

На правах рукописи

ШАГЖИНА АЙВИ ПЕТРОВНА

**ЭКОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА
МИКРООРГАНИЗМОВ, УЧАСТВУЮЩИХ В КРУГОВОРОТЕ
АЗОТА В ЩЕЛОЧНЫХ ГИДРОТЕРМАХ ПРИБАЙКАЛЬЯ**

03.00.16 – экология
03.00.07 – микробиология

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Улан-Удэ 2007

Работа выполнена в Институте общей и экспериментальной биологии СО РАН

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Баир Бадмабазарович Намсараев

Научный консультант: доктор биологических наук
Яков Ефимович Дунаевский

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Александр Иванович Саралов
кандидат биологических наук, доцент
Любовь Батомункуевна Буянтуева

Ведущее учреждение: Лимнологический институт СО РАН

Защита диссертации состоится «16» мая 2007 г. В 9⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 212.022.03 в Бурятском государственном университете по адресу: 670000, г. Улан-Удэ ул. Смолина, 24а, конференц-зал.
Факс: (3012) 211593, e-mail: d21202203@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Бурятского государственного университета

Автореферат разослан « 13 » апреля 2007 года.

Ученый секретарь диссертационного совета
кандидат биологических наук

Шорноева Н.А.

Актуальность темы. Азот является одним из важнейших биофильных элементов, во многом определяющий характер и направление микробиологических процессов в различных экосистемах. Избыток или недостаток азотсодержащих соединений отражается на общей продуктивности водоемов. В настоящее время накоплен большой материал, освещающий круговорот азота в таких водных экосистемах как моря, океаны и озера (Кузнецов и др., 1989; Goering, Parker, 1972; Birch, Spiridakis, 1981; Knowles, 1982; Kuenen et al., 1988; Zehr et al., 1998; Саралов, 1991; Zumpf, 1992; Koops, 2001; Lis, 2006).

В гораздо меньшей степени изучены особенности цикла азота в экосистемах, характеризующихся как экстремальные. В пределах Байкальской рифтовой зоны широко распространены слабоминерализованные источники, газирующие азотом с высокими значениями температуры (до 75°C) и pH (до 10). В щелочных термальных источниках проведено много исследований, посвященных азотфиксирующим цианобактериям. В то же время роль алкалотермофильных азотфиксирующих, нитрифицирующих и денитрифицирующих бактерий в биогеохимическом цикле азота изучена недостаточно.

Цель исследования - изучение бактериальных процессов цикла азота в гидротермах Прибайкалья, выделение и описание алкалотермофильных бактерий, участвующих в этих процессах.

Задачи исследования:

1. Изучение физико-химических параметров исследуемых щелочных термальных источников Прибайкалья.
2. Исследование сезонной динамики азотсодержащих соединений в илах.
3. Определение интенсивности бактериальных процессов цикла азота.
4. Изучение внеклеточной протеолитической активности в нативных образцах.
5. Определение численности азотфиксирующих, аммонифицирующих, нитрифицирующих, денитрифицирующих бактерий по сезонам.
6. Выделение чистых культур бактерий цикла азота и изучение их физиолого-биохимических свойств и определение функциональной активности.

Научная новизна работ. Впервые проведена комплексная оценка интенсивности микробного цикла азота в щелочных гидротермах. Впервые изучено пространственно-временное распространение бактерий, участвующих в процессах трансформации азота в щелочных термальных источниках Прибайкалья. Определено вертикальное распределение бактерий круговорота азота, содержание органических веществ и внеклеточная протеолитическая активность микроорганизмов в илах гидротерм. Выделены накопительные и чистые культуры азотфиксаторов, аммонификаторов, нитрификаторов и денитрификаторов, способные

расти в щелочных условиях среды (рН до 10,2) при высоких температурах (до 70⁰С). Описана алкалотермофильная нитритоксилирующая *Nitrospira sp.* с оптимумом роста при температуре 48⁰С и рН 8,7.

Практическая значимость. Количественная оценка функциональной активности микроорганизмов круговорота азота может быть использована для определения экологического состояния водных экосистем. Выделенные культуры представляют интерес для биотехнологии как активные продуценты протеаз, устойчивых к высоким значениям температуры и рН. Материалы, представленные в диссертации, могут быть использованы при чтении курса лекций по предмету “Микробиология”, “Биохимия”, “Экология”.

Апробация работы. Результаты работы были представлены на научно-практической конференции «Биология микроорганизмов и их научно-практическое использование» (Иркутск, 2004); 8-ой Пушкинской школе-конференции молодых ученых “Биология – наука XXI века” (Пушино, 2004); Южносибирской научной конференции студентов и молодых ученых «Экология Южной Сибири» (Хакасия, 2004, 2005); Международной конференции “Экосистемы Монголии и приграничных регионов сопредельных стран: природные ресурсы, биоразнообразие и экологические перспективы”, Улан-Батор (Монголия) 2005; V межрегиональной научной конференции молодых ученых «Научный и инновационный потенциал Байкальского региона», (Улан-Удэ, 2006); Молодежной школе-конференции «Актуальные аспекты современной микробиологии» ИНМИ (Москва, 2005, 2006); Всероссийской конференции с международным участием «Биоразнообразие экосистем Внутренней Азии» (Улан-Удэ, 2006).

Публикации. По теме диссертации, включая тезисы, опубликовано 14 работ.

Объем работы. Диссертация включает 9 глав и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов исследования и их обсуждения, выводов, списка литературы (80 отечественных и 111 зарубежных источников) и приложения. Работа изложена на 130 страницах машинописного текста, содержит 22 таблицы и иллюстрирована 29 рисунками и фотографиями.

Благодарности Автор выражает глубокую признательность научному руководителю д.б.н., проф. Б.Б. Намсараеву и сотрудникам Лаборатории микробиологии ИОЭБ СО РАН, научному консультанту д.б.н. Я.Е. Дунаевскому, д.б.н., проф. А.Л. Степанову, родным и близким.

Диссертационная работа выполнена при финансовой поддержке грантов: РФФИ 05-04-97215р_байкал_а; Президиума РАН «Происхождение и эволюция биосферы»; МО РФ № РНП. 2.1.1. НОЦ «Байкал»; Президиума СО РАН №24.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1.1. Объекты исследования

Объектами явились 10 термальных щелочных гидротерм Байкальского региона: Горячинск, Алла, Гарга, Кучигер, Уро, Сея, Умхей, Котельниковский, Змеиный, Хакусы. В газовом составе воды источников содержится до 98-99% молекулярного азота (Борисенко, Замана, 1978).

Объектами более детального рассмотрения процессов круговорота азота явились гидротермы Алла, Кучигер и Горячинск. Источник Алла и Кучигер находятся в Баргузинской долине (Северное Прибайкалье). Источник Горячинск расположен на юго-восточном побережье озера Байкал, где станция Г1 - излив источника, единственное место, которое характеризуется обильными обрастаниями циано-бактериальных матов. Далее по ручью, до станции Г3 сохраняются физико-химические параметры источника, после начинается постепенное снижение температуры, pH и изменение других химических показателей. Станция Г4 - проточный пруд. Станция Г5 расположена в месте смешения естественной воды источника со сточными водами прошедшими очистную обработку. Далее ручей протекает через залесенную местность и втекает в озеро Байкал - станция Г-6.

1.2. Методы исследования

Гидрохимический анализ воды был выполнен по общепринятым методикам. Температуру измеряли сенсорным электротермометром Prima (Португалия), pH определяли потенциометрически при помощи портативного pH-метра (pHep2, Португалия). Для определения окислительно-восстановительного потенциала использовали портативный измеритель redox-потенциала ORP (Португалия). Минерализацию воды определяли при помощи портативного тестер-кондуктометра TDS-4 (Сингапур).

Кислород в воде источника определяли методом Винклера (Резников и др., 1970). Концентрацию сульфида определяли колориметрически с пара-фенилендиамином на полевом спектрофотометре ПФЭК-П-2 (Trüper, Schlegel, 1964). Содержания карбонатов и гидрокарбонатов определяли титрованием (Резников и др., 1970). Концентрацию белка определяли по методу Брэдфорд (Досон и др., 1991), содержание органического вещества – по методу Тюрина в модификации Никитина (Аринушкина, 1979). Концентрацию общего азота определяли по Кьельдалю, минеральных форм азота - колориметрически (Аринушкина, 1979) и фотометрически (Лурье, 1984).

Пробы грунтов, микробных матов и растительных остатков для микробиологического исследования отбирали в стерильную посуду. Общую численность микроорганизмов в илах определяли путем подсчета бактерий на мембранных ультрафильтрах (Романенко, Кузнецов, 1974) с диаметром пор 0,23 мкм (фирма Сынпор).

Численность азотфиксирующих, аммонифицирующих, денитрифицирующих и нитрифицирующих бактерий в образцах ила определяли путем посева на селективные питательные среды с учетом температуры и pH *in situ* методом десятикратных разведений. Значения pH среды доводили карбонатно-гидрокарбонатным буфером. Биохимические свойства бактерий, удельную скорость роста, численность бактерий определяли общепринятыми методами (Методы., 1984). Молекулярно-генетические анализы выделенных штаммов проводили на коммерческих условиях. Транслированные аминокислотные последовательности сравнивали с последовательностями из Gen Bank, используя программы NCBI BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>).

Определение внеклеточной протеазной активности в экстрактах природных образцов на основе фосфатного буфера (рН 7) и в культуральной жидкости проводили по методу Эрлангера с соавт. (Erlanger et.al., 1961), используя 5 мМ синтетические субстраты N-бензоил-L-аргинил-p-нитроанилид (БАПА), карбобензоксип-аланил-аланил-лейцил-p-нитроанилид (КААЛП), пироглутамил-аланил-аланил-лейцил-p-нитроанилид (ГААЛП) а также с помощью тринитрофенилирования, используя 1%-ный белковый субстрат желатин (рН 8). Инкубировали в течение 1, 12 и 24 часов при температуре 37⁰С, с последующим спектрофотометрическим определением активности при 410 нм. За единицу ферментативной активности принимали количество фермента в исследуемом образце, которое расщепляет 1 нмоль продукта в указанных условиях инкубации за 1 минуту. Для выяснения природы функциональных групп активного центра штаммов к раствору фермента добавляли раствор соответствующего ингибитора, инкубировали 40 минут при температуре 37⁰С, затем добавляли раствор субстрата и определяли активность, как указано выше. В работе использовались ингибиторы металлопротеаз – этилендиаминтетраацетат Na (ЭДТА), цистеиновых протеаз - иодацетамид (ИАА) и сериновых протеаз – фенилметилсульфонилфторид (ФМСФ). Для определения оптимума рН активности исследуемых протеиназ по отношению к синтетическим субстратам были использованы цитрат-фосфатные, фосфатные, гидрокарбонатные буферы (Досон и др., 1991) в диапазоне рН 2-11. Температурный оптимум ферментов определяли, измеряя их активность после 5-минутной инкубации при температурах от 20-80⁰С.

Скорости деструкции белка и целлюлозы были измерены аппликационным методом (Мишустин, Петрова, 1987).

Интенсивности процессов дыхания, азотфиксации и денитрификации измерены газохроматографически (Методы..., 2002). Анализ газов (С₂Н₄, N₂O и СО₂) проводили на газовых хроматографах Chrom-41 и М-3700/4 (Россия). Общее время инкубации составляло 1–2 часа при определении эмиссии СО₂, и 12–48 часов при определении эмиссии N₂O. Определение активности денитрификации и азотфиксации проводили в присутствии ацетилен, который вводили во внутренний объем изолятора (10% от объема камеры). Потенциальную (субстрат-индуцированную) активность дыхания и фиксации молекулярного азота, интенсивность эмиссии закиси азота определяли после обогащения образцов донных осадков соответствующими субстратами (Методы..., 1991). Интенсивность процессов нитрификации изучали согласно Кузнецову (1970).

Определение интенсивности бактериальных процессов и химических показателей в образцах илов проводили в нескольких повторностях. Статистическая обработка данных выполнена стандартными методами по Плохинскому Н.А. (1961); Ашмарину И.П., Воробьеву А.А. (1962).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

2.1. Физико-химическая характеристика исследуемых термальных источников Прибайкалья

Для исследования были отобраны пробы воды, илов, микробных матов и растительных остатков из гидротерм: Горячинск, Алла, Гарга, Кучигер, Уро, Сея, Умхей, Котельниковский, Змеиный, Хакусы. Температура воды

на выходах термальных источников варьировала в широких пределах (45,5 - 76,2°C). Наиболее высокотемпературными были источники Уро (69,9°C), Котельниковский (71,0 °C), Гарга (72,5 °C), Алла (76,2 °C). Воды имели щелочную реакцию, значение рН варьировало от 7,6 до 9,9. Температура и рН в термальных водах снижалась по мере удаления от излива.

Максимальные концентрации сероводорода были зафиксированы в источниках Кучигер (23 мг/л) и Умхей (33 мг/л). В гидротермах отмечены низкие значения окислительно-восстановительного потенциала (до +103 Мв). Концентрация сероводорода по ручью уменьшалась, концентрация кислорода и значения Eh увеличивались.

Содержание гидрокарбонатов в воде исследуемых проб достигало 167,7 мг/л. Для источников характерна низкая минерализация, которая была в пределах от 0,15 до 0,8 мг/л.

Источник Кучигер, расположенный в болотистой местности, содержал до 19,2% органического углерода. Наименьшее количество органического углерода 0,3 - 0,4% определено в источнике Алла, выходы которого приурочены к каменистой местности. Количество белка в исследуемых пробах составляло от 0,36 (ист. Алла) до 0,83 мг/мл (ист. Гарга). В целом концентрация органического вещества в матах и растительных остатках была выше, чем в илах.

Общее количество азота в илах источников варьировало от 0,09 до 2,77 %. Максимальное количество аммонийного азота равно 2,34 мг/100г определено в источнике Кучигер, минимальное – 0,78 мг/100г в источнике Горячинск. Содержание нитритного и нитратного азота в некоторых пробах илов было ниже предела чувствительности прибора. Максимальные концентрации нитритного и нитратного азота были определены в источнике Кучигер и достигали 0,13 мг/100г.

2.2. Сезонные изменения условий среды в источнике Горячинск

Максимальная температура воды (51,5 °C) источника на изливе (ст. Г1) зафиксирована зимой. В летнее время температура снижается до 47 – 48,5 °C. Вниз по ручью наблюдается постепенное уменьшение температуры воды. Летом температура воды на станциях Г5 и Г6 составляет 25 и 18,7 °C, соответственно. Значения температуры воды на станциях Г4, Г5 и Г6 следовали изменениям температуры воздуха. Максимальное значение рН равно 9,0 отмечено на станции Г1 и в течение года ее величина держится приблизительно на одном уровне. Далее по течению отмечено постепенное понижение величины рН до 7,2 и 6,7 (ст. Г6).

Концентрация кислорода в термальном источнике Горячинск увеличивается по ручью и в среднем составляет 1,1 - 4,2 мг/л. В летний период времени на изливе источника отмечено увеличение содержания растворенного кислорода в воде. Максимальное содержание сероводорода в источнике отмечено осенью на станции Г3 в количестве

1,22-1,33 мг/л (рис.1).
 карбонатов в источнике было

По концентрации гидрокарбонатов и отмечено, что в точках максимума гидрокарбонатов наблюдается минимум карбонатов и наоборот. В течение года максимальное количество карбонатов было обнаружено в конце зимы, максимальное количество гидрокарбонатов – летом.

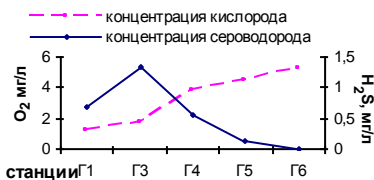


Рис.1. Концентрация O₂ и H₂S по ручью в источнике Горячинск.

Определение динамики подвижных форм азота в илах выявило разное их содержание по сезонам (рис. 2). Максимальное содержание аммонийного азота в илах источника Горячинск было

определено летом, минимальное - весной. В то же время весной отмечено увеличение нитратного азота почти вдвое по сравнению с осенними показателями. Наименьшее количество нитритного азота было определено летом.

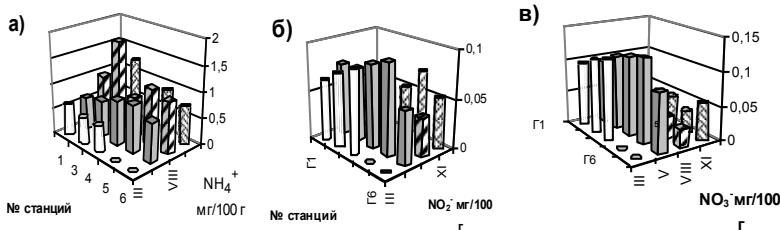


Рис. 2. Сезонная динамика подвижных форм азота: а) аммонийный, б) нитритный, в) нитратный в илах источника Горячинск.

Время отбора проб: III – 6 марта, V – 25 мая, VIII - 27 августа, XI - 2 ноября.

Соотношение $C_{орг} / N_{общ}$ в илах варьировало в пределах от 8 до 14 в течение года. На станциях Г1, Г4, Г6 соотношение $C_{орг} / N_{общ}$ с октября по май держалось на одном уровне в пределах 10-12, и только в летнее время отмечено небольшое снижение на фоне повышенного содержания в источнике аммонийного азота.

Концентрации кислорода, карбонатов, гидрокарбонатов, подвижных форм азота в источнике подвержены внутригодовой динамике. При этом основные факторы среды, такие как температура, рН и минерализация, остаются относительно постоянными.

3.1. Численность функциональных групп бактерий, участвующих в круговороте азота в щелочных гидротермах Прибайкалья

Во всех исследуемых пробах была определена численность азотфиксаторов, аммонификаторов (протеолитиков), нитрификаторов и денитрификаторов. Ключевую роль в биологическом круговороте азота

играют микроорганизмы, фиксирующие молекулярный азот. Численность азотфиксирующих бактерий колебалась от $2,0 \times 10^2$ до $5,5 \times 10^7$ кл/мл. Максимальная численность азотфиксаторов наблюдалась в пробах источников Горячинск, Алла, Котельниковский. Многократный анализ показал, что при количестве аммония до 1,0 мг/100г ила корреляции содержания аммония с численностью азотфиксаторов не обнаружено, а при повышенном содержании аммония ($>1,0$ мг/100г) наблюдается обратная зависимость ($r_{cp} = -0,71$). Поэтому невысокая численность азотфиксаторов в источниках Кучигер и Сея, вероятнее всего, связана с повышенным содержанием аммония. В то же время именно в этих источниках была определена наиболее высокая численность бактерий, участвующих в минерализации белков - аммонификаторов. Численность аммонифицирующих бактерий в изученных гидротермах составляет от $1,3 \times 10^5$ до $7,0 \times 10^8$ кл/мл и коррелирует с содержанием аммония ($r_{cp} = 0,65$). Наибольшее количество аммонификаторов было выявлено в матах и растительных остатках. Количество нитрификаторов I и II фазы в илах источников Горячинск, Алла и Гарга достигало: аммонийоксиляющих бактерий – $1,3 \times 10^6$ кл/мл, нитритоксиляющих бактерий – $4,7 \times 10^5$ кл/мл. Обнаружены корреляции численностей нитрификаторов I и II фазы с содержанием аммония ($r_{cp} = 0,43$) и нитратов ($r_{cp} = 0,64$), соответственно. Наибольшее количество бактерий – денитрификаторов ($6,3 \times 10^5$ кл/мл) наблюдалось в илах источников Кучигер, Сея и Змеиный. Минимальное количество ($1,7 \times 10^1$ кл/мл) было зафиксировано в пробах источников Алла и Горячинск. Следует отметить, что была установлена линейная зависимость между численностью денитрификаторов с нитратами ($r_{cp} = 0,63$), с нитритами ($r_{cp} = 0,51$) и аммонием ($r_{cp} = 0,49$). Корреляционной связи численности бактерий цикла азота с температурой, pH и минерализацией в исследуемых источниках не установлено.

В источнике Горячинск было изучено вертикальное распределение бактерий по глубине грунта. На станции Г4 максимальная численность бактерий цикла азота определена в поверхностном слое ила (до 2 см) и в придонной воде. На стациях Г1 и Г6 максимальное количество азотфиксаторов и денитрификаторов находится в слое 2-5 см, аммонификаторов – в слое 2-10 см. Нитрифицирующие бактерии были обнаружены только на поверхности (до 2 см), в слое 2-5 см их численность не превышала $0,5 \times 10^1$ кл/мл. На глубине 20-30 см выявлено значительное уменьшение численности азотфиксаторов, аммонификаторов и денитрификаторов. Отмечена прямая зависимость ($r_{cp} = 0,87$) между количеством белоксодержащих соединений с численностью аммонификаторов, характерная для всех изученных слоев ила.

3.2. Сезонная численность бактерий в источнике Горячинск

Наименьшая общая численность микроорганизмов (ОЧМ) отмечена в ноябре - $1,3^5 \times 10^6$ кл /мл, наибольшая - в мае ($8,1 \times 10^8$ кл /мл). Наибольшее количество азотфиксаторов $4,3 \times 10^7$ кл /мл обнаружено в феврале, наименьшее ($1,3 \times 10^2$ кл /мл) – в августе, что определяется количеством аммонийного азота в илах. Максимальная численность аммонификаторов была отмечена весной, минимальная – летом и осенью. Численность денитрификаторов варьировала от $6,0 \times 10^1$ до $4,7 \times 10^5$ кл/мл, нитрификаторов от $3,0 \times 10^1$ до $1,3 \times 10^6$ кл/мл (рис. 3). Повышение количества бактерий в феврале происходит за счет накопления за зимний период легкоусвояемых источников углерода и энергии.

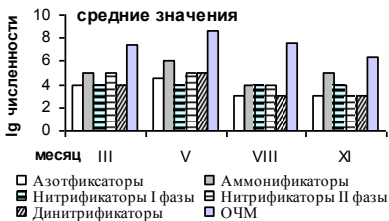


Рис.3. Сезонная динамика численности групп бактерий в илах источника Горячинск

Уменьшение количества азотфиксаторов летом и осенью определяется увеличением аммонийного азота в этот период. Летнее снижение концентрации нитратов и нитритов в илах при низком содержании нитритоксилирующих и денитрифицирующих бактерий обусловлено использованием легкоусвояемых форм азота

цианобактериальным сообществом, активно развивающимся в это время. Изменение структуры микробного сообщества в гидротерме связано с сезонными колебаниями физико-химических параметров среды и содержанием минеральных форм азота, которые накапливаются за счет поступления из прибрежной зоны и функционирования биоты.

Детальное изучение зависимости физико-химических условий и численности бактерий в источнике Горячинск позволило установить, что численности азотфиксаторов ($r_{cp} = -0,36$), аэробных аммонификаторов ($r_{cp} = -0,44$) и нитрификаторов ($r_{cp} = -0,61$) отрицательно коррелируют с концентрацией сероводорода. Корреляция содержания сероводорода с численностями денитрификаторов и анаэробных аммонификаторов отсутствует. Содержание кислорода положительно коррелирует с численностью нитрификаторов ($r_{cp} = 0,73$), отрицательно - с численностью денитрификаторов ($r_{cp} = -0,34$); с численностью азотфиксаторов и аммонификаторов корреляции не обнаружено.

Таким образом, в источниках основными факторами, влияющими на численность бактерий круговорота азота, являются: содержание минеральных форм азота, качественный и количественный состав

органических веществ, содержание сероводорода и кислорода в придонной воде.

4.1. Эмиссия CO₂ в илах источников Прибайкалья

Значения динамики дыхания варьировали в пределах от 0,07 мкг С-CO₂/г в час до 0,96 мкг С-CO₂/г в час. Максимальные значения наблюдались в местах с повышенным содержанием органических веществ. Высокие значения биологической активности илов выявлены в источнике Кучигер, величина скорости эмиссии CO₂ составила 0,96 мкг С-CO₂/г ч и 0,73 мкг С-CO₂/г ч соответственно. Высокая эмиссия диоксида углерода подтверждается высокими величинами скорости минерализации илов в источнике Кучигер, скорость деструкции белоксодержащих соединений достигала 2,43% в сутки, целлюлозы - 1,2 % в сутки. Самый низкий показатель дыхания обнаружен в пробах источника Алла (Ал 9/4) и Горячинск. Корреляция интенсивности дыхания илов с содержанием С_{орг} в илах источников составило r_{ср}= 0,82.

Исследование динамики дыхания за период осень – весна в илах источника Горячинск показало, что величина потока диоксида углерода изменялась от 0,073 до 0,281 мкг С-CO₂/г ч в ноябре и от 0,276 до 0,629 мкг С-CO₂/г ч в марте. Показатели потенциальной интенсивности дыхания в исследованных образцах ила на 1-2 порядка выше актуальных.

4.2. Денитрифицирующая и азотфиксирующая активность в илах источников Прибайкалья

Т°С: 60 49 24 47 34 41 45 23 25 18
рН: 9,9 9,9 9,6 9,9 9,4 9,4 8,5 7,6 8,1 6,7

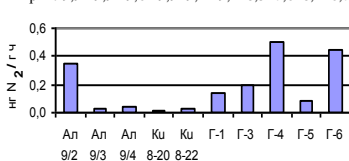


Рис. 4. Скорость азотфиксации в гидротермах Алла, Кучигер и Горячинск.

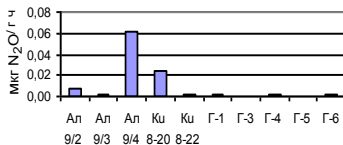


Рис. 5. Скорость денитрификации в гидротермах Алла, Кучигер и Горячинск.

Примечание: значения температуры и рН на станциях источников см. на рис. 4.

Значения азотфиксирующей активности в минеральных источниках варьировали от 0,002 нг N₂/г ч до 0,499 нг N₂/г ч (рис.4). Относительно высокие значения выявлены в гидротерме Горячинск (Г-4, Г-6). Здесь азотфиксация была равна 0,499 нг N₂/г ч и 0,447 нг N₂/г ч. Наиболее низкие значения были установлены в илах источников Алла (Ал 9/3) и Кучигер (Ку 8-20).

Оценка процесса денитрификации в илах минеральных источников показала, что активность была в пределах 0,024 - 0,661 нг N₂O/г ч. Максимальное выделение закиси азота выявлено в термальном источнике Алла на станции Ал 9/4 (0,661 мкг N₂O/ г ч).

Наиболее низкие показатели денитрифицирующей активности

установлены в илах термального источника Горячинск. Активность денитрификации в этом источнике не превышала 0,035 нг N₂O/г ч (рис.5).

Сезонная динамика процессов азотфиксации, нитрификации и денитрификации в илах источника Горячинск.

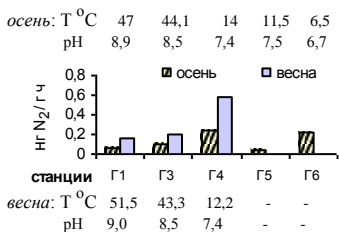


Рис.6. Сезонная динамика азотфиксирующей активности в илах

Результаты межсезонных исследований процесса азотфиксации в илах показали увеличение нитрогеназной активности весной до 0,584 нг N₂/г ч (рис. 6). Значения скорости азотфиксации коррелируют с сезонной динамикой численности азотфиксирующих бактерий. Весной численность диазотрофов достигала максимума - 10 млн кл./мл. На станциях, где были определены максимальные величины

азотфиксирующей активности, величина соотношения C/N варьировала в пределах 10-12, что является благоприятным условием для процесса азотфиксации. Эти результаты согласуются с данными исследований в других биотопах (Саралов и др., 1982, Новиков и др., 2004). Таким образом, наиболее важными регулируемыми факторами активности азотфиксации в различных экосистемах является обеспеченность усвояемым азотом и качественный состав органического вещества.

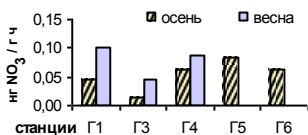


Рис. 7. Сезонная динамика нитрифицирующей активности в илах ист. Горячинск по ручью. Примечание: значения температуры и pH осенью и весной на станциях см. на рис. 6.

Изучение нитрифицирующей активности бактерий в илах выявило ее низкую скорость, которая варьировала в пределах от 0,3 до 1,5 нг NO₃/г в сутки – осенью и 1,1-2,4 нг NO₃/г в сутки – весной (рис. 7). Численность нитрифицирующих бактерий по ручью источника составила: осенью от 1,7×10³ до 5,0×10⁴кл./мл, весной – увеличилась на порядок.

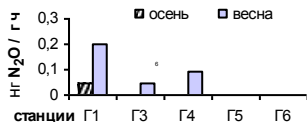


Рис. 8. Сезонная динамика денитрифицирующей активности в илах ист. Горячинск. Примечание: значения температуры и pH осенью и весной на станциях см. на рис. 6.

Определение активности денитрификации в разные сезоны, также как и активности процесса нитрификации, не выявило существенных межсезонных различий (рис. 8). В осенних образцах илов активность денитрификации была ниже предела чувствительности прибора. Отсутствие денитрифицирующей активности

микроорганизмов в илах источника Горячинск, объясняется низкой

нитрифицирующей активностью и, как следствие, низким содержанием нитратов. Незначительное увеличение скорости денитрификации в весенних образцах илов коррелирует с численностью денитрификаторов. Денитрифицирующей активности бактерий в весенний период способствуют более благоприятные физико-химические условия источника, в частности, увеличение нитратов почти в 2 раза и снижение содержания растворенного кислорода в воде.

Потенциальная активность процессов азотфиксации и денитрификации в образцах ила после обогащения глюкозой увеличилась в 3-20 раз. В этих условиях наибольшая активность азотфиксации (0,23 мкг N₂ /г ч) и денитрификации (0,39 мкг N₂O/г ч) была зафиксирована при температуре 51,5 °С и значении рН 9,0 (ст. Г1), хотя актуальная азотфиксирующая активность бактерий в илах на станции Г1 была низкой. Вероятно, это связано с активной нитрогеназной деятельностью цианобактерий (*Anabaena. variabilis*, *Calotrix termalis*, *Gloeocapsa punctata*, *Gl. minuta*), обнаруженных на той же станции, и подавление ими бактериальной азотфиксирующей активности.

На станции Г3 выявлена низкая активность процессов цикла азота. Это связано с токсичным воздействием сероводорода (1,33 мг/мл) и, как следствие, ингибированием процессов.

Таким образом, в щелочной гидротерме Горячинск нитрогеназная активность может проявляться в широком диапазоне температур от 22 до 51°С и значениях рН от 7,6 до 9,0. Основными факторами, определяющими интенсивность биологических процессов круговорота азота в исследуемой гидротерме, являются: наличие органического вещества, минеральных форм азота, концентрация сероводорода и кислородный режим.

5. Внеклеточная протолитическая активность в нативных образцах термальных источников Прибайкалья

Образцы микробных матов, растительных остатков и илов были отобраны из точек отбора в гидротермах, которые характеризовались различными значениями температур 18,7 – 69,0°С (табл. 1).

Таблица 1

Типы проб, места отбора и температура

Источник	№	Точки отбора и температура отбора (°С)					
		1	2	3	4	5	6
Гор-к	1	м.м. - 49,0	ил - 49,0	ил - 45,0	ил - 22,7	ил - 25,0	ил - 18,7
Котель-й	2	м.м. - 65,3	м.м. - 48,0	ил - 48,0	ил - 45,5	ил - 39,0	ил - 32,0
Змеиный	4	м.м. - 45,5	ил - 45,5	-	-	-	-
Хакусы	5	м.м. - 46,0	ил - 46,0	-	-	-	-
Гарга	6	м.м. - 66,4	р.о. - 57,4	ил - 49,8	ил - 42,0	м.м. - 42,0	ил - 33,5
Сея	7	ил - 49,8	м.м. - 46,5	ил - 46,5	м.м. - 34,0	ил - 31,4	ил - 31,0
Уро	8	м.м. - 69,0	ил - 64,0	м.м. - 52,1	м.м. - 44,2	ил - 44,2	ил - 33,8
Алла	9	м.м. - 65,2	ил - 60,0	ил - 49,0	ил - 49,0	ил - 24,0	ил - 23,5
Кучигер	10	ил - 47,2	м.м. - 45,9	р.о. - 43,0	м.м. - 41,0	ил - 41,0	
Умхей	11	р.о. - 47,6	р.о. - 45,7	м.м. - 41,7	ил - 41,7	ил - 39,0	

Гор-к - Горячинск, Котель-й – Котельниковский.

м.м. – микробный мат; р.о. – растительные остатки; «-» - пробы не отобраны

Скорость бактериального разложения белоксодержащих соединений в исследуемых источниках составила от 1,25 до 2,43%, максимальные скорости деструкции отмечены в источниках Кучигер (2,43%) и Умхей (2,14%).

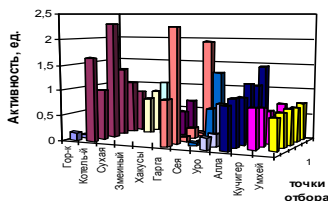


Рис.9. Протеолитическая активность по БАПА.

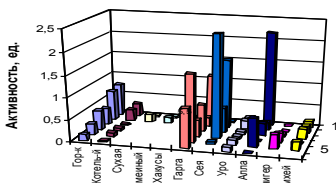


Рис.10. Протеолитическая активность

составляли микробные маты, где активность была в 6-7 раз выше, чем в илах. Относительно постоянные физико-химические условия, качественный и количественный состав органических веществ в циано-бактериальных матах способствует активному развитию в них различных бактерий - деструкторов.

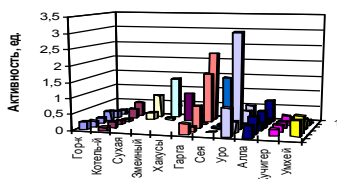


Рис.11. Протеолитическая активность по ГААЛП

только в микробных матах – 1,46 ед. (точка 2) и 1,31 (точка 1), соответственно. Источники Хакусы, Алла и Умхей характеризовались средними значениями активности - от 0,19 до 0,9 ед. Наименьшей активностью по субстрату КААЛП обладали образцы из источников

Максимальная внеклеточная протеолитическая активность по субстрату БАПА (рис. 9) зафиксирована в илах источника Котельниковский (1,65 - 2,29 ед.) и циано-бактериальных матах источника Гарга (1,93 - 2,27 ед.). Для источника Алла характерно увеличение продукции трипсиноподобных протеаз при повышении температуры. Максимальная активность (1,43 ед.) отмечена при температуре 65,2°С. В образцах источников Змеиный, Хакусы, Кучигер и Умхей значения протеазной активности по БАПА составили от 0,48 до 1,07 ед. Образцы источников Сея, Горячинск, Уро характеризовались низкими значениями активности. Исключение

Максимальные значения протеазной активности по субстрату КАЛЛП (рис. 10) в источниках Уро, Гарга, Сея и Змеиный были выявлены в образцах микробных матов. Активность образцов циано-бактериальных матов превышает активность илов в 3 – 5 раз. В источниках Сея и Змеиный активность по данному субстрату проявилась

Котельниковский (0,07 – 0,19), Горячинск (0,154 – 0,29) и Кучигер (0,15 – 0,30).

Наибольшие активности по ГААЛП (рис. 11) обнаружены в циано-бактериальных матах источников Сея (2,36 ед.) и Алла (2,18 ед.). Также высокую активность по этому субстрату проявляют термальные источники Гарга (0,20 – 1,56 ед.) и Горячинск (0,14 – 0,75 ед.). В источнике Горячинск субтилизиноподобная активность возрастает с повышением температуры. Протеазная активность по субстрату ГААЛП исследуемых образцов из источников Котельниковский, Змеиный, Хакусы, Уро, Кучигер и Умхей либо отсутствовала, либо характеризовалась низкими значениями.

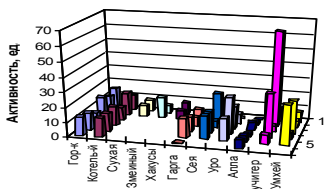


Рис. 12. Протеолитическая активность по желатину

Умхей (4,55 - 27,42 ед.) и Уро (7,15 – 26,03 ед.). Пробы из источника Алла характеризовались незначительной активностью по желатину (1,30 - 6,06 ед.).

Наиболее высокая общая внеклеточная протеолитическая активность (рис. 12), определенная методом тринитрофенилирования, выявлена в источнике Кучигер - от 4,54 до 9,09 ед. в илах и 30,30 - 35,15 ед. в циано – бактериальных матах. Активное разложение желатина было отмечено в образцах источников

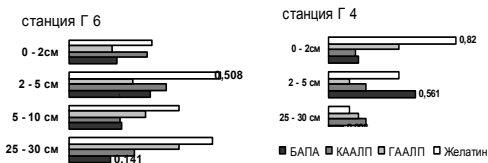


Рис. 13. Вертикальное распределение протеолитической активности в илах ист. Горячинск.

Умхей (4,55 - 27,42 ед.) и Уро (7,15 – 26,03 ед.). Пробы из источника Алла характеризовались незначительной активностью по желатину (1,30 - 6,06 ед.).

Исследованные по слоям илы показали высокую ферментативную активность (рис. 13). На станции Г6 на глубине 25-30см, при минимальном количестве бактерий также наблюдалась высокая протеазная активность. Результаты данных исследований показывают, что в деструкции белоксодержащих соединений в исследуемых илах в основном участвуют сериновые протеазы субтилизиноподобного типа. Определение корреляции в илах показало прямую зависимость протеолитической активности от содержания органических веществ $r_{\text{ср}} = 0,91$.

Полученные результаты позволяют заключить, что микробное сообщество щелочных термальных источников обладает широким спектром внеклеточных протеаз и характеризуется высокой вариабельностью в распределении протеазной активности по субстратам.

Выявлено, что на протеазную активность оказывают существенное влияние тип субстрата, физико-химические условия источников и их специфическое микробное сообщество. Наибольшие значения протеазной активности в нативных образцах характерны для микробных матов. Проведенные исследования показали высокую степень участия внеклеточных ферментатов в деструкции органического вещества в термальных источниках.

6. Выделение и описание бактерий участвующих в круговороте азота в гидротермах Прибайкалья

Азотфиксирующие бактерии. Для оценки нитрогеназной активности бактерий было отобрано 8 наиболее активно растущих изолята: штаммы АТ2 и АТ3 с диапазоном роста от 30 до 55⁰С (оптимум 45-50⁰С) и рН от 6,5 до 10,0 (оптимум рН 8,7-9,2) и 6 штаммов (А1, А2, А3, А4, А5, А6) с ростом в пределах от 15 до 40⁰С (оптимумы 25 - 35⁰С) и рН от 5,0 до 9,2 (оптимумы 7,1 - 8,2). Полученные изоляты используют широкий ряд сахаров. По морфо-биохимическим признакам азотфиксирующие изоляты были отнесены к представителям родов *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Clostridium*.

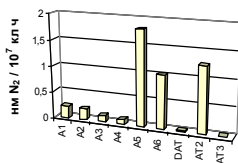


Рис.14. Нитрогеназная активность штаммов

Интенсивность фиксации молекулярного азота выделенных штаммов составляла от 0,017 до 1,81 нм N₂/10⁷кл ч. (рис.14). Максимальное количество фиксированного азота было зарегистрировано у штаммов А5 (1,81 нм N₂/10⁷кл ч) и АТ2 (1,26 нм N₂/10⁷кл ч). По морфо-биохимическим признакам штамм А5 (источник Алла) был отнесен к представителю рода *Clostridium*.

Штамм АТ2, выделенный из щелочного термального источника Горячинск (Г 1) при росте на твердой среде образует колонии 0,2-1,5 мм в диаметре, белого цвета. Клетки – грамположительные, спорообразующие, подвижные прямые палочки 0,3-0,5х 1,1-2,5 мкм. Факультативный анаэроб. При анаэробном росте сбраживает глюкозу, рамнозу, ксилозу и дульцит. Умеренный термотолерантный алкалофил. Рост в пределах 30-55⁰С с оптимумом 45⁰С и в области рН 6,5-10 с оптимумом рН 8,7. На основании данных частичного секвенирования генов 16S рРНК исследуемый штамм АТ2 показал сходство 99,5% с *Anoxybacillus pushchinoensis* (рис. 16).

Денитрифицирующие бактерии. В накопительных культурах, полученных на среде Гильята при различных значениях температуры и рН, в основном присутствовали палочки и только при инкубации культур при 50⁰С и рН 9,0 – 9,3 в среде были обнаружены еще очень мелкие клетки - предположительно археи, которых не удалось выделить в

отдельную культуру. Рост денитрификаторов регистрировался с активным образованием газов.

Для дальнейших исследований были отобраны штаммы DM и DAT. Изолят DAT, выделенный из источника Алла, был отнесен к умеренным алкалотермофилам. Культура развивается в пределах 30 - 55⁰С с оптимумом 45⁰С и в области рН 6,0 - 9,2 с оптимумом 9,0. Штамм DM (Горячинск, станция Г4) показал активный рост в пределах от 15 до 40⁰С с оптимумом 25⁰С и при рН среды от 6,0 до 8,2 с оптимумом 7,5.

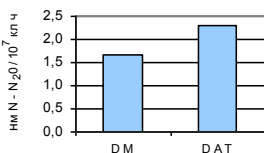


Рис.15. Денитрифицирующая активность штаммов DM и DAT

Штаммы обладали высокой денитрифицирующей активностью: DAT – 2,28 нм N-N₂O /10⁷ кл ч и DM - 1,68 нм N-N₂O /10⁷ кл ч (рис.15). Выделенные штаммы денитрификаторов были проверены на способность фиксировать молекулярный азот. Незначительная нитрогеназная активность равная 0,03 нм N₂/10⁷кл ч была обнаружена у термотолерантного алкалофильного штамма DAT (рис.16). Грамположительный, спорообразующий штамм DAT, представленный палочками 0,3-0,8 x 1,5-3,5 мкм, из широкого ряда используемых им углеводов активнее развивается на манните. Результаты анализа сиквенса 16S рРНК (500 пар нуклеотидов) показали, что штамм принадлежит к роду *Bacillus*. Коэффициент сходства составил 99,7% с *B. licheniformis* (рис. 16).

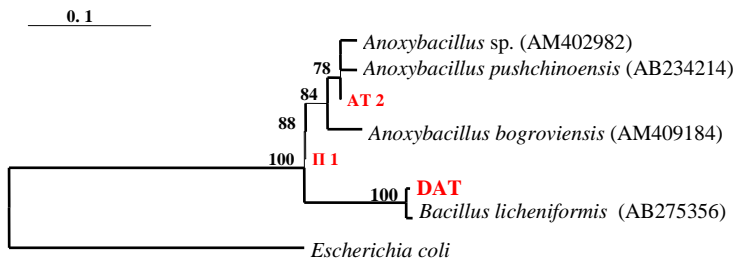


Рис.16. Филогенетическое дерево бацилл, показывающее положение штаммов AT 2, DAT, П 1 в системе порядка термофильных *Bacillus*. В качестве «внешней группы» использована нуклеотидная последовательность гена 16S рРНК *E. coli*.

Аммонифицирующие бактерии. Из накопительных культур было выделено 4 штамма (П1, П2, П3, П4), спорообразующих аэробных гетеротрофных бактерий. Клетки имели форму крупных прямых палочек. На твердых средах образовывали колонии - от 1 до 4 мм желтого или бежевого цвета. Все штаммы являются термофилами с диапазоном роста 35 - 70⁰С с оптимумами 45-65⁰С и рН 6,0 - 10,2 с оптимумами 8,0-8,5.

Проведенные исследования показали, что все культуры обладают высокой внеклеточной протеолитической активностью. По субстрату БАПА максимальная активность через 12 часов инкубирования проб, равная 1,71 ед./мг, обнаружена в культуре П3. На субстрате КААЛП активность практически отсутствовала, кроме культуры П1 (1,32 ед./мг). Максимальная активность на субстрате ГААЛП для субтилизиноподобных протеаз была зафиксирована в культуре П2, равная 3,76 ед./мг. Все выделенные культуры показали высокую активность по желатину от 2,46 до 2,61 ед./мг. Внеклеточная протеолитическая активность 24-часовых культур была в 2-3 раза выше 12-часовых.

Штамм П1 показал самый высокий оптимум температуры (60°C), pH (8,5) и явился активным продуцентом внеклеточных протеаз. На основании данных неполного секвенирования генов 16S рРНК штамм П1 имеет сходство 99,3% с представителями рода бацилл *Anoxybacillus pushchinoensis* и *Anoxybacillus bogroviensis* (рис. 16).

Анализ субстратной специфичности и ингибиторный анализ показали, что фермент секретируемый штаммом П1 активен по отношению к нитроанилидным субстратам трипсиноподобных протеаз. Фермент имеет оптимум pH 10,5 и стабилен в интервале pH от 6 до 11 (рис. 17 а). Температурный оптимум протеазы около 65°C (рис. 17б).

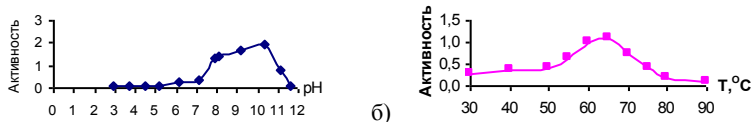


Рис. 17. Динамика активности внеклеточной сериновой протеазы, секретируемой штаммом П1: а) при различных значениях pH; б) при различных значениях температуры

Штамм П1 является активным продуцентом внеклеточных щелочных протеолитических ферментов, относящихся к классу сериновых протеаз, которые активно секретируются при высоких температурах, что позволяет отнести их к алкалотермофильному виду.

Аммонийокисляющие и нитритокисляющие бактерии

I фаза нитрификации Первоначально, аммонийокисляющие алкалотермофильные бактерии, выросшие при температуре 48 °C и pH 8,5, показали активный рост, но при дальнейших пересевах культура была утрачена. В ходе эксперимента отмечалось сильное подкисление среды. Максимальная скорость окисления аммония накопительной культурой определена на 5 сутки в количестве 0,71 мМ NH₄⁺/сутки. На 6 сутки следов аммония в среде не обнаружено. В накопительной культуре присутствовало 2 разных морфотипа бактерий, активно окисляющих аммоний. Электронное микроскопирование бактерий не позволило определить их принадлежность к какому-либо роду известных на сегодняшний день аммонийокисляющих бактерий.

II фаза нитрификации

алкалотермофильных нитритоксилирующих бактерий показала стабильный рост в лабораторных условиях.

Результат жизнедеятельности нитритоксилирующих бактерий не оказывал влияния на значение pH в среде, он был постоянен и составлял в ходе всего эксперимента 8,5. Динамика

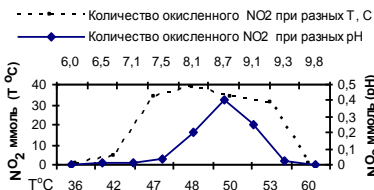


Рис. 18. *Nitrospira sp.* Скорость окисления нитритов на 3-и сутки при различных значениях температуры и pH.

Рис. 19. Ультраструктура *Nitrospira sp.* пп – периплазматическое пространство, В ПС – внеклеточная полимерная субстанция

Описан изолят, активно окисляющий нитриты с образованием нитратов при алкалотермофильных условиях среды. Температурный диапазон роста культуры отмечен от 36 до 55°C с оптимумом 48°C. Максимальная скорость потребления нитритов при 48°C отмечена на 3 сутки в количестве 0,38 мМ NO₂⁻. При определении оптимума pH было установлено, что культура окисляет нитриты в диапазоне pH среды от 6 до 9,7 с оптимумом 8,7. Максимальная скорость окисления была отмечена на 3 сутки в количестве 0,41 мМ NO₂⁻ (рис.18). На 4 сутки следов нитритов в среде не обнаружено. Присутствие нитратов в среде проверяли качественной реакцией. Микроскопирование тотальных клеток и ультратонких срезов нитритоксилирующего штамма показало, что выделенная грамотрицательная культура является представителем рода *Nitrospira* (рис. 19). Из полученных данных мы заключили, что выделенная культура *Nitrospira sp.* относится к новому алкалотермофильному виду хемолитотрофных нитритоксилирующих бактерий.

Накопительная культура показала стабильный рост в лабораторных условиях. Результат жизнедеятельности нитритоксилирующих бактерий не оказывал влияния на значение pH в среде, он был постоянен и составлял в ходе всего эксперимента 8,5. Динамика роста накопительной культуры при различных значениях pH обозначилась в области от 6,5 до 9,8. В накопительной культуре присутствовало, по крайней мере, 2 вида нитритоксилирующих бактерий с оптимумами pH 7,1 и 8,7. Определение динамики роста при различных значениях температур выявило рост культуры пределах от 36 до 60 °C. Максимальное окисление нитритов было определено на 3-и сутки при температуре 48 °C (0,92 мМ NO₂⁻/сутки) и при температуре 53 °C (0,61 мМ NO₂⁻/сутки).

ВЫВОДЫ

1. В исследованных щелочных гидротермах Прибайкалья численность азотфиксаторов, аммонификаторов, нитрификаторов и денитрификаторов составляет от $1,7 \times 10^1$ до $7,0 \times 10^8$ кл/мл. Основным регулирующим фактором сезонного изменения численности бактерий круговорота азота является содержание минеральных форм азота, качественный и количественный состав органического вещества, а также содержание сероводорода и кислорода в воде и илах.
2. Значительные скорости азотфиксации в илах источника Горячинск, равные 0,16 и 0,58 нг N_2 /г ч, определены весной при температурах 50,5 и 12,2°C, pH 9,0 и 7,4, соответственно. В илах источника Горячинск отмечены низкие скорости нитрификации и денитрификации, активность которых незначительно возрастает весной. Эмиссия CO_2 в илах источника определяется содержанием органического вещества, коэффициент корреляции составляет $r_{cp} = 0,82$.
3. Во всех исследованных гидротермах с различными значениями температуры и pH среды показана высокая протеолитическая активность нативных образцов и выделенных культур аммонификаторов, которая свидетельствует об активном участии микробного сообщества в деструкции белоксодержащих соединений.
4. Среди выделенных чистых культур бактерий азотфиксаторов, аммонификаторов и денитрификаторов доминировали представители родов *Bacillus*, способные развиваться при 30 - 70°C и pH 6-10. Азотфиксирующие изоляты обладали высокой нитрогеназной активностью - от 0,226 до 2,461 нг $N_2/10^7$ кл ч. Активность денитрификаторов достигала 2,89 нг $N-N_2O /10^7$ кл ч. Внеклеточная протеолитическая активность аммонификаторов составляла 1,54 - 3,76 ед./мг.
5. Выделены и описаны алкалотермофильные бактерии цикла азота: денитрифицирующий штамм DAT (1,34 нг $N-N_2O/10^7$ кл ч) близкородственный к *B. licheniformis*, обладающий также и нитрогеназной активностью 0,226 нг $N_2/10^7$ кл ч; аммонифицирующий штамм П1 представитель рода *Anoxybacillus* - активный продуцент внеклеточных сериновых протеаз трипсиноподобного типа с оптимумом активности фермента при 65°C и pH 10,5; нитритоксилирующий штамм *Nitrospira sp.*, с максимальной скоростью окисления нитритов при 48 °C и pH 8,7.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО МАТЕРИАЛАМ ДИССЕРТАЦИИ

1. Шагжина А.П. Внеклеточная протеазная активность в щелочных гидротермах Баргузинской долины/ А.П. Шагжина, Е.В. Лаврентьева, Б.Б. Базаржапов// Биология - наука XXI века: 8-я Пушкинская школа – конференция молодых ученых. – Пушино. 2004. – С. 164.
2. Шагжина А.П. Протеазная активность в источнике Гарга (Бурятия)/ А.П. Шагжина, Е.В. Лаврентьева, Б.Б. Базаржапов// Международная научно-практическая конференция в НГУ: сборник тезисов – Новосибирск, 2004. - С. 84.
3. Шагжина А.П. Протеазная активность в минеральном источнике Кучигер (Северо-Восточное Прибайкалье)/ Е.В. Лаврентьева, А.П. Шагжина// Экология Южной Сибири: Южносибирская научная конференция студентов и молодых ученых. – Абакан, 2004. - С. 135-136.
4. Шагжина А.П. Протеазная активность в щелочных гидротермах Прибайкалья/ А.П. Шагжина, Е.В. Лаврентьева, Б.Б. Базаржапов// Биология микроорганизмов и их научно-практическое использование: материалы Межрегиональной научно-практической конференции. – Иркутск, 2004. - С. 185-187.
5. Шагжина А.П. Ферментативная активность микроскопических грибов в щелочных гидротермах Северного Прибайкалья/ Е.В. Лаврентьева, Б.Б. Базаржапов, А.П. Шагжина, Б.Б. Намсараев// Биология микроорганизмов и их научно-практическое использование: материалы Межрегиональной научно-практической конференции. – Иркутск, 2004. - С. 154-156.
6. Шагжина А.П. Внеклеточная протеазная активность в щелочных гидротермах Баргузинской долины/ А.П. Шагжина, Е.И. Лаврентьева, Б.Б. Базаржапов, Б.Б. Намсараев// Вестник БГУ. Серия 1. Биология. Вып. 8. - Улан-Удэ, 2005. - С. 42-50.
7. Шагжина А.П. Разнообразие микроорганизмов круговорота азота в гидротермах Монголии и Забайкалья/ А.П. Шагжина, Т.Г. Банзаракцаева // Ecosystems of Mongolia and frontier areas of adjacent countries: natural resources, biodiversity and ecological prospect: International conference. – Ulaanbaatar, 2005. - P. 124-126.
8. Шагжина А.П. Разнообразие азотфиксаторов термального источника Горячинск (Бурятия)/ А.П. Шагжина, Д.Д. Балданова// Актуальные аспекты современной микробиологии: Молодежная школа-конференция ИНМИ. – М., 2005. - С. 66.
9. Шагжина А.П. Биохимическая активность источника Уро/ А.П. Шагжина, Е.И. Лаврентьева// Научный и инновационный потенциал Байкальского региона: V межрегиональная научная конференция молодых ученых. - Улан-Удэ, 2005. – С. 64.
10. Шагжина А.П. Протеазная активность микроскопических грибов в щелочных гидротермах Северного Прибайкалья/ Е.В. Лаврентьева, А.П.

Шагжина, Б.Б. Намсараев// Вестник БГУ. Серия 1. Биология. Вып. 9. - Улан-Удэ, 2006. - С. 97-103.

11. Шагжина А.П. Микробиологические исследования бактерий участвующих в круговороте азота/ Д.М. Прохоров, А.П. Шагжина// Экология Южной Сибири: Южносибирская научная конференция студентов и молодых ученых. – Абакан, 2005 – С. 142-143.
12. Шагжина А.П. Процессы азотфиксации и денитрификации в щелочном термальном источнике Горячинск/ Т.Г. Банзаракцаева, А.П. Шагжина, А.Л. Степанов, Д.Д. Бархутова// Вестник БГУ. Серия 2. Биология. Вып. 9. - Улан-Удэ, 2006. – С. 57-62.
13. Шагжина А.П. Процессы азотфиксации и денитрификации в щелочном источнике Горячинск/ Т.Г. Банзаракцаева, А.П. Шагжина, А.Л. Степанов// Биоразнообразие экосистем Внутренней Азии: тезисы Всероссийской конференции с международным участием. Т.1. - Улан-Удэ, 2006. - С. 25.
14. Шагжина А.П. Биологическая активность в щелочном гидротерме Горячинск (восточное побережье озера Байкал)/ А.П. Шагжина, Т.Г. Банзаракцаева// Актуальные аспекты современной микробиологии: Молодежная школа-конференция ИНМИ – М., 2006. – С. 34.

Подписано в печать 11.04.2007 г. Формат 60×841/16.

Тираж 100 экз. Усл. печ. л. 1.28 Заказ № 2056

Издательство Бурятского государственного университета
670000 г. Улан-Удэ, ул. Смолина, 24 а.