Варданян Г.Г.[1]**, Оганесян П.А.**[2]**, Маргарян А.А.**[3]**, Паносян О.А.**[4]**, Трчунян А.А.**[5] ©
[1]Магистрант, [2]студент, [3]м.н.с., [4]к.б.н., доц., [5]д.б.н., проф., член-кор. НАН РА каф. микробиологии и биотехнологии растений и микроорганизмов,
Ереванский государственный университет

ТЕРМОФИЛЬНЫЕ БАЦИЛЛЫ, ВЫДЕЛЕННЫЕ ИЗ ГЕОТЕРМАЛЬНЫХ ИСТОЧНИКОВ АРМЕНИИ И НАГОРНОГО КАРАБАХА, КАК ПРОДУЦЕНТЫ ГИДРОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ

Аннотация

Статья посвящена выделению перспективных продуцентов термостабильных гидролитических ферментов из некоторых геотермальных источников Армении и Нагорного Карабаха. Выделены активные продуценты амилаз (14) *и липаз* (6), *принадлежащие к родам Geobacillus и Anoxybacillus.*

Ключевые слова: термозимы, термофильные бациллы, 16S рДНК.
Keywords: thermozymes, thermophilic bacilli, 16S rDNA.

В последнее десятилетие в разных отраслях промышленности широкое применение нашли ферменты термофилов – термозимы, которые проявляют высокую активность и стабильность при жестких условиях биотехнологических процессов, что и делает их более выгодными по сравнению с мезофильными аналогами [3]. Термостабильные гидролитические ферменты, такие как амилазы и липазы, являются важной группой ферментов, используемых в различных отраслях промышленности и биотехнологии [6; 9]. Термофильные бациллы являются активными продуцентами термозимов, в том числе термостабильных гидролаз [2; 3; 7; 8]. Естественными местообитаниями термофильных микроорганизмов являются наземные геотермальные источники [4]. На территории Армении и Нагорного Карабаха обнаружены многочисленные геотермальные источники, которые служат природными банками термофилов с широкими возможностями практического применения. Целью исследования являлось выделение активных бацилярных продуцентов термостабильных гидролитических ферментов из геотермальных источников Армении и Нагорного Карабаха.

Материалы и методы Для выделения термофильных бацилл источником служили образцы ила и воды, отобранные из геотермальных источников Армении (Арзакан, Джермук и Уйц) и Нагорного Карабаха (Карвачар и Зуар). При взятии обрацов *in situ* определяли температуру и pH с помощью портативного комбинировоного pH/EC/TDS тестера (HANNA; HI98129/HI98130). Для выделения бациллярных форм воду и водные смеси ила постеризовывали в течение 10 мин при 80°C. Термофильные бациллы выделяли путем получения накопительных культур, инкубируя аликвоты образцов в жидких селективных питательных средах на качалке (120 об./мин.) при 55 и 65°C. Для выделения продуцентов амилаз использовали среду следующего состава (%): крахмал 1.0, пептон 0.5, дрожжевой экстракт 0.3, NaCl 0.5, а для продуцентов липаз – пептон 1.0, NaCl 0.5, $CaCl_2 \cdot H_2O$ 0.01, Твин 40 1.0. Для получения чистых культур навески высевали на соответстующую питательную твердую среду. Гидролиз крахмала обнаруживали обработкой агаровой пластинки раствором Люголя. На нличие липазы указывало образование вокруг колонии непрозрачной зоны кальциевых солей жирных кислот [1; 5]. Изучение морфокультуральных и физиолого-биохимических особенностей осуществляли по методам, описанным Нетрусовым и др. [1].

Идентификация выделенных культур проводилась на основании анализа гена 16S рРНК. Амплификацию региона гена 16S рРНК проводили универсальными праймерами 16SF (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') и 16SR (5'-GAAAGGAGGTGATCCAGCC-3'). Ампликоны очищены набором реактивов GenElute™PCR Clean-up Kit (Sigma, USA) и секвенированы на капилярном секвенаторе ABI PRISM с использованием набора ABI Prism BigDye Terminator kit

© Варданян Г.Г., Оганесян П.А., Маргарян А.А., Паносян О.А., Трчунян А.А., 2014 г.

(Applied Biosystems, USA). Филогенетическое древо построено методом Neighbor Joining программы MEGA 6.06 [10].

Результаты и обсуждение Из образцов воды и ила выделены 14 амилаз и 6 липаз активных факультативных и облигатных термофильные бацилл (табл. 1). По диаметру образовавшейся зоны преципитации кальциевых солей вокруг колоний судили о липолитической активности культур, а по диаметру прозрачных зон около колоний культур после обработки раствором Люголя судили об амилолитической активности изолятов (рис. 1).

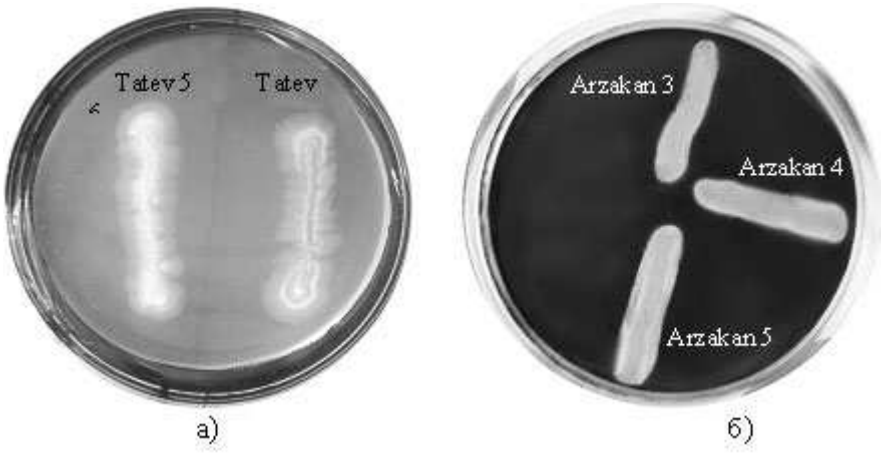

Рис. 1. **Изоляты с липолитической (а) и амилолитической (б) активностью**

Все культуры были представлены подвижными эндоспорообразующими прямыми палочками, окрашивающимися по Граму положительно. Они образовывали в основном овальные или эллипсоидальные эндоспоры имеющие центральное, терминальное или субтерминальное расположение.

Наиболее активные изоляты идентифицированы на основании анализа 16S рДНК. Генотипический анализ установил принадлежность изолятов к родам *Geobacillus* и *Anoxybacillus* (рис. 2). Таким образом, несмотря на прогресс достигнутый в биологии в последнее время [11-22] необходимы дополнительные исследования.

Таблица 1

Физико-химические параметры геотермальных источников и изоляты термофильных бацилл

Геотермальный источник, координаты и физико-химические параметры	**Изоляты с амилазной активностью (отимальная температура роста (T°C) - диаметр зоны (мм))**	**Изоляты с липазной активностью (отимальная температура роста (T°C) - диаметр зоны (мм))**
Арзакан N 40°27' 36.10″, E 44°36' 17.76″ T 44°C; pH 7.2	Arzakan 2 (65) – 9 Arzakan 3 (65) – 7 Arzakan 4 (65) – 8 Arzakan 5 (65) – 7	-
Джермук N 39°50.481′, E 45°40.068′ T 47°C; pH 7.14	Jermuk 1 (65) – 5 Jermuk 3 (65) – 7 Jermuk 4 (65) – 2 Jermuk 6 (65) – 8	Jermuk G-1 (55) – 2 Jermuk G-2 (55) –1 Jermuk G-3 (55) – 3 Jermuk G-4 (55) – 2
Татев N 39°23.765′, E 46°15.482′ T 23°C; pH 6.0	-	Tatev 5 (65) – 9 Tatev 6 (65) – 8
Карвачар N 40°17.417′, E 46°27.500′ T 70°C; pH 7.3	Karvajar 1 (55) – 7 Karvajar 3 (55) – 3 Karvajar C1 (65) – 3 Karvajar G2 (65) – 4 Karvajar E5 (65) – 4	-
Зуар N 40°02′47.64″, E 46°14′09.30″ T 52°C; pH 7.0	Zuar F1 (65) – 3 Zuar D (65) – 8	-

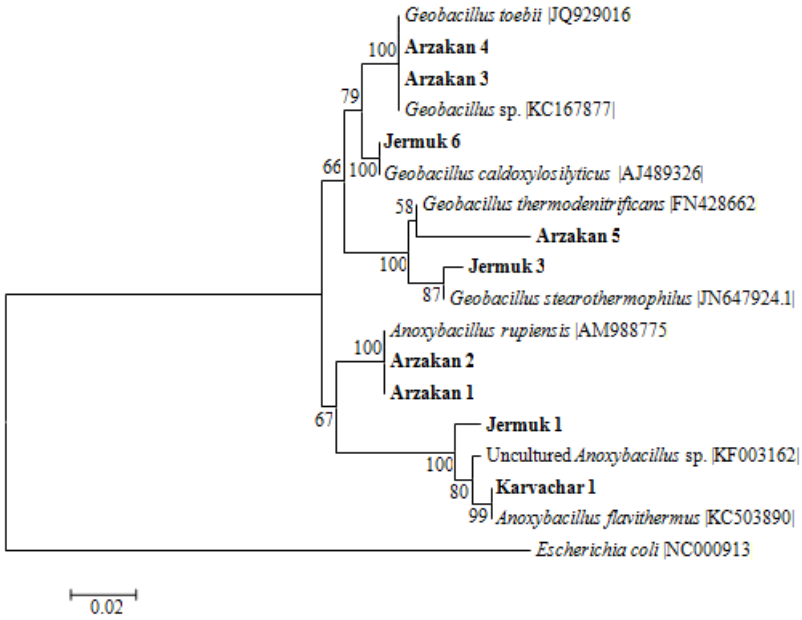

Рис. 2. **Филогенетическое древо близкородственных видов бацилл.**
Масштаб (0.02) соответствует двум нуклеотидным заменам на каждые 100 нуклеотидов. Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления, определенная с помощью "bootstrap"-анализа 1000 альтернативных деревьев.

Литература

1. А.И. Нетрусов и др. – Практикум по микробиологии // Академия. Москва. – 2005. – С. 606.
2. A. Sugihara, T. Tani – Purification and characterization of a novel thermostable lipase from Bacillus sp. // J Biochem (Tokyo). – 1991. – 109 (2). – P. 211–216.
3. G. Antranikian – Industrial relevance of thermophiles and their enzymes // In: F. Robb et al (eds) Thermophiles - biology and technology at high temperatures. – CRC Press, Boca Raton. – 2008. – P. 113–160.
4. G.D. Haki and S.K. Rakshit – Developments in industrially important thermostable enzymes: a review // Bioresour Technol. – 2003. – 89 (1). P. – 17–34.
5. H.A. Peter – Bergey's Manual of Systematic Bacteriology // In: Endospore-forming Gram-Positive Rods and Cocci. – 1986.– 2. – P. 1104-1139.
6. K.F. Jaeger and T. Eggert – Lipases for biotechnology // Current Opinions of Biotechnology. – 2002. – 13 (4). – P. 390-7.
7. L. Fakhreddine et al. – Microbial growth and lipolytic activities of moderate thermophilic bacterial strain // Biotechnol Lett. – 1998. – 20 (9). – P. 879–883.
8. R.N.Z.R.A. Rahman, T.C. Leow, A.B. Salleh, M. Basri – Geobacillus zalihae sp. nov., a thermophilic lipolytic bacterium isolated from palm oil mill effluent in Malaysia // BMC Microbiology. – 2007. – 7 (77). – P. 1-11.
9. R. Sharma, V. Thakur, M. Sharma, N.K. Birkeland – Biocatalysis through thermostable lipases: adding flavor to chemistry // Chepter 34 In: Shatyanarayana T., Littlechild J., Kawarabayasi Y. (eds), Thermophilic microbes in environmental and industrial biotechnology: Biotechnology of thermophiles. – 2013. – Springer, New York. – P. 905-927.
10. S. Kumar, K. Tomura, M. Nei – MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary: Genetics Analysis and sequence alignment // Briefings in Bioinformatics. – 2004. – 5 (2). – P. 150–163.
11. Куликов А.В., Архипова Л.В. и др. Атопически трансплантированные ткани тимуса способны дистантно изменять метаболический статус организма. // Биофизика. 2008. Т. 53. № 6. С. 1144-1148.
12. Куликов А.В., Архипова Л.В., Куликов Д.А. и др. 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.

13. Куликов А.В. и др. Увеличение средней и максимальной продолжительности жизни за счет трансплантации аллогенных клеток тимуса в переднюю камеру глаза животных. // Усп. геронтол. 2013. Т. 26. С. 643-646.
14. Куликов А.В., Катунян П.И. и др. Акцидентальная инволюция тимуса при конфликтной стрессовой ситуации как модели социального взаимодействия. // Военно-медицинский журнал. 2012. Т. 333. № 1. С. 71-72.
15. Куликов Д.А. и др. Компенсация мышечной дисфункции прямой кишки. // Биофизика. 2010. Т. 55. № 6. С. 1147-1148.
16. 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.
17. Карп О.Э. и др. Образование долгоживущих радикалов белков сыворотки крови млекопитающих при воздействии лазерного излучения и тепла. // Современные проблемы науки и образования. 2013. № 6. С. 702.
18. Марсагишвили Л.Г., Бобылёв А.Г. и др. Влияние фуллеренов С60 на амилоиды Х-белка // Биофизика. 2009. Т. 54. № 2. С. 202-205.
19. Marsagishvili L.G., Bobylev A.G. et al. Effect of fullerenes C60 on X-protein amyloids. // Biophysics. 2009. Т. 54. № 2. С. 135-138.
20. Бобылёва Л.Г. и др. Изучение амилоидных свойств гладкомышечного белка смитина. // Технологии живых систем. 2010. Т. 7. № 8. С. 64-68.
21. Бобылёв А.Г. и др. Изучение цитотоксичности производных фуллерена С60. // Биофизика. 2012. Т. 57. № 5. С. 746-750.
22. Бобылёв А.Г., Шпагина М.Д. и др. Антиамилоидные свойства производных фуллерена С60. // Биофизика. 2012. Т. 57. № 3. С. 416-421.