеотидным заменам на каждые 100 нуклеотидов. Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления, определенная с помощью “bootstrap”-анализа 1000 альтернативных деревьев.

Сравнение последовательности 16S рДНК исследуемой культуры с последовательностями GenBank показало большое сходство (99%) со штаммом *Thermus scotoductus* SA-01 ([NR\\_074428](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NR_074428)), выделенным из грунтовых вод месторождения золота в Южной Африке. Филогенетическое древо, указывающее отношение выделенного штамма к близкородственным видам, приведено на рис. 2.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта СРЕА-2011/10081 (Collaboration in environmental microbiology between Armenia and Norway).

### Литература

1. F. Cava, A. Hidalgo, J. Berenguer – *Thermus thermophilus* as biological model // *Extremophiles*. – 2009. – 13 (2). – P.213-231.
2. Н.Н. Panosyan–Phylogenetic diversity based on 16S rRNA gene sequence analysis of aerobic thermophilic endospore-forming bacteria isolated from geothermal springs in Armenia // *Biolog. J. Armenia*. – 2010. – 62 (4). – P. 73-80.
3. M. Kalab, A.F. Yang, D. Chabot – Conventional Scanning Electron Microscopy of Bacteria // *Infocus*. – 2008. – 10. – P. 41-61.
4. M. Pěčková – Properties of a hyperthermophilic bacterium (*Thermus* sp.) isolated from a Carlsbad spring // *Folia Microbiol.* – 1991. – 36 (6). –P. 515-521.

5. M.S. da Costa, F.A. Rainey & M.F. Nobre – The genus *Thermus* and relatives // In *The Prokaryotes*, 3rd edn, Edited by M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K. H. Schleifer & E. Stackebrandt. New York: Springer. – 2006. – 7. – P. 97-812.
6. M.T. Madigan, J.M. Martino – *Brock Biology of Microorganisms* (11th ed.) // Pearson. – 2006. – P. 136.
7. N. Saitou, M. Nei – The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees // *Mol. Biol. Evol.* – 1987. – 4 (4). – P. 406-425.
8. S. Altschul, T. Madden, A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, D. Lipman – Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs // *Nucleic Acids Research.* – 1997. – 25. – P. 3389-3402.
9. S.H. Bjornsdottir, S.K. Petursdottir, G.O. Hreggvidsson, S. Skirnisdottir, S. Hjorleifsdottir, J. Arnfinnsson, J.K. Kristjansson – *Thermus islandicus* sp. nov., a mixotrophic sulfur-oxidizing bacterium isolated from the Torfajokull geothermal area // *Int J Syst. Evol. Microbiol.* – 2009. – 59. – P. 2962-2966.
10. S.S. Mkrtychyan (Ed.) – *Geology of Armenian SSR, Vol. IX* // Publishing house of AS of ASSR. Yerevan. – 1969. – P. 521.
11. T.D. Brock & H. Freeze – *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a nonsporulating extreme thermophile // *J Bacteriol.* – 1969. – 98. – P. 289-297.
12. S. Kumar, K. Tomura, M. Nei – MEGA 3: Intergrated software for Molecular Evolutionary: Genetics Analysis and sequence alignment // *Briefings in Bioinformatics.* – 2004. – 5 (2). – P. 150-163.
13. Марсагишвили Л.Г., Бобылёв А.Г. и др. Влияние фуллеренов C60 на амилоиды X-белка // *Биофизика.* 2009. Т. 54. № 2. С. 202-205.
14. Marsagishvili L.G., Bobylev A.G. et al. Effect of fullerenes C60 on X-protein amyloids. // *Biophysics.* 2009. Т. 54. № 2. С. 135-138.
15. Бобылёва Л.Г., Бобылёв А.Г. и др. Изучение амилоидных свойств гладкомышечного белка смитина. // *Технол. живых сист.* 2010. Т. 7. С. 64-68.
16. Бобылёв А.Г., Окунева А.Д. и др. Изучение цитотоксичности производных фуллерена C60. // *Биофизика.* 2012. Т. 57. № 5. С. 746-750.
17. Бобылёв А.Г., Шпагина М.Д. и др. Антиамилоидные свойства производных фуллерена C60. // *Биофизика.* 2012. Т. 57. № 3. С. 416-421.
18. Белослудцев К.Н. и др. Возможный механизм образования и регуляции пальмитат-индуцированной циклоспорин А-нечувствительной митохондриальной поры. // *Биохимия.* 2005. Т. 70. № 7. С. 987-994.
19. Белослудцева Н.В., Белослудцев К.Н. и др. Влияние холестерина на формирование в митохондриях и липосомах пальмитат/Ca2+ -активируемой поры. // *Биофизика.* 2009. Т. 54. № 3. С. 464-470.
20. Белослудцев К.Н. и др. Роль митохондриальной пальмитат/Ca2+-активируемой поры в пальмитат-индуцированном апоптозе. // *Биофизика.* 2008. Т. 53. № 6. С. 967-971.
21. Belosludtsev K.N. и др. Study of the mechanisms of cytotoxic effect of uranyl nitrate. // *Biophysics.* 2012. Т. 57. № 5. С. 607-612.
22. Асташев М.Е., Белослудцев К.Н. и др. Метод цифрового измерения фазо-частотной характеристики для ультразвукового спектрометра фиксированной длины. // *Акустический журнал.* 2014. Т. 60. № 3. С. 312.
23. Куликов А.В., Архипова Л.В., Куликов Д.А., Смирнова Г.Н., Куликова П.А. Исследование акцидентальной инволюции тимуса при образовании новых иерархических сообществ с помощью нового физического метода регистрации социального стресса. // *Биофизика.* 2013. Т. 58. № 6. С. 1065-1068.
24. Куликов А.В., Архипова Л.В., Куликов Д.А., Смирнова Г.Н., Куликова П.А. Увеличение средней и максимальной продолжительности жизни за счет трансплантации аллогенных клеток тимуса в переднюю камеру глаза животных. // *Успехи геронтологии.* 2013. Т. 26. № 4. С. 643-646.
25. Mashkov A.E., Kulikov A.V. et al. Experience of anal insufficiency treatment using medullary transplantation in experiment and clinic. // *Альманах клинической медицины.* 2011. № 25. С. 13-16.
26. Карп О.Э., Иванов В.Е., Попова Н.Р., Куликов Д.А. Образование долгоживущих радикалов белков сыворотки крови млекопитающих при воздействии лазерного излучения и тепла. // *Современные проблемы науки и образования.* 2013. № 6. С. 702.
27. Куликов А.В. и др. Акцидентальная инволюция тимуса при конфликтной стрессовой ситуации как модели социального взаимодействия. // *Военно-медицинский журнал.* 2012. Т. 333. № 1. С. 71-72.