

*На правах рукописи*

**БАБАСАНОВА Ольга Бадмажаповна**

**АЭРОБНЫЕ ОРГАНОТРОФНЫЕ БАКТЕРИИ  
ЩЕЛОЧНЫХ ГИДРОТЕРМ БАЙКАЛЬСКОГО  
РЕГИОНА**

03.00.16 – экология  
03.00.07– микробиология

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Улан-Удэ, 2007

Работа выполнена в Институте общей и экспериментальной биологии СО РАН

Научный руководитель: кандидат биологических наук  
Бархутова Дарима Дондоковна

Научный консультант: кандидат биологических наук  
Намсараев Зоригто Баирович

Официальные оппоненты: доктор биологических наук  
Вайнштейн Михаил Борисович

кандидат биологических наук  
Гайнутдинова Елена Александровна

Ведущая организация: Институт природных ресурсов,  
экологии и криологии СО РАН

Защита состоится «15» мая 2007г. в 14 ч. на заседании  
Диссертационного совета Д 212.022.03 в Бурятском государственном  
университете по адресу: 670000, Улан-Удэ, ул. Смолина, 24а, биолого-  
географический факультет, конференц-зал  
Факс: (3012) 211593  
E-mail: babasanova@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеках БНЦ СО РАН и  
Бурятского государственного университета.

Автореферат разослан «    » апреля 2007 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат биологических наук

Н.А. Шорноева

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Щелочные гидротермы Байкальского региона являются экстремальными экосистемами, представляющими значительный интерес, как для фундаментальных исследований, так и для потенциальных практических применений. В связи с постоянством химического состава и температуры воды горячие источники являются удобными модельными системами для изучения экологии обитающих в них организмов (Brock et al., 1971; Логинова, Егорова, 1977).

Распространение аэробных органотрофных термофильных бактерий изучалось микробиологами в термальных источниках Камчатки, Центральной Азии, Индии, Южной Америки, запада США, Европы, Исландии (Wiegel, 1998; Pikuta, 2000; Spanevello, Yamamoto, 2002; Kevbrin et al., 2004; Кевбрин и др., 2005). Имеются работы по изучению ферментов аэробных термофилов, выделенных из различных высокотемпературных систем (Hawumba et al., 2002; Nascimento, Martins, 2003).

Термофильные аэробные алкалофильные и алкалотолерантные бактерии как продуценты промышленно значимых ферментов, подобно другим экстремофилам, привлекательны повышенной устойчивостью промышленных штаммов к контаминации посторонней микрофлорой, что крайне важно в производстве стандартизованного ферментного препарата (Кевбрин, 2003). Исследования по выделению, идентификации и классификации ферментов протеолитической активности в последние годы проводятся особенно интенсивно, что объясняется востребованностью и многообразием протеолитических ферментов. Внеклеточные протеазы присутствуют у различных микроорганизмов. Они играют ключевую роль в использовании микроорганизмами органических субстратов (Ward, 1985).

В настоящее время изучен видовой состав цианобактерий и аноксигенных фототрофных бактерий щелочных термальных источников и зон Байкальского региона. Проведены исследования активности продукционных и деструкционных процессов в цианобактериальных матах (Компанцева, Горленко, 1988; Юрков и др., 1991; Брянская, 2002; Намсараев, 2003). Распространение аэробных термофилов в щелочных гидротермах Байкальского региона ранее изучалось эпизодически (Храпцова и др., 1984; Намсараев, 2003; Nazina et al., 2004; Зайцева, 2004). Изучены внеклеточные протеазы разных видов аэробных термофильных микроскопических грибов, выделенных из гидротерм Прибайкалья (Лаврентьева, Дунаевский, 2003; Базаржапов, 2005). Вместе с этим к началу нашей работы практически полностью отсутствовали исследования, касающиеся внеклеточной протеолитической активности аэробных органотрофных термофильных бактерий из термальных щелочных источников Байкальского региона.

**Целью работы** являлось изучение аэробных органотрофных микроорганизмов щелочных гидротерм Байкальского региона.

**Задачи исследования:**

1. Изучить распространение аэробных органотрофных термофильных бактерий в донных осадках и микробных матах гидротерм.
2. Выделить чистые культуры аэробных органотрофных термофилов и исследовать экофизиологические и биохимические свойства.
3. Определить видовую принадлежность полученных культур с помощью молекулярно-генетических методов.
4. Исследовать внеклеточную протеолитическую активность выделенных бактерий.

**Научная новизна и практическая значимость.** С помощью микробиологических методов выявлено широкое распространение аэробных органотрофных бактерий в щелочных гидротермах Байкальского региона. Выделен и детально охарактеризован новый вид алкалолотолерантной термофильной факультативно анаэробной органотрофной бактерии *Anoxybacillus mongoliensis*. Показано, что данная бактерия секретирует термостабильную сериновую субтилизин-подобную протеазу, имеющую оптимум активности при 65<sup>0</sup>С и рН 10,5-10,8. В целом результаты диссертации расширяют представления о видовом разнообразии и функциональной активности представителей аэробного микробного сообщества щелочных термальных источников Байкальского региона. Кроме того, новые микроорганизмы, обитающие при экстремальных значениях температуры и рН, являются потенциальными источниками новых ферментов, ценных для использования в производствах, требующих повышенных температур и значений рН среды. Результаты исследований могут быть использованы в биотехнологии, бальнеологических исследованиях, а также учебном процессе при изучении микробиологии и экологии.

**Апробация работы.** Результаты исследований доложены автором ежегодных Межрегиональных конференциях «Научный и инновационный потенциал Байкальского региона глазами молодежи» г. Улан-Удэ (2004-2005), Межрегиональной научно-практической конференции «Биология микроорганизмов и их научно-практическое использование» (Иркутск, 2004), Всероссийской молодежной школы-конференции «Актуальные аспекты современной микробиологии» (Москва, 2005), ежегодной научно-практической конференции преподавателей, аспирантов и студентов ВСГТУ, Улан-Удэ (2005-2006) и на Международной научной конференции «Биоразнообразие экосистем Внутренней Азии» (Улан-Удэ, 2006).

**Публикации.** По результатам исследования опубликовано 14 работ.

**Объем и структура диссертации.** Материалы диссертации изложены на страницах, включая таблиц и рисунков. Диссертация состоит

из разделов “Введение”, «Обзор литературы», “Экспериментальная часть”, “Заключение”, “Выводы” и “Список литературы” (наименований).

**Благодарности.** Автор глубоко признателен д.б.н., проф. Б.Б. Намсараеву, к.б.н. Бархутовой Д.Д. и к.б.н. Намсараеву З.Б. за постоянное внимание, помощь и полезные советы. Автор выражает благодарность д.б.н., проф. В.М. Горленко и сотрудникам Лаборатории экологии и геохимической деятельности микроорганизмов ИНМИ РАН, д.б.н. Дунаевскому Я.Е. и сотрудникам лаборатории растительных белков НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ, к.б.н. А.М. Лысенко (ИНМИ РАН), к.б.н. В.Н. Акимову (ИБФМ РАН), всем коллегам, родным и друзьям за содействие и поддержку при выполнении диссертационной работы.

Диссертационная работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ №03-04-48047 и 05-4-97215; Президиума РАН «Происхождение и эволюция биосферы»; Интеграционного грантов Президиума СО РАН №170, 24 (2006г.); Министерства образования и науки РФ «Развитие научного потенциала высшей школы (2006-2008 г.) и проекта молодых ученых СО РАН «Разнообразие и функционирование микробного сообщества в щелочных водных экосистемах Забайкалья».

## ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Объектами исследования** являлись слабоминерализованные (до 1 г/л) азотные гидротермы Байкальского региона, расположенные в Курумканском и Баргузинском районах Республики Бурятия и в Архангайском и Баянхонгорском аймаках Монголии (табл. 1). Для исследования были отобраны пробы воды, донных осадков и микробных матов в летне-осенний период с 2002 по 2005 год.

Таблица 1. Местоположение и физико-химическая характеристика гидротерм Прибайкалья и Центральной Монголии

Источник	Местоположение	T, °С	pH
Алла	Баргузинский хребет	70	8,9-9,9
Большая речка	Баргузинский хребет	61,4	9,28-9,8
Кучигер	Баргузинский хребет	47,3	9,4-9,6
Умхэй	Долина реки Баргузин	46	9,1
Гарга	Икатский хребет	72,5	8,2
Уро	Икатский хребет	69,1	8,7-9,0
Сея	Икатский хребет	45-49	9,3-9,7
Гусиха	Голондинский хребет	71,5	8,2-8,4
Горячинск	Побережье оз. Байкал	42-43	8,9-9,0
Цэнхэр	Архангайский аймак	84	9,8
Шивэрт	Архангайский аймак	56	10,4-10,6
Хужирт	Архангайский аймак	49,1	10,6
Шаргулжут	Баянхонгорский аймак	87-90	8,0-8,6
Хурамт	Баянхонгорский аймак	54	9,2

Максимальные значения температуры (84-90<sup>0</sup>С) зафиксированы в воде источников Шаргулжут и Цэнхэр. Температура воды в точках отбора проб на выходе и по изливу термальных вод в изученных источниках варьировала от 35 до 90<sup>0</sup>С. Значения рН изменялись от слабо-щелочных 8,0-8,6 в воде источников Гарга, Гусиха и Шарагулжут до сильно-щелочных 10,4-10,6 в гидротермах Шивэрт и Хужирт.

**Методы исследования.** В местах отбора проб температуру воды измеряли сенсорным электротермометром Prima (Португалия). рН среды определяли потенциометрически при помощи полевого рН-метра рНер (Португалия). Значение общей минерализации определяли портативным тестер-кондуктометром TDS-4.

Содержание органического углерода ( $C_{орг}$ ) в пробах определяли по методу Тюрина в модификации Никитина (Аринушкина, 1980). Определение содержания белка проводили по реакции с кумасси синим (Методы общей бактериологии, 1984). Углеводы определяли по реакции с дифениламином и соляной кислотой (Методы химии углеводов, 1967; Захарова, Косенко, 1982). Определение липидов проводили по модифицированной методике Блайя и Дайэра (Кейтс, 1975). Оптическую плотность измеряли на фотоэлектроколориметре КФК-20 (Россия) и спектрофотометре СЕСИЛ-1021 (Великобритания). Для определения содержания зольных элементов пробы сжигали в печи при температуре 550<sup>0</sup>С (Аринушкина, 1980).

Учет численности и выделение аэробных термофильных бактерий различных физиологических групп проводили методом предельных разведений и высева на агар на модифицированной среде Пфеннига следующего состава (г/л):  $NH_4Cl$  – 0,4;  $KH_2PO_4$  – 0,5;  $NaNO_3$  – 0,4;  $MgCl_2$  – 0,2;  $Na_2SO_4$  – 0,5;  $NaCl$  – 0,5;  $KCl$  – 0,5; дрожжевой экстракт – 0,1; раствор микроэлементов по Липперту, Витману – 1 мл; витамин  $B_{12}$  – 20 мкг. В качестве субстратов вносили (в %): для протеолитиков – пептон (1,5); для амилитиков – крахмал (1,5); для целлюлолитиков – полоску фильтровальной бумаги (1); для липолитиков – твин-40 (1,5); для сахаролитиков – глюкозу (1,5). рН среды доводили 0,1 М раствором  $NaOH$  до 7,5–8,5 при 25<sup>0</sup>С, температура инкубации 55<sup>0</sup>С. Общую численность микроорганизмов (ОЧМ) определяли методом Разумова на мембранных фильтрах (Романенко, 1974). Морфотипы бактерий, размеры, подвижность и спорообразование изучали микроскопированием образцов с помощью светового микроскопа AxioStar Plus (Karl Zeiss) в фазовом контрасте и на окрашенных препаратах при 100-кратном увеличении объектива (общее увеличение 1000).

Температурные диапазоны развития бактерий устанавливали в градиентном термостате по описанной ранее методике (Юрков и др., 1991). Диапазон рН определяли с разными концентрациями бикарбоната и карбоната натрия. Диапазон развития при разной минерализации среды

определяли с разными концентрациями хлорида натрия. Способность к использованию различных источников углерода проверяли на средах содержащих 0,1 г/л дрожжевого экстракта, в которую вносили испытуемые источники углерода в концентрации 1 г/л. Биомассу бактерий определяли по изменению оптической плотности культуры при длине волны 650 нм на фотометре КФК-20. Биохимические свойства бактерий, удельную скорость роста определяли общепринятыми методами (Герхардт, 1984).

Активность внеклеточных протеолитических ферментов определяли с помощью метода Эрлангера с соавторами, используя 5 мМ синтетические субстраты N-бензоил-L-аргинил-п-нитроанилид (БАПА, субстрат трипсин-подобных протеиназ), пироглутамил-аланил-аланил-лейцил-п-нитроанилид (ГААЛП, субстрат химотрипсин- и субтилизин-подобных ферментов), а также субстраты аминопептидаз фенилаланил-п-нитроанилид (ФПА) и L-лейцин-п-нитроанилид (ЛПА). Для определения оптимума pH секретируемой протеазы были использованы 0,02 М растворы цитратно-фосфатного и глицин- NaOH буферов в диапазоне pH от 2 до 13. Температурный оптимум фермента определяли, измеряя активность фермента при значениях температуры от 30 до 90<sup>0</sup>С. Для выяснения природы функциональных групп активного центра использовались ингибиторы сериновых протеаз – фенилметилсульфонилфторид (ФМСФ) и химо-трипсин-подобных протеаз - ТФСК.

Выделение и очистка ДНК проведены в ИНМИ РАН (г. Москва) по стандартным методам (Marmur, 1961). Содержание ГЦ в ДНК определяли по температуре плавления ДНК, гомологию ДНК-ДНК изучали методом оптической реассоциации (De Ley, 1970). Амплификация и секвенирование генов 16S рРНК проведены в ИБФМ РАН (г. Пущино) и в ЛИН СО РАН (г. Иркутск). Анализ полученных нуклеотидных последовательностей проводили путем поиска гомологичных последовательностей в Genbank с помощью поисковой программы NCBI BLAST ([http:// www. ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Филогенетическое дерево было построено с использованием пакета программ TREECON W по методу объединения ближайших соседей.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

**Химический состав микробных матов и донных осадков гидротерм.** Для количественного и качественного определения органического вещества (ОВ) в изучаемых гидротермах был изучен химический состав микробных матов и донных отложений, а именно определено содержание органического углерода ( $C_{орг}$ ), золы, углеводов и белка (табл. 2, 3).

Таблица 2. Химический состав микробных матов гидротерм (в % от сухого веса)\*

Гидротерма	$C_{орг}$	Зола	Углеводы	Белок
Шаргулжугт	18,09	68,72	13,05	5,61
Цэнхэр	20,50	81,69	17,00	9,12
Шивэрт	13,50	96,16	13,70	7,36
Хужирт	9,50	89,59	13,00	7,97
Гусиха	31,35	75,10	24,77	12,43
Уро	26,20	68,73	24,70	13,42
Гарга	25,78	64,22	21,15	11,12
Сея	25,15	64,31	24,73	15,79
Алла	16,78	64,22	16,10	6,72
Кучигер	23,86	57,34	20,23	11,45
Умхэй	19,60	90,40	9,5	9,45

\*- использование различных методов при определении химического состава может приводить к ошибке при суммировании, доходящей до 10 %. Тем не менее, это позволяет сравнивать источники по каждому отдельному параметру между собой.

Микробные маты характеризовались высоким содержанием  $C_{орг}$ , достигавшим 31,35%. Максимальное количество  $C_{орг}$  отмечено в матах ист. Гусиха, развивающихся при высоких температурах (71,5<sup>0</sup>C). С учетом того, что содержание углерода в глюкозе составляет порядка 40%, можно предположить, что общее содержание ОВ в исследованных матах будет находиться в пределах 25-75%. Большая часть ОВ матов представлена углеводами. Максимальное содержание углеводов зафиксировано в матах источников Гусиха, Сея и Уро. Содержание углеводов в матах, основу которых составляли цианобактерии, близко к содержанию углеводов в накопительных культурах цианобактерий. Согласно литературным данным цианобактерии могут накапливать от 17 до 43% углеводов. В отдельных случаях общее содержание углеводов в цианобактериях достигало 70% (Барашков, 1965,1972; Гусев, Никитина, 1979). В природных условиях ослизнение микробных матов за счет образования микроорганизмами углеводсодержащих экзополимеров происходит как правило при неблагоприятных условиях окружающей среды (высоких значениях температуры и pH) (Заварзин, 1993; Sangar, Dugan, 1972; Пирог и др., 1998).

Содержание белка в микробных матах термальных источников варьировало от 5,61 до 15,79%. В микробных матах отмечено низкое содержание липидов. Их количество не превышало 2% от сухой массы мата. Исследованные маты характеризовались высоким содержанием золы (до 96,16%).

Содержание органического углерода в донных отложениях исследованных гидротерм изменяется в пределах от 1,5% до 10,3%. Высокое содержание  $C_{орг}$  (10,3%) в пробе ила источника Кучигер может быть объяснено тем, что местность выхода термальных вод сильно заболочена и покрыта зарослями растительности.



Таблица 3. Химический состав донных осадков гидротерм (в % от сухого веса)\*

Гидротерма	$S_{орг}$	Зола	Углеводы	Белок
Алла	5,00	92,30	1,80	5,12
Кучигер	10,30	89,64	8,50	3,7
Умхей	8,50	81,45	5,00	7,36
Цэнхэр камни ил	1,50	90,47	0,40	1,12
	9,50	88,79	6,40	8,2
Шивэрт	7,50	99,98	1,30	2,43
Хужирт	3,42	99,77	0,80	0,97
Шаргулжут	9,00	98,34	5,80	3,45

\*- использование различных методов при определении химического состава может приводить к ошибке при суммировании, доходящей до 10 %. Тем не менее, это позволяет сравнивать источники по каждому отдельному параметру между собой.

Наиболее низкие концентрации установлены в илах источников Цэнхэр и Хужирт (1,5 и 3,42%). Пониженные концентрации  $S_{орг}$  выявлены в источниках, выходящих непосредственно из трещин в породах, при отсутствии в месте выхода почвенного слоя и заболоченностей. Максимальное количество белка составило 8,5% в иле Кучигерского источника. Белка в среднем в илах больше, чем углеводов – это можно объяснить тем, что мертвая биомасса бактерий и другие источники белка аллохтонного происхождения оседают на дно и накапливаются, образуя слой осадков (Современная микробиология, 2005). Содержание углеводов в осадках варьировало от 0,4 до 8,5%, что на порядок меньше содержания углеводов в микробных матах. Очень высокие значения зольности (до 99,98%) свидетельствуют о накоплении в илах неорганических соединений.

Сравнительный анализ содержания  $S_{орг}$  матов и донных осадков термальных источников показал, что удельное содержание ОВ выше в микробных матах гидротерм.

**Распространение аэробных термофильных органотрофных бактерий в щелочных термальных источниках.** Известно, что на первом этапе деструкции ОВ основная роль принадлежит аэробным бактериям, осуществляющим гидролиз. В них следует различать группировки сахаролитических, протеолитических, липолитических организмов, использующих соответственно полимеры углеводов, азотистых соединений, липидов и продукты их гидролиза. Численность основных физиологических групп бактерий, участвующих в аэробной деструкции органического вещества, была определена в донных отложениях и микробных матах источников.

Доминирующими физиологическими группами как в илах, так и в матах были протеолитические бактерии, максимальные численности которых достигали 1 млн. кл/мл.

Таблица 4. Максимальная численность аэробных термофильных бактерий в илах и микробных матах гидротерм, lg кл/мл

Гидротерма	T, °C	pH	Численность термофильных аэробных бактерий в илах				
			Протеолитики	Сахаролитики	Амилолитики	Липолитики	Целлюлолитики
Шаргулжут	90	8,0	5	2	1	3	1
	87	8,0	5	2	1	3	1
	72	8,0	6	2	2	1	2
	67	8,0	6	3	2	3	2
	59	8,1	6	4	3	3	2
Цэнхэр	83,7	9,8	5	4	1	3	2
	80,3	9,8	6	4	2	2	1
Гарга	72,5	8,2	4	4	3	1	1
Гусиха	71,5	8,4	3	3	3	1	1
Алла	70	9,9	6	4	3	3	2
Уро	64	8,9	3	3	1	2	2
Шивэрт	56	10,4	5	4	2	3	2
Хурамт	54,7	9,2	3	3	2	3	2
Кучигер	47,3	9,6	3	3	3	1	4
Умхэй	46	9,1	4	4	3	2	2
Горячинск	43	9,0	3	3	3	2	2
Хужирт	37	10,6	2	2	2	1	3
Гидротерма	T, °C	pH	Численность термофильных аэробных бактерий в матах				
			Протеолитики	Сахаролитики	Амилолитики	Липолитики	Целлюлолитики
Гусиха	66,9	8,2	4	4	3	2	1
Уро	62	8,7	3	4	2	2	1
Шаргулжут	52	8,0	4	4	3	3	2
	36	8,3	2	4	3	1	3
	45	8,3	3	3	3	1	1
	35	8,1	4	3	3	2	3
	59	8,6	4	5	3	1	1
Сея	49	9,7	5	5	4	2	2
	45	9,3	5	5	4	3	3
Горячинск	42	8,9	5	5	4	3	2
Кучигер	40	9,4	2	4	2	1	1
Алла	38	8,9	4	3	2	2	2

Ни больше количество аэробных протеолитических бактерий выявлено в донных осадках источников Шаргулжут, Цэнхэр и Алла в выходах с температурами 59-72<sup>0</sup>С. В высокотемпературных выходах (83,7-90<sup>0</sup>С) количество этих бактерий было на порядок ниже, т.к. данный температурный диапазон является областью развития гипертермофилов. Исследуемые нами бактерии, выделенные при 55<sup>0</sup>С, вероятно способны переживать высокую температуру в источнике. В источнике Хужирт зафиксировано наименьшее количество протеолитических бактерий (100 кл/мл), что вероятно объясняется малым содержанием белка (0,8 мг белка/кг сухого вещества) в пробе ила.

Количество бактерий, гидролизующих углеводы, варьировало от 10 до 100 тыс. кл/мл. Наибольшее число бактерий-сахаролитиков (100 тыс. кл/мл) наблюдали в микробных матах источников Сея и Шаргулжут. Практически во всех источниках численность сахаролитических гидролитиков была на порядок выше в микробных матах, чем в донных отложениях. Вероятно, это связано с тем, что большая часть ОВ матов представлена углеводами (9,5-24,77%).

Максимальное число бактерий (10 тыс. кл/мл), использующих в качестве основного субстрата – крахмал, зафиксировано в микробных матах источника Сея, развивающихся при температурах 45-49<sup>0</sup>С. Данный температурный диапазон являлся оптимальным для развития амилолитических гидролитиков. В донных осадках численность бактерий-амилолитиков снижалась на 1-2 порядка. Выделенные бактерии проявили высокую активность по расщеплению крахмального агара, 92% культур показали хорошо выраженные зоны просветления (от 5 до 11 мм).

Число липолитических бактерий достигало 1000 кл/мл, что, вероятно, объясняется низким содержанием доступных липидов в водоемах. В целом, картина распространения бактерий-липолитиков в микробных матах и донных отложениях одинакова. Липолитические бактерии, выделенные из высокотемпературных источников Шаргулжут и Цэнхэр, были морфологически однородны и представлены споровыми палочками. В культурах гидротерм Сея, Алла и Хурамт доминировали длинные цепочки бактерий.

Количество бактерий-целлюлолитиков, колебалось от 10 до 10 тыс. кл/мл как в микробных матах, так и в донных осадках. Наибольшее их количество зафиксировано в илах источника Кучигер, выходы которого расположены в болотистой местности покрытой растительностью. Наблюдалась количественная зависимость распространения аэробных целлюлолитиков от температуры в источниках. При повышении температуры от 47,3 до 72,5<sup>0</sup>С численность этих микроорганизмов снижалась на 1-2 порядка. Выявленная группа бактерий в основном представлена подвижными спорообразующими палочками.

Общая численность микроорганизмов (ОЧМ) была определена в водной толще и донных осадках изучаемых гидротерм и колебалась от 3,46 до 81,56 млн. кл/мл. Максимальные значения ОЧМ в донных отложениях (55,36-75,12 млн. кл/мл) были отмечены в источниках Алла, Кучигер, Шивэрт и Шаргулжут в температурном диапазоне от 38 до 59<sup>0</sup>С, содержание органического углерода варьировало от 5,0 до 9,0% от сухой массы ила). Минимальные значения ОЧМ в донных отложениях (4,97-17,24 млн кл/мл) зафиксированы в высокотемпературных гидротермах Гусиха и Уро (66,9-71,5<sup>0</sup>С), и в иле источника Хужирт (37<sup>0</sup>С) с низким содержанием ОВ (3,42 % от сухой массы ила).

В водной толще источников общее число бактерий составляет 4,36-59,27 млн кл/мл. В пробе воды низкотемпературного источника Кучигер наблюдалось максимальное количество бактерий 81,56 млн. кл/мл. Содержание бактерий в воде высокотемпературных источников Гарга и Цэнхэр незначительное - 13,47 - 23,86 млн.кл./мл. Низкое содержание бактерий отмечено в воде источника Хужирт – 4,36 млн.кл/мл.

**Выделение и описание аэробных органотрофных бактерий.** Из органотрофных культур с устойчивым ростом, полученных из щелочных гидротерм Прибайкалья: Гарга, Гусиха, Алла, Уро, Сея, Большая речка и Кучигер было выделено 23 штамма аэробных термофильных бактерий. Краткая характеристика выделенных штаммов представлена в таблице 5.

Таблица 5. Характеристика выделенных культур аэробных органотрофных бактерий

Штамм	Гидротерма	Вид пробы	Физиологич. группа	Оптимум T, °C	Оптимум pH
Ga-1-1	Гарга	мат	Протеолитик	45	8,3
Ga-9-2				57	8,5
Ga-6			Амилолитик	60	8,5
Gu-1	Гусиха		Протеолитик	49	8,0
Gu-2				60	8,1
A1	Алла	ил	Протеолитик	45	8,0
A2				50	8,1
A3				49	8,0
A4				50	8,5
A5				49	8,5
Al-9-1		мат		49	8,0
Ur-4	Уро		Сахаролитик	45	8,5
Ur-5			Протеолитик	49	8,0
Ur-6				46	8,0
Bp-2-1	Большая речка			50	8,2
Bp-2-2				50	8,2
Se-1	Сея			49	8,2
Se-3				52	8,3
Se-4				ил	Липолитик
Se-5	Амилолитик	45	8,5		
Se-6-1		45	8,4		
Se-6-2				49	8,5
Ku-3	Кучигер	ил	Целлюлолитик	45	8,0

Клетки бактерий представлены спорообразующими палочками, размеры которых варьируют в пределах от 0,9-2,3 x 1,9-8,4 мкм. Размеры спор составляют 0,8-0,9 x 0,9-1,2 мкм. Все штаммы являются умеренными термофилами с диапазоном роста от 37 до 75<sup>0</sup>C и оптимумом 45-60<sup>0</sup>C. Диапазон pH для роста – от 6,0 до 9,5, оптимум pH – 8,0-8,5. Оптимальной

концентрацией NaCl (г/л) для роста культур являлась 2-5 г/л, диапазон роста от 0 до 50 г/л.

Культуры использовали широкий спектр субстратов: арабинозу, галактозу, глюкозу, маннит, фруктозу, раффинозу, сахарозу, мальтозу, маннозу, дульцит, инозит, пептон, дрожжевой экстракт, крахмал и глицерин. Рамноза, лактоза и сорбит не использовались. Все организмы были способны к брожению на глюкозе и сахарозе, но не сбразивали лактат, рамнозу, пептон, крахмал и целлюлозу. Тесты на каталазу и оксидазу положительные; не продуцировали аммиак, индол и сероводород. На безазотистой среде Эшби роста не проявляли. По физиолого-биохимическим свойствам все штаммы близки к видам *Bacillus*, *Anoxybacillus*.

Все выделенные штаммы были протестированы на наличие ферментативной активности. Все культуры проявили высокую протеазную активность (активно разжижали желатиновые диски) при 55<sup>0</sup>С. Липазную активность определяли при температуре 55<sup>0</sup>С. Всего 14 организмов показали способность расщеплять субстрат твин-40. При этом диаметр зон омыления варьировал от 6 до 15 мм. Высокую активность проявили бактерии по расщеплению крахмального агара, суммарно 19 из 22 штаммов показали различные зоны просветления (от 5 до 11 мм). Казеиназной активностью обладают только 9 изолятов, хотя на среде с пептоном отмечен рост у всех изолятов. Эндоцеллюлазной активностью обладают 3 изолята: Уг-6, Вг-2-1 и Ку-3. Каталазная и оксидазная активности отмечены у всех штаммов. Таким образом, можно заключить, что выделенные штаммы аэробных органотрофных бактерий проявили потенциальную протеазную, липазную, амилазную, казеиназную, эндоцеллюлазную, каталазную и оксидазную активности. Все аэробно выделенные в культуру органотрофные бактерии способны к анаэробному росту за счет брожения, что позволяет им осуществлять разложение ОВ в условиях резких суточных колебаний О<sub>2</sub>.

Для анализа гена 16S рРНК было отобрано 5 штаммов (Ga-1-1, Уг-6, А2, Вг-2-2 и Se-1). В результате было показано, что штамм Ga-1-1 имеет 100 % сходства с *Anoxybacillus* sp. AF-04-1. Наибольшее сходство у культуры Уг-6 выявлено с *Bacillus hemicellulosolyticum* C-11 (99 %). Изоляты Вг-2-2 и А2 на 97 и 99%, соответственно, близки к *B. licheniformis* ВВDC6. У штамма Se-1 обнаружено 95 % сходства с *A. pushchinoensis* AT-2.

Культуры, выделенные из гидротерм с комбинацией наиболее экстремальных значений температуры и рН, привлекли внимание и были исследованы более детально.

**Новая алкалотолерантная термофильная органотрофная бактерия «*Anoxybacillus mongoliensis*».** Из проб ила низкоминерализованных щелочных гидротерм Центральной Монголии Хужирт (Huzhirt), Шиверт (Shivert) и Цэнхэр (Tsenher) с температурами 37-84<sup>0</sup>С и значениями рН 9,8-10,6 было выделено 10 штаммов аэробных термофильных бактерий. Пробы культивировали при 55<sup>0</sup>С, без перемешивания. Чистые культуры были получены путем посева суспензии микроорганизмов на агар и последующих пересевов.

На поверхности агаризованной среды бактерии формировали округлые колонии диаметром 2-4 мм, кремовые, имеющие выпуклый профиль, ровные края и однородную структуру. Клетки имели форму прямых палочек, как правило одиночных или в парах (рис.2). В конце фазы замедленного роста наблюдали появление проспор, спорулирующих клеток и отдельно лежащих спор. Образующиеся эллипсоидальные споры располагались в материнской клетке терминально, несколько расширяя ее. Клетки имели размеры 1,2-1,5 x 4,5-10,6 мкм. Окраска по Граму положительная.

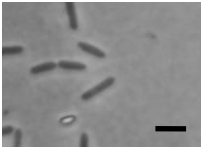


Рис.2. Морфология клеток штамма Т4.  
Масштабная метка 5 мкм.

Все штаммы являются термофилами с диапазоном роста от 37 до 75<sup>0</sup>С и оптимумом 58-61<sup>0</sup>С. Диапазон рН от 6,0 до 10,5, оптимум рН 7,0-8,5. Оптимальной концентрацией NaCl (г/л) для роста культур являлась 2-5 г/л, диапазон роста от 0 до 50 г/л.

Бактерии способны в аэробных условиях утилизировать широкий спектр органических соединений: арабинозу, ксилозу, рибозу, глюкозу, маннит, фруктозу, рамнозу, раффинозу, сахарозу, инозит, глутамат, лактат, пируват, ацетат, пептон, дрожжевой экстракт, гидролизат казеина, крахмал и углеводороды. Галактоза, дульцит, манноза, сорбит, лактоза, мальтоза, глицерин и гликолят культурами не использовались. Организмы способны к брожению на глюкозе и сахарозе, не сбраживали глутамат, лактат, пируват, рибозу, рамнозу, пептон, дрожжевой экстракт, гидролизат казеина, крахмал и целлюлозу. Тесты на каталазу и оксидазу положительные; не продуцировали аммиак, индол.

Уровень ДНК-ДНК гомологии у всех 10-ти выделенных штаммов составил от 72 до 99% (табл.6). Таким образом, выделенные нами штаммы могут быть отнесены к одному виду.

Результаты анализа сиквенса гена 16S рРНК (1527 нуклеотидов) штаммов Т4, S3 и Н5 показали, что штаммы принадлежат к группе *Clostridium/Bacillus* грам-положительных бактерий, роду *Anoxybacillus*.

Таблица 6. ДНК-ДНК гомология между выделенными штаммами

Штамм	ГЦ мол. %	Гомология ДНК (%)									
		H1	H2	H5	H6	S1	S2	S4	T1	T4	T5
H1	43.8	100									
H2	44.2	99	100								
H5	44.2	95	98	100							
H6	44.0	98	97	95	100						
S1	44.2				98	100					
S2	44,4					97	100				
S4	44,6					98	98	100			
T1	44.4								100		
T4	44.2								72	100	
T5	44.2					98			99	96	100

Результаты анализа нуклеотидного состава ДНК показали, что содержание ГЦ пар в ДНК штамма Т4 составляло 44,2 мол%, что было близким к *A. pushchinoensis* (42,2 мол%) и *A. flavothermus* (41,6 мол%) (табл. 7).

Таблица 7. ДНК-ДНК гомология между штаммами *Anoxybacillus* и штаммами Т4 и Н5

Штамм	Содержание Г+Ц (мол %)	ДНК-ДНК сходство, %			
		K1 <sup>T</sup>	DSM 2641 <sup>T</sup>	T4	H5
<i>A. pushchinoensis</i> K1 <sup>T</sup>	42,2	100			
<i>A. flavothermus</i> DSM 2641 <sup>T</sup>	41,6	58,8	100		
T4	44,2	28	38	100	
H5	44,2	31	47	72	100

Результаты ДНК-ДНК гибридизации выявили низкий процент гомологии ДНК для штамма Т4 и типовых штаммов *A. flavothermus* (38 %) и *A. pushchinoensis* (28 %), что свидетельствует о таксономической обособленности Т4 от этих видов. Уровень гомологии ДНК между типовыми штаммами *A. flavothermus* и *A. pushchinoensis* составляет 58,8%.

По совокупности фенотипических и генотипических признаков штамм Т4 является новым видом рода *Anoxybacillus*. В таблице 8 приведены отличительные признаки видов данного рода.

На основании проведенных исследований мы предлагаем отнести выделенные штаммы к новому виду бактерий под названием «*Anoxybacillus mongoliensis*».

Таблица 8. Физиолого-биохимические свойства штамма «*A. mongoliensis*» Т<sub>4</sub> и некоторых других представителей рода *Anoxybacillus*

Признак	1	2	3	4	5	7
Ширина клеток, мкм	1,2-1,5	0,85	0,4-0,5	0,55	1,0	0,75
Длина клеток, мкм	4,5-10,6	2,3-7,1	2,5-3,0	4,6	2,5-8,8	5,0
Подвижность	-	+	-	+	+	+
Форма спор	Овальная	Н.д.	Круглая	Круглая	Овальная	Круглая
Температура роста (°C)	37-75	30-72	37-66	30-70	37-66	40-70
Интервал Оптimum	60	60-65	62	50	57-62	55-60
рН роста						
Интервал	6,0-10,0	5,5-9,0	8,0-10,5	6,0-11,0	5,7-9,9	6,0-10,0
Оптimum	7,0-8,5	Н.д.	9,5-9,7	7,5-8,5	6,8-8,5	7,5-8,0
Пигментация	-	+	-	-	-	-
Каталаза	+	+	-	+	-	+
Оксидаза	+	+	Н.д.	+	-	+
Субстраты <sup>1</sup> :						
Галактоза	-	+ <sup>2</sup>	(-)	Н.д.	+ (-)	Н.д.
Сорбит	-	+	(-)	Н.д.	- (-)	Н.д.
Мальтоза	-	+	Н.д.	+	+ (+)	Н.д.
Желатин	+	-	-	+	- (-)	+

Обозначения штаммов: 1 – штамм «*A. mongoliensis*» Т<sub>4</sub>, 2 - *B. flavothermus* DSM 2641<sup>T</sup> (Heinen et al., 1982), 3 - *A. pushchinoensis* K1<sup>T</sup> (Pikuta et al., 2000), 4 - *A. ayderensis* AB04<sup>T</sup> (Dulger et al., 2004), 5 - *A. kamchatkensis* DSM 14988 (Kevbrin et al., 2005), 7 - *A. gonensis* G2<sup>T</sup> (Belduz et al., 2003).

<sup>1</sup> – аэробное и анаэробное использование субстрата, без скобок и в скобках соответственно

<sup>2</sup> – измеряли как β-галактозидазную активность

Все штаммы росли на глюкозе и сахарозе. +, наличие свойства; -, отсутствие свойства; Н.д. – нет данных.



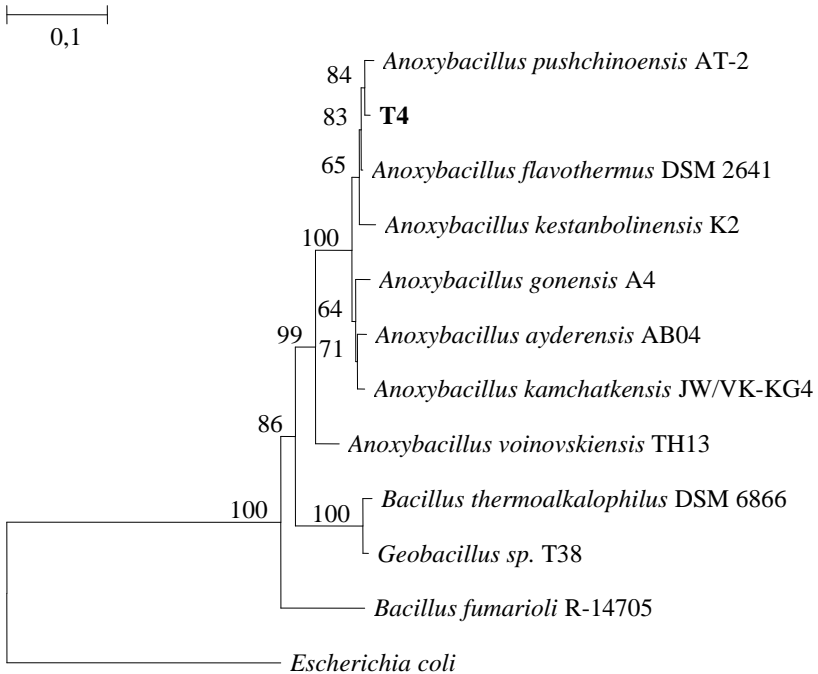


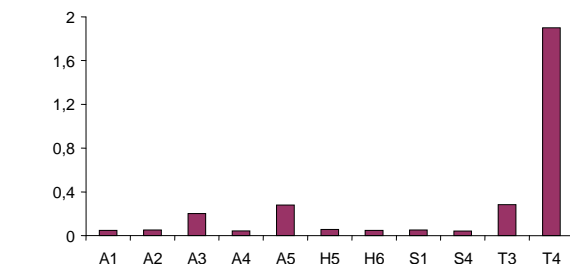
Рис.3. Филогенетическое дерево последовательностей штамма T4 «*Anoxybacillus mongoliensis*». Построено на основе анализа фрагмента гена 16S рРНК с помощью метода объединения ближайших соседей (NJ). Вероятностная поддержка отдельных узлов оценивалась с помощью бутстрэп-анализа, приведены значения выше 50%. Шкала соответствует 0,1 нуклеотидных замен на сайт.

**Внеклеточная протеолитическая активность.** Исследование секретируемой внеклеточной протеазы у разных видов термофильных бактерий дает возможность выявить природные изоляты с высокой ферментативной активностью и различными спектрами секретируемых внеклеточных протеаз. Нами была проверена секретируемая протеолитическая активность 12 и 24-часовых культур 4-х штаммов *Bacillus sp.* (A1, A3, A4 и A5), штамма *B. licheniformis* A2, выделенных из термального источника Алла, и 10-ти штаммов «*A. mongoliensis*» (H1, H2, H5, H6, S1, S2, S4, T1, T4 и T5) с использованием синтетических субстратов БАПА, ГААЛП, ФПА и ЛПА. Отмечено повышение удельной активности у 24-часовых культур по сравнению с 12-часовыми. Вероятно, это связано с увеличением продукции внеклеточной протеазы после экспоненциальной фазы роста, которая для выделенных культур составила 12-14 часов.

Большинство исследуемых штаммов проявили низкую активность секретируемой трипсинподобных протеаз по БАПА). Относительно протеазной

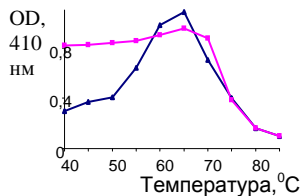
активности по субстрату ЛПА следует отметить, что наибольшие значения активности проявились у культур А3, А4 и А5. Максимальную активность по субстрату ФПА проявили штаммы А1, А2, Н5, Н6, S1 и Т3. Способность образования специфичных протеаз является результатом адаптации изучаемых штаммов к экстремальным условиям обитания.

Рис. 4. Активность суточных культур по ГААЛП



Культуры А3, А5 и Т3 проявили наибольшую активность при использовании в качестве субстрата ГААЛП; максимальные значения активности отмечены у штамма Т4 (рис.4).

Было изучено влияние температуры и рН на эту активность и



стабильность соответствующей внеклеточной протеазы, секретируемой штаммом Т4. Фермент имеет оптимум рН 10,5-10,8; стабилен в интервале рН от 6 до 11 (рис 5). Температурный оптимум протеазы около 65<sup>0</sup>С, фермент сохранял до 45% активности при температурах до 75<sup>0</sup>С (рис 6).

Рис.4. Оптимум температуры (▲) и стабильности (■) протеазы, секретируемой штаммом Т4 при 37<sup>0</sup>Св течение 24 ч.

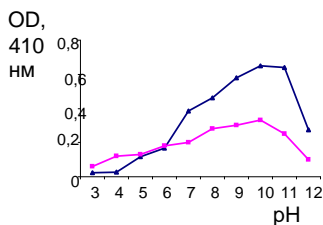


Рис. 5. Оптимум pH (▲) и стабильности (■) протеазы, секретируемой штаммом Т<sub>4</sub> при 37°C в течение 24 ч.

Активность исследуемого фермента полностью ингибировалась ФМСФ – специфическим ингибитором сериновых протеаз. При этом ТФХК, ингибитор химотрипсин-подобных ферментов, оказался неэффективен по отношению к этой активности. Исходя из результатов ингибиторного анализа и субстратной специфичности можно предположить, что секретируемый фермент «*Anoxybacillus mongoliensis*» относится к классу сериновых протеаз субтилизин-подобного типа.

Термостабильные ферменты находят применение в различных областях биотехнологии – от индустриального производства гидролитических ферментов для детергентов до использования термостабильных ферментов обмена нуклеиновых кислот в генетических и молекулярно-биологических исследованиях (Kristjansson et al., 1989; Sunna et al., 1997; Vielle, Zeikus, 2001 и др.). Протеазы из алкалофильных бактерий применяются при дублении кожи, в пивоварении и производстве специфических детергентов. Протеазы составляют около 60% от количества всех производимых ферментов (Nunes, Martins, 2001; Singh, 2001; Zeikus et al., 1998). Бактериальные протеазы являются наиболее значимыми, по сравнению с протеазами животного и грибного происхождения (Ward, 1985). Проведенные исследования показали, что исследуемые штаммы *Bacillus sp.*, *B. licheniformis* и «*A. mongoliensis*» являются активными продуцентами внеклеточных сериновых протеаз, которые могут быть использованы в производствах, требующих повышенных температур и значений pH среды.

### ВЫВОДЫ:

1. Термофильные аэробные органотрофные бактерии были выявлены в щелочных гидротермах Байкальского региона при температурах от 35 до 90°C и pH от 8,0 до 10,6.
2. Показано доминирование в исследуемых источниках протеолитических и сахаролитических групп бактерий с максимальными численностями свыше 100 тысяч кл/мл. Максимальные численности амилोलитических и целлюлозоразлагающих бактерий не превышали 10 тысяч кл/мл.
3. Выделенные аэробные органотрофные культуры являются спорообразующими алкалотолерантными факультативно-анаэробными термофилами принадлежащими к группе *Clostridium/Bacillus* грам-положительных бактерий. Выделенные

штаммы обладают широким спектром гидролитических ферментов и вероятно обеспечивают в сообществе функции первичных деструкторов.

4. Из щелочных гидротерм Монголии выделен новый вид алкалотолерантной термофильной факультативно-анаэробной органотрофной бактерии «*Anoxybacillus mongoliensis*», способной к росту при pH 6,0-10,0 и температуре 37-75<sup>0</sup>С.
5. Типовой штамм «*A. mongoliensis*» Т<sub>4</sub> является активным продуцентом термостабильных внеклеточных щелочных протеолитических ферментов, относящихся к классу субтилизинподобных сериновых протеаз, имеющих оптимум активности при 65<sup>0</sup>С и pH 10,5-10,8.

### **Список работ, опубликованных по материалам диссертации:**

1. Бабасанова О.Б. Распространение аэробных термофильных бактерий в высокотемпературной гидротерме Шаргулжут / О.Б. Бабасанова, Д.Д. Бархутова // Тезисы. «Биология – наука XXI века: 8-ая Международная Пушинская школа-конференция молодых ученых. – Пушино, 2004. - С. 140.
2. Бабасанова О.Б. Распространение термофильных липолитических бактерий в гидротермах Байкальского региона / О.Б. Бабасанова, Д.Д. Бархутова // Материалы Межрегиональной научной конференции «Научный и инновационный потенциал Байкальского региона глазами молодежи». – Улан-Удэ: Изд-во БГУ, 2004. – С. 78-79.
3. Бабасанова О.Б. Микробное сообщество высокотемпературного источника Шаргулжут / О.Б. Бабасанова, А.В. Брянская, Д.Д. Бархутова // Материалы Межрегиональной научной конференции «Биология микроорганизмов и их научно-практическое использование». – Иркутск, 2004. – С.105-108.
4. Бабасанова О.Б. Гидролитические бактерии гидротерм Шаргулжут, Хурамт и Хужирт (Монголия) / О.Б. Бабасанова // Материалы VIII Международной научной конференции «Экология Южной Сибири и сопредельных территорий».- Абакан, 2004. – С.122.
5. Бабасанова О.Б. Аэробные термофильные бактерии гидротермы Шаргулжут (Монголия) / О.Б. Бабасанова, Д.Д. Бархутова // Вестник БГУ. Серия 2. Биология. - Вып.7. – Улан-Удэ, 2005. - С.155-159.
6. Бабасанова О.Б. Термофильные протеолитические и сахаролитические бактерии щелочных гидротерм Центральной Монголии / О.Б. Бабасанова, Д.Д. Бархутова // Тезисы. «Биология – наука XXI века: 9-ая Международная Пушинская школа-конференция молодых ученых. – Пушино, 2005. - С. 181.

7. Бабасанова О.Б. Новая факультативно анаэробная бактерия рода *Anoxybacillus*, выделенная из щелочного термального источника Монголии / О.Б. Бабасанова, З.Б. Намсараев // Тезисы Всероссийской молодежной школы-конференции «Актуальные аспекты современной микробиологии».- Москва, ИНМИ РАН, 2005.- С.6-7.
8. Бабасанова О.Б. Функциональное разнообразие аэробных термофильных бактерий, выделенных из гидротерм Центральной Монголии / Б.С. Цыренов, О.Б. Бабасанова // Материалы IX Международной научной конференции «Экология Южной Сибири и сопредельных территорий».- Абакан, 2005. – С. 150.
9. Бабасанова О.Б. Выделение и описание термофильных *Bacillus* из гидротерм Монголии / О.Б. Бабасанова, С.В. Зайцева, Д.Д. Бархутова // Материалы Межрегиональной научной конференции «Научный и инновационный потенциал Байкальского региона глазами молодежи».- Улан-Удэ: Изд-во БГУ. – 2005. – С. 12-13.
10. Бабасанова О.Б. Внеклеточная протеазная активность термофильных бактерий из щелочных термальных источников Бурятии и Монголии / О.Б. Бабасанова, Д.Д. Бархутова // Сборник научных трудов. Серия: Химия и биологически активные вещества. - Вып. 10 . – Улан-Удэ: Изд-во ВСГТУ, 2006. – С. 83-90.
11. Бабасанова О.Б. Физиолого-биохимические свойства термофильных органотрофных бактерий, выделенных из гидротерм Бурятии / О.Б. Бабасанова, З.Б. Намсараев, Д.Д. Бархутова // Тезисы Всероссийской молодежной школа-конференции «Актуальные аспекты современной микробиологии».- Москва, ИНМИ РАН, 2006.- С.47-48.
12. Бабасанова О.Б. Биоразнообразие аэробных гетеротрофных бактерий в гидротермах Бурятии и Монголии / С.В. Зайцева, О.Б. Бабасанова // Тезисы Международной научной конференции «Биоразнообразие экосистем Внутренней Азии».- Улан-Удэ, 2006.- С. 44.
13. Бабасанова О.Б. Аэробные термофильные бактерии – липолитики щелочных гидротерм Байкальского региона / О.Б. Бабасанова, Д.Д. Бархутова // Сборник научных трудов. Серия: Химия и биологически активные природные соединения. - Вып. 12 . – Улан-Удэ: Изд-во ВСГТУ, 2007. – С.28-29.
14. Бабасанова О.Б. Аэробные органотрофы из щелочных термальных источников Байкальского региона / О.Б. Бабасанова, Д.Д. Бархутова, З.Б. Намсараев // Тезисы Всероссийской конференции молодых ученых «Экология в современном мире: взгляд научной молодежи». – Улан-Удэ: Изд-во БНЦ СО РАН, 2007. – С. 131-132.

