

*На правах рукописи*

**РАДНАГУРУЕВА Арюна Арсалановна**

**ЭКОЛОГО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА  
ГИДРОЛИТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ ТЕРМАЛЬНЫХ И  
ЩЕЛОЧНЫХ ВОДНЫХ СИСТЕМ ЗАБАЙКАЛЬЯ**

03.02.08 – экология (биологические науки)

03.02.03 – микробиология (биологические науки)

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Улан – Удэ - 2012

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте общей и экспериментальной биологии СО РАН (ФГБУН ИОЭБ СО РАН)

- Научный руководитель: кандидат биологических наук  
**Лаврентьева Елена Владимировна**
- Научный консультант: доктор биологических наук, профессор  
**Дунаевский Яков Ефимович**
- Официальные оппоненты: **Семенов Александр Михайлович** –  
доктор биологических наук, доцент, ведущий  
научный сотрудник Биологического факульте-  
та МГУ им. М.В. Ломоносова
- Буянтуева Любовь Батомункуевна** -  
кандидат биологических наук, доцент  
ФГБОУ ВПО БГУ
- Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное  
учреждение науки Институт микробиоло-  
гии им. С.Н. Виноградского РАН

Защита состоится «26» марта 2012 г. в 11.30 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) 210588

E-mail: [d21202203@mail.ru](mailto:d21202203@mail.ru)  
[aryuna\\_rg@mail.ru](mailto:aryuna_rg@mail.ru)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Бурятского государственного университета.

Автореферат разослан «\_\_» февраля 2012 г.

Ученый секретарь  
Диссертационного совета,  
кандидат биологических наук



Шорноева Н.А.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы

В последние десятилетия микробные сообщества термальных и щелочных местообитаний находятся в центре внимания исследователей (Brock, 1978; Бонч-Осмоловская, 1999; Заварзин, 2004; Жилина, 2005; Горленко, 2004; Намсараев, 2006; Кевбрин, 2007). Изучение микроорганизмов из этих сообществ на молекулярном уровне позволило выявить новые метаболические пути и механизмы биохимической адаптации, что значительно обогатило современную фундаментальную микробиологию.

Термофильные и алкалофильные гидролитические бактерии представляют одну из наиболее обширных и активно изучаемых групп микроорганизмов и являются источником новых ферментов и метаболитов для промышленности и медицины. На данный момент известно большое число термо-/ алкалофильных микроорганизмов, осуществляющих гидролиз полимерных субстратов - амилолитики (Krishnan and Chandra, 1983; Gupta et al., 2003), целлюлозолитики (Bergquist et al., 1999, Uhl and Daniel, 1999, Andrade et al., 2001, Kozina et al., 2009 и др.) и протеолитики. Большинство протеолитиков растут и используют в качестве источника углерода и энергии пептиды, благодаря наличию внеклеточных пептидаз, активных в широких диапазонах значений pH и температур (Klingeberg et al., 1995; Ward et al., 2002). В целом, в природных местообитаниях гидролитики занимают нишу первичных деструкторов, благодаря способности гетеротрофно расти на биополимерах различной природы (Кубланов, 2011).

Распространение аэробных органотрофных бактерий в водных системах Забайкалья ранее изучалось эпизодически (Храпцова и др., 1984; Намсараев, 2003; Nazina et al., 2004; Зайцева, 2004). Знания о видовом разнообразии и функциональной активности представителей аэробного микробного сообщества щелочных термальных источников и содово-соленых озер Забайкалья были недавно пополнены (Базаржапов, 2005; Бабасанова, 2007; Шагжина, 2007; Митыпова, 2007).

Вместе с тем, к началу нашей работы изучены гидролитические ферменты только ограниченного числа микроорганизмов водных систем Забайкалья. Очевидно, что их разнообразие и метаболические свойства исследованы недостаточно, а биотехнологический потенциал микроорганизмов раскрыт далеко не полностью. Это делает актуальным проведение новых исследований, связанных с распространением, разнообразием и функциональной активностью бактерий в термофильных и алкалофильных микробных сообществах экстремальных водных систем Забайкалья.

**Цель работы:** изучить гидролитические бактерии и их функциональную роль в термальных и щелочных водных системах Забайкалья.

Для выполнения этой цели были поставлены следующие **задачи:**

- Изучить распространение аэробных гидролитических бактерий в донных осадках и микробных матах термальных источников и содово-соленых озер;
- Выделить чистые культуры гидролитических микроорганизмов и определить их таксономическое положение;
- Изучить экофизиологические и биохимические свойства чистых культур;
- Выделить пептидазы гидролитических бактерий и изучить их свойства;
- Изучить функциональную роль гидролитических бактерий в микробном сообществе.

**Научная новизна и практическая значимость.** С помощью микробиологических и молекулярно-генетических методов выявлено распространение аэробных алкалотермофильных органотрофных бактерий-продуцентов пептидаз семейства Bacillaceae и Paenibacillaceae в термальных источниках Байкальского региона.

Выделен и детально охарактеризован предположительно новый вид алкалотермофильной факультативно анаэробной органотрофной бактерии «*Anoxybacillus* sp. nov.». Показано, что данная бактерия является активным продуцентом термостабильной сериновой субтилизин-подобной пептидазы, имеющей оптимум активности при 50<sup>0</sup>С и рН 11,1.

Изученные пептидазы (сериновые субтилизин-подобного типа) алкало-/термофильных гидролитических бактерий обладают высокой температурной (от 23 до 60 °С) и рН стабильностью (от 6,3 до 11,4).

Впервые получены очищенные препараты пептидаз из источников Забайкалья, изучены их важнейшие физико-химические свойства. Впервые представлены данные по наличию ингибиторной активности пептидаз у бактерий содово-соленых озер Забайкалья.

Полученные результаты расширяют представления о разнообразии и экологическом значении гидролитических бактерий в экстремальных местообитаниях. Полученные очищенные препараты пептидаз могут найти практическое применение в биотехнологии, как ферменты устойчивые к высоким значениям температуры и рН. Результаты исследований могут быть использованы в учебном процессе при изучении микробиологии и экологии и подготовке учебно-методических пособий.

**Апробация работы.** Основные положения диссертации были представлены на VI Международной научной конференции «Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии» (Минск, 2008); Молодежной школе-конференции с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии» (Москва, 2008, 2010); Всероссийском симпозиуме с международным участием «Современные проблемы физиологии, экологии и биотехнологии микроорганиз-

мов» (Москва, 2009); I International conference “Survey of Mongolian aquatic ecosystems in a changing climate: Results, new approaches and future outlook” (Ulaanbaatar, Mongolia, 2010); XVII Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, 2010); Международной конференции «Экология и геохимическая деятельность микроорганизмов экстремальных местообитаний» (Улан-Удэ – Улан-Батор, 2011).

**Публикации.** По результатам исследований опубликовано 18 печатных работ.

**Место проведения работы.** Работа выполнена в лаборатории микробиологии Института общей и экспериментальной биологии СО РАН. Молекулярно-биологическая часть работы проводилась в Центре «Биоинженерия» РАН г. Москва. Работа по изучению внеклеточных пептидаз проводилась в НИИ Физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова под руководством д.б.н. Дунаевского Я.Е.

**Объем и структура диссертации.** Диссертация состоит из введения, списка сокращений, обзора литературы, описания материалов и методов исследований, раздела экспериментальных исследований и обсуждения результатов, выводов, списка литературы и приложения. Работа изложена на \_\_\_ страницах машинописного текста, включает \_\_\_ таблиц, \_\_\_ рисунков. Библиография содержит \_\_\_ наименований, в т.ч. \_\_\_ - зарубежных авторов.

**Благодарности.** Автор выражает глубокую признательность за общее научное руководство научному руководителю к.б.н. Е.В. Лаврентьевой и научному консультанту д.б.н., проф. Я.Е. Дунаевскому.

Автор выражает благодарность за помощь в работе и поддержку ведущему лабораторией микробиологии ИОЭБ СО РАН д.б.н., проф. Б.Б. Намсараеву и всем сотрудникам лаборатории, ведущему лабораторией белков растений д.б.н., проф. М.А. Белозерскому и всем сотрудникам НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова, а также к.б.н. Б.Б. Кузнецову (Центр «Биоинженерия» РАН).

Диссертационная работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ № 10-04-90798\_моб\_ст, № 10-04-93169\_Монг\_а, МО РФ РНП 2.1.1/2165.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Глава 1. Обзор литературы

В обзоре литературы приведены сведения по разнообразию микробного сообщества термальных источников и содово-соленых озер, рассмотрены общие свойства гидролитиков и их гидролаз, приведена современная классификация гидролитических ферментов (пептидаз) по базе данных

MEROPS, представлены современные данные о роли внеклеточных пептидаз в прокариотной клетке и функционировании микробного сообщества в экстремальных местообитаниях, особое внимание уделено механизмам адаптации микроорганизмов к высоким температурам и рН, а также представлены данные о биотехнологическом применении внеклеточных пептидаз микроорганизмов.

## Глава 2. Объекты и методы исследований

**Объектами** исследования являлись термальные источники Алла, Ум-хэй, Гарга, Сеоя, Гусиха, Уро и Горячинск, расположенные в Курумканском, Баргузинском и Прибайкальском районах республики Бурятия. Температура воды на выходах термальных источников варьировала в широких пределах (39 - 74<sup>0</sup>С). Наиболее высокотемпературными были источники Уро (69,1<sup>0</sup>С), Алла (70<sup>0</sup> С), Гусиха (72<sup>0</sup>С) и Гарга (74<sup>0</sup> С). Воды имели щелочную реакцию, значения рН варьировали от 8,1 до 9,7. Температура и рН в термальных водах снижалась по мере удаления от излива.

Для исследования были отобраны пробы воды, донных осадков и микробных матов в летне-осенний период с 2008 по 2010 годы.

Предметом исследований служили гидролитические бактерии: (табл. 1): Уг-6<sup>к</sup>, Вг-2-2<sup>к</sup>, Га-9-2<sup>к</sup>, А1-9-1<sup>к</sup> и Се-1<sup>к</sup>, выделенные из микробных матов и донных осадков термальных источников Бурятии (Бабасанова и др., 2006) и 5 культур SK1<sup>к</sup>, K5<sup>к</sup>, K6<sup>к</sup>, ЦЗ<sup>к</sup> и Nu<sup>к</sup>, выделенные из донных отложений и воды содово-соленых озер Соленое и Нухэ-Нур (Забайкалье) (Митьпова и др., 2005). Все штаммы получены из коллекции лаборатории микробиологии ИОЭБ СО РАН, г. Улан-Удэ.

Таблица 1

### Физико-химическая характеристика местообитаний гидролитических бактерий

| Штамм               | Объект выделения | Т, <sup>0</sup> С пробы | рН пробы | Вид пробы |
|---------------------|------------------|-------------------------|----------|-----------|
| Ga-9-2 <sup>к</sup> | Гарга            | 57,4                    | 8,2      | мат       |
| A1-9-1 <sup>к</sup> | Алла             | 61,5                    | 9,75     | мат       |
| Уг-6 <sup>к</sup>   | Уро              | 62,0                    | 8,7      | мат       |
| Вг-2-2 <sup>к</sup> | Большая речка    | 51,5                    | 9,25     | мат       |
| Се-1 <sup>к</sup>   | Сеоя             | 49                      | 9,7      | мат       |
| SK1 <sup>к</sup>    | Соленое          | 22                      | 9,9      | д.ос.     |
| K5 <sup>к</sup>     | «                | 22                      | 9,9      | д.ос.     |
| K6 <sup>к</sup>     | «                | 22                      | 9,9      | д.ос.     |
| ЦЗ <sup>к</sup>     | «                | 22                      | 9,9      | д.ос.     |
| Nu <sup>к</sup>     | Нухэ-Нур         | 27                      | 9,84     | вода      |

Примечание: д.ос. – донные осадки; <sup>к</sup> – коллекционные культуры ИОЭБ СО РАН

### **Физико-химические методы исследования гидротерм**

Определение физико-химических параметров воды, донных осадков в местах отбора проб проводили общепринятыми методами (Намсараев и др., 2006).

Содержание органического углерода ( $C_{\text{орг}}$ ) в пробах определяли по методу Тюрина в модификации Никитина (Аринушкина, 1980). Определение содержания белка проводили по методу Лоури (Практикум по микробиологии, 2005). Оптическую плотность измеряли на фотоэлектроколориметре КФК-20 (Россия) и спектрофотометре СЕСІL-1021 (Великобритания).

**Методы учета численности и выделения накопительных и чистых культур гидролитических бактерий.** Учет численности и выделение аэробных алкалотермофильных гидролитических бактерий проводили методом предельных разведений и высева на агар на среде Пфеннига следующего состава (г/л):  $\text{NH}_4\text{Cl}$  – 0,3;  $\text{KН}_2\text{PO}_4$  – 0,3;  $\text{MgCl}_2$  – 0,3;  $\text{CaCl}_2$  – 0,3; дрожжевой экстракт – 0,5; раствор микроэлементов по Липперту, Витману – 1 мл. В качестве субстратов вносили (в %): для протеолитиков – пептон (1,5); для амилолитиков – крахмал (1,5); для целлюлолитиков – полоску фильтровальной бумаги (1); для липолитиков – твин-80 (1,5).  $\text{pH}^{25^\circ\text{C}}$  среды довели бикарбонатно-карбонатным буфером до 8,5–9,5, температура инкубации для культур из содово-соленых озер составляла  $37^\circ\text{C}$ , для культур из термальных источников –  $50^\circ\text{C}$ .

Морфотипы бактерий, размеры, подвижность и спорообразование изучали микроскопированием препаратов с помощью светового микроскопа AxioStar Plus (Karl Zeiss) в фазовом контрасте и на окрашенных препаратах при 100-кратном увеличении объектива (общее увеличение 1000) и ультратонких срезах в электронном микроскопе Jeol JEM-100C (Япония).

**Молекулярно-биологические методы.** Выделение ДНК проводили из биомассы бактерий (Булыгина и др., 2002). Для проведения полимеразной цепной реакции и дальнейшего секвенирования ПЦР-фрагментов гена 16S рРНК была использована универсальная праймерная система (Lane, 1991). Анализ продуктов ПЦР проводили при помощи электрофореза в 2% геле агарозы при напряженности электрического поля 6 В/см.

Выделение и очистку продуктов ПЦР проводили из легкоплавкой агарозы с применением набора реактивов Wizard PCR Preps (Promega, США).

Секвенирование полученных ПЦР-фрагментов генов, кодирующих 16S рРНК, проводили по методу Сэнгера с соавт. (Sanger et al, 1977) с помощью набора реактивов Big Dye Terminator v.3.1 (Applied Biosystems, Inc.,USA) на автоматическом секвенаторе ABI PRIZM 3730 (Applied Biosystems, Inc.,USA). Первичный анализ сходства нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК изучаемых штаммов проводили с помощью программного пакета BLAST (Camacho et al., 2009).

Построение филогенетического древа производили с помощью пакета программ TREECON (Van de Peer and De Wachter, 1994).

Метагеномный анализ проведен на пиросеквенаторе Roche 454 GS-FLX Titanium (Южная Корея). Оценку таксономической сложности сообщества проводили с помощью пакета программ CLcommunity (ver 2.58).

**Анализ жирных кислот.** Состав жирных кислот анализировали на хроматографе Шерлок (Microbial Identification System, MIDI Inc, USA). Исследования выполнены в Национальном университете, Чанчон, Южная Корея.

**Изучение физиолого–биохимических свойств гидролитических культур.** Температурные диапазоны развития бактерий устанавливали в градиентном термостате от 20 до 80°C. Диапазон pH<sup>25°C</sup> устанавливали с разными концентрациями бикарбоната и карбоната натрия (от 6,0 до 11,0). Способность к использованию различных источников углерода проверяли на минеральной среде, в которую вносили испытуемые источники углерода в концентрации 0,5 – 1 % от объема среды. Биомассу бактерий определяли по изменению оптической плотности культуры при длине волны 560 нм. Биохимические свойства бактерий, удельную скорость роста определяли общепринятыми методами (Практикум по микробиологии, 2005).

**Определение общей активности пептидаз** проводили на белковых субстратах: азоказеин и желатина. Для определения субстрат-специфичной активности использовали синтетические 20 мМ *n*-нитроанилидные субстраты, специфичные для определенных групп пептидаз – GlpAALpNa для субтилизин-подобных, GlpFpNa – химотрипсин-подобных, BAPA – трипсин-подобных, GlpFAPNa – цистеиновых, R-pNa, L-pNa, F-pNa, Y-pNa – аминокпептидаз (Erlanger et al., 1961). Для выяснения природы функциональных групп активного центра использовали ингибиторы, специфичные для различных классов пептидаз: EDTA и о-фенантролин для металлопептидаз, PMSF для сериновых пептидаз, IAA для цистеиновых пептидаз. Оптимум активности в зависимости от pH<sup>25°C</sup> определяли в 0,5М универсальном буфере в диапазоне pH 2,4 – 12. Температурный оптимум фермента определяли, измеряя активность фермента при значениях температуры от 23 до 80°C.

**Выделение и очистка ферментов** культур Se-1-10 и Gog-10s проводили из препаратов культуральной жидкости бактерий методами диализа, ионообменной хроматографии на колонке Mono Q в режиме FPLC. Определение молекулярных масс ферментов проводили методом гель-хроматографии на Superdex 75.

**Методы математического анализа.** Все расчеты были проведены с использованием Excel2003 и пакета программ MathLabR2010a для Windows.



### Глава 3. Результаты исследования и их обсуждение

#### Исследование химического состава нативных проб

Важным фактором, влияющим на активность и жизнедеятельность микробного сообщества, является качественный и количественный состав органического вещества в среде обитания.

В донных осадках оз. Соленое и Нухэ-Нур обнаружено высокое содержание  $C_{\text{орг}}$  (10,0-15,4 %). Основными источниками ОВ в изученных содовых озерах является фитопланктон и прибрежная растительность. Содержание белка было относительно низким (от 0,1 до 0,23 мг/см<sup>3</sup>) (Митыпова, 2007).

Общее содержание органического углерода в пробах исследованных термальных источников варьировало в пределах от 0,3% до 6,03% и зависело от вида пробы. Максимальные значения (5,57 и 6,03%) были отмечены в микробных матах гидротерм Гарга и Сеюя (табл. 2). Количество белка в исследуемых пробах составило от 1,1 (ист. Горячинск) до 4,36 мг/см<sup>3</sup> (ист. Умхэй). В целом, отмечено, что концентрация органического вещества в микробных матах была выше, чем в донных осадках.

Таблица 2

Физико-химическая характеристика проб

| Источник  | Вид пробы | t, °C | pH   | Белок, мг/см <sup>3</sup> | Сорг, % | Содержание углерода ОВ, % на минеральную часть навески |
|-----------|-----------|-------|------|---------------------------|---------|--|
| Горячинск | д.ос.     | 52    | 9,3  | 1,1                       | 0,3     | 4,41   |
|           | д.ос.     | 46    | 9,28 | 2,74                      | 0,42    | 20,83  |
|           | м.м       | 52,3  | 9,3  | 2,15                      | 2,0     | 97,29  |
| Гарга     | м.м       | 61    | 8,5  | 3,44                      | 0,27    | н.о  |
|           | м.м       | 35    | 8,2  | 1,21                      | 5,57    | 1362,85  |
| Сеюя      | м.м       | 50    | 9,77 | 2,96                      | 6,03    | 2711,76  |
| Умхэй     | м.м       | 40    | 9,64 | 4,36                      | 1,61    | 36,16  |
|           | д.ос.     | 40    | 9,64 | 2,02                      | 0,46    | 19,65  |

Примечание: д.ос. – донные осадки; м.м – микробный мат; н.о – не определено

Сравнительный анализ содержания  $C_{\text{орг}}$  и белка микробных матов и донных осадков термальных источников показал, что удельное содержание ОВ выше в микробных матах, что может быть объяснено высокой интенсивностью продукционных процессов в матах в отличие от донных осадков (Jorgensen, Nelson, 1988; Navarrete et al., 2000; Заварзин, 1993, 2003).

Основные экологические параметры воды термальных источников Забайкалья были проанализированы с использованием метода главных ком-

понент (Geladi, 1989; Gorban, Zinovyev, 2010), что позволило определить наиболее важные факторы для функционирования системы.

Были определены четыре главные компоненты (PC – Principal Component), которые объясняют 94% наблюдаемых вариаций. PC1 объясняет 61% наблюдаемых параметров представляет собой pH и количество белка в нативных пробах. Наибольший вклад во вторую компоненту PC2 – 25% наблюдаемых изменений в среде, оказывают численность протеолитиков и тип пробы, состоящий из микробных матов и донных осадков. PC3 (минерализация и содержание органического вещества) и PC4 (температура) имеют меньшее значение, объясняя 4,2% и 3,78% изменений, соответственно.

Анализ показал, что функционирование гидролитического микробного сообщества в первую очередь, регулируется такими факторами, как pH и содержание белка в пробах.

### **Численность гидролитических бактерий термальных и щелочных водных систем Забайкалья**

В естественных местообитаниях гидролитические бактерии занимают нишу первичных деструкторов органического вещества.

Таблица 3

Численность аэробных протеолитических бактерий термальных источников, lg кл/см<sup>3</sup>

| Объект    | T, °C<br>пробы | pH<br>пробы | Протеолитики |      | Амилолитики |      |
|-----------|----------------|-------------|--------------|------|-------------|------|
|           |                |             | д.ос.        | м.м. | д.ос.       | м.м. |
| Гарга     | 55             | 8,67        | 4            | 6    | 3           | 4    |
|           | 70             | 8,5         | 4            | -    | 2           | -    |
| Алла      | 70             | 9,44        | 3            | 4    | 2           | 3    |
|           | 65             | 9,2         | -            | 5    | -           | 3    |
|           | 45             | 8,33        | 5            | 5    | 2           | 4    |
|           | 40             | 9,19        | 5            | -    | 3           | -    |
| Уро       | 43             | 8,8         | 5            | -    | 2           | -    |
|           | 46             | 9,19        | -            | 4    | -           | 3    |
|           | 63             | 9,04        | -            | 5    | -           | 2    |
| Умхей     | 40             | 9,64        | 4            | 5    | 3           | 3    |
| Горячинск | 52             | 9,3         | 5            | 6    | 4           | 5    |
|           | 46             | 9,28        | 5            | -    | 3           | -    |
|           | 42,1           | 9,41        | 5            | -    | 5           | -    |
| Сеюя      | 50             | 9,77        | 4            | 7    | -           | 4    |
| Соленое   | 22             | 9,9         | 8*           | -    | 6*          | -    |
| Нухэ-Нур  | 27             | 9,84        | 6*           | -    | 6*          | -    |

Примечание: «-» - нет данных; \*- данные Митыповой Т.Н.

Численность протеолитических бактерий в донных осадках и микробных матах варьировала в пределах от 1000 до 100 млн. кл/см<sup>3</sup> (табл. 3). Наибольшее число микроорганизмов обнаружено в поверхностном мик-

робном мате источника Сеюя и в матах Гарги и Горячинск (до 10 млн. кл/см<sup>3</sup>) и в донных осадках оз. Соленое и Нухэ-Нур (до 100 млн. кл/см<sup>3</sup>).

Максимальное число бактерий (10 тыс. кл/см<sup>3</sup>), использующих в качестве основного субстрата – крахмал, зафиксировано в донных осадках и микробных матах источника Горячинск, оз. Соленое и Нухэ-Нур. Обнаружено, что численность аэробных протеолитиков и амилолитиков превышает численность липолитиков и ЦРБ в среднем на 2-4 порядка. Так максимальное количество липолитиков и целлюлозолитиков (анаэробы) достигало 100 кл/см<sup>3</sup>.

Таким образом, высокая численность разных физиологических групп бактерий указывает на широкое распространение первичной деструкционной ветви микробного сообщества. Отмечено, что вследствие высоких концентраций белка и ОВ, численность бактерий-деструкторов выше в микробных матах, чем в донных осадках.

### **Выделение и характеристика гидролитических бактерий термальных водных систем Забайкалья**

Из проб микробных матов и донных осадков термальных источников Бурятии: Гарга, Алла, Умхей, Сеюя и Горячинск было выделено 28 штаммов гидролитических бактерий (табл. 4).

Таблица 4

Характеристика штаммов, выделенных из термальных источников Забайкалья

| Штамм          | Источник  | Вид пробы | Физиологическая группа |
|----------------|-----------|-----------|------------------------|
| <b>Se-1-10</b> | Сеюя      | м.м.      | Протеолитик            |
| Сея-09         |           |           |                        |
| A7             |           |           | Липолитик              |
| A8             |           |           |                        |
| Л7             |           |           |                        |
| Л8             |           |           |                        |
| <b>Um-09m</b>  | Умхей     | м.м.      | Протеолитик            |
| Um-09s1        |           | д.ос.     |                        |
| Um-09s2        |           |           |                        |
| A11            | Алла      | д.ос.     | Амилолитик             |
| A12            |           | м.м.      |                        |
| Л12            |           | Липолитик |                        |
| Л13            |           |           |                        |
| Л15            |           |           |                        |
| <b>Gor-10s</b> | Горячинск | д.ос.     | Протеолитик            |
| Gor-10-3       |           | м.м.      |                        |
| Gor-10-1m      |           |           |                        |
| Gor-10-2       |           |           |                        |

|              |           |       |             |
|--------------|-----------|-------|-------------|
| <b>Га-35</b> | Гарга     | м.м.  | Протеолитик |
| A9           |           |       | Амилолитик  |
| A10          |           |       | Липолитик   |
| L10          | Уро       | песок | Амилолитик  |
| A1           |           |       | Липолитик   |
| A2           |           | м.м.  | Амилолитик  |
| L2           |           |       | Липолитик   |
| L4           |           | д.ос. | Амилолитик  |
| A5           |           |       | Липолитик   |
| L5           | Липолитик |       |             |

Примечание: жирным шрифтом выделены штаммы с известным филогенетическим положением

**Морфология.** Клетки бактерий представлены различными спорообразующими грамположительными палочками, размеры которых варьировали в пределах от 0,5-4,96 x 1,1-16,6 мкм. Размеры спор составляли 1,13 – 1,57 мкм.

**Экофизиология.** Исследование экофизиологии, выделенных культур протеолитиков из термальных источников, показало, что они способны развиваться в широком диапазоне температур (23-60°C) и pH (7,6-10,0), проявляя свойства алкало- и термотолерантности. В соответствии с имеющимися классификациями бактерий в отношении температуры и pH, изученные штаммы распределились следующим образом:

- Штаммы бактерий-деструкторов (SK1<sup>к</sup>, K5<sup>к</sup>, K6<sup>к</sup>, ЦЗ<sup>к</sup> и Nu<sup>к</sup>), выделенные из содово-соленых озер Забайкалья, характеризуются как мезофилы с оптимумом роста в диапазоне от 23 до 30°C и оптимумом pH от 7,6 до 10;
- Большая группа штаммов (Gor-10-3, Сея-09, Um-09s1, Um-09s2, Gor-10-1m, Um-09m, Га-35 и Gor-10s), выделенных из термальных источников, характеризуются как термоалкалотолерантные, с оптимумом развития в диапазоне от 40 до 45°C и оптимумом pH от 7,5 до 9,5;
- Штаммы бактерий (Gor-10-2, Ur-6<sup>к</sup>, Br-2-2<sup>к</sup>, Ga-9-2<sup>к</sup>, Al-9-1<sup>к</sup> и Se-1<sup>к</sup>), выделенные из термальных источников, характеризуются как термоалкалофильные, с оптимумом роста в диапазоне от 50 до 60°C и оптимумом pH от 8,0 до 8,5.

**Генотипическая характеристика.** Методом пиросеквенирования по гену 16S рРНК микробного мата получены данные, характеризующие состав микробного сообщества.

В сообществе микробного мата, развивающегося при pH 9,47 и температуре 67°C в источнике Алла (2402 н.п., 80 ОТЕ), доминируют филы Deinococcus - Thermus (45%) и Nitrospirae (36%). Proteobacteria и Firmicutes составляют 3 и 2%, соответственно. Chloroflexi и Cyanobacteria – формирующие компоненты микробных матов, в структуре данного сообщества

занимают 3% и 0,37%, соответственно. Произведен анализ графиков, иллюстрирующие зависимость числа детектированных флотипов (т.е. числа кластеров) от числа проанализированных последовательностей (Марданов, 2010). Проведенная оценка таксономической сложности сообщества позволила показать разнообразие 83 видов бактерий.

Изучение видового разнообразия выделенных бактерий молекулярно-генетическим методом показало, что выделенные культуры относятся к родам *Bacillus*, *Anoxybacillus* и *Paenibacillus*.

Для анализа гена 16S рРНК было отобрано 3 штамма (Um-09m, Га-35 и Gor-10s). В результате было показано, что штамм Um-09m имеет 99,8 % сходства с *Bacillus licheniformis* штамм BPRIST006. Наибольшее сходство у культур Га-35 и Gor-10s выявлено с *Paenibacillus dendritiformis* штамм P411 (100%).

### **Внеклеточная протеолитическая активность в нативных пробах**

Изучение биохимических параметров нативных образцов показало, что наиболее высокая общая внеклеточная протеолитическая активность при использовании в качестве субстрата желатины обнаружена в источнике Сеоя – от 0,13 до 1,02 ед. в донных осадках и от 0,36 до 1,09 ед. в микробных матах. Высокая ферментативная активность, вероятно, обусловлена тем, что в местах отбора проб, зафиксированы наибольшие количества органического вещества (до 6,03%) и численности гидролитических бактерий (от 10 тыс. до 10 млн. кл/см<sup>3</sup>). Активное разложение желатины было отмечено также в образцах источников Гусиха (0,12 – 0,51 ед.) и Алла (0,22 – 0,49 ед.). Пробы из источника Гарга имели незначительную активность по желатине (0,13 – 0,24 ед.), т.к. точки отбора проб находились на выходе источника и характеризовались низкими значениями  $C_{орг}$  (0,27%) и численности (до 10 тыс. кл/см<sup>3</sup>).

В образцах источников Алла, Умхей, Сеоя обнаружена трипсин-подобная активность. Значения активности варьировали от следовых до 0,65 ед. Образцы источников Гарга и Гусиха характеризовались низкими значениями активности по данному субстрату (<0,12 ед.).

Таким образом, показана высокая вариабельность в распределении активности пептидаз в зависимости от типа образца. Высокие значения субтилизин-подобной активности обнаружены в микробных матах. Максимальные величины трипсин-подобной активности были определены, как в микробных матах, так и в донных осадках. Проведенные исследования показали высокую степень участия внеклеточных ферментов в нативных образцах в деструкции органического вещества в термальных источниках.

### Внеклеточная протеолитическая активность гидролитических бактерий

В качестве источников секретируемых внеклеточных пептидаз использовали культуральные жидкости 9 алкало-термофильных штаммов Gog-10-3, Сея-09, Gog-10-2, Um-09s1, Um-09s2, Gog-10-1m, Um-09m, Га-35 и Gog-10s, выделенных из микробных матов и донных осадков термальных источников Забайкалья и 10 органотрофных культур, предоставленных из коллекции ИОЭБ СО РАН (табл. 5).

Таблица 5

#### Краткая характеристика органотрофных культур

| №                               | Штамм               | Место выделения/ источник выделения | Таксономическая принадлежность*                            | Отношение к O <sub>2</sub> | lim/ NaCl <sub>орг</sub> |
|---------------------------------|---------------------|-------------------------------------|--|----------------------------|--------------------------|
| <b>Из содово-соленых озер</b>   |                     |                                     |  |                            |                          |
| 1                               | Nu <sup>к</sup>     | оз. Нухэ-Нур/ вода                  | <i>Sanguinoglea alkalitolerans</i> gen. nov., sp. nov.     | SA                         | 0-7,5/ 0,5-1,5           |
| 2                               | SK1 <sup>к</sup>    | оз. Соленое/ донные осадки          | <i>Lyalikoviella elongate</i> gen. nov., sp. nov.          | SA                         | 0-7,5/3,0                |
| 3                               | ЦЗ <sup>к</sup>     | »                                   | <i>Bacillus krulwichae</i> (100%)                          | FAn                        | 0-20,0/10,0              |
| 4                               | К5 <sup>к</sup>     | »                                   | <i>Bacillus saliphilus</i> (100%)                          | FAn                        | 0-20,0/ 3-7,5            |
| 5                               | К6 <sup>к</sup>     | »                                   | <i>Halomonas aquamarina</i> (99%)                          | FAn                        | 0-20,0/ 7,5-10,0         |
| <b>Из термальных источников</b> |                     |                                     |  |                            |                          |
| 6                               | Ur-6 <sup>к</sup>   | Уро/ микробный мат                  | <i>Bacillus hemicellulosolyticum</i> C-11 (99 %)           | FAn                        | 0-50/0                   |
| 7                               | Bг-2-2 <sup>к</sup> | Большая речка/ микробный мат        | <i>Bacillus licheniformis</i> BBDC6 (97 %)                 | Fan                        | 0-50/0                   |
| 8                               | Га-9-2 <sup>к</sup> | Гарга/ микробный мат                | <i>Anoxybacillus flavithermus</i> DSM 2641 (Z26932) (95 %) | FAn                        | 0-20/0                   |
| 9                               | АI-9-1 <sup>к</sup> | Алла/ донные осадки                 | <i>Anoxybacillus pushchinoensis</i> AT-2 (AB234214) (96%)  | FAn                        | 0-20/0                   |
| 10                              | Се-1 <sup>к</sup>   | Сеюя/ донные осадки                 | <i>Anoxybacillus pushchinoensis</i> AT-2 (AB234214) (95%)  | FAn                        | 0-50/0                   |

Примечание: \*Таксономическая принадлежность оценена на основании анализа последовательности гена 16S рРНК, в скобках указан % гомологии с ближайшим родственным организмом; SA – строгий аэроб; FAn – факультативный анаэроб.

Наиболее важным фактором определяющим активность внеклеточных ферментов является наличие в питательной среде оптимального субстрата в процессе роста культур. Нами проведено сравнительное изучение секреции внеклеточных пептидаз в зависимости от источника азота (триптон,

пептон, казеин, неорганический источник азота) и времени культивирования (от 12 до 96 ч). Установлено, что максимальная активность по азоказеину у штаммов Um-09m, Га-35 и Gor-10s проявляется на среде с триптоном на 48-60 ч культивирования.

Максимальная активность для трипсин-подобных пептидаз по субстрату ВАРА обнаружена на 84 и 60 ч культивирования у штаммов бактерий SK1<sup>к</sup> и Nu<sup>к</sup>, соответственно. У штаммов K5<sup>к</sup>, K6<sup>к</sup> и ЦЗ<sup>к</sup> обнаружены следовые активности по данному субстрату. Изучение пептидазной активности на специфичном для субтилизин-подобных пептидаз субстрате – GlpAALpNa показало наличие у штамма ЦЗ<sup>к</sup> и Ur-6<sup>к</sup> наиболее высокой внеклеточной протеолитической активности, которая составила 4,3 ед/мг белка (96 ч) и 3,24 ед/мг белка (12 ч). Максимум активности по этому же субстрату выявлены в штаммах Um-09m, Га-35 и Gor-10s (7,1; 3,7 и 12,6 ед/мг белка, соответственно). Полученные данные свидетельствуют о том, что существенный вклад в пептидазную активность культур ЦЗ<sup>к</sup>, Ur-6<sup>к</sup>, Um-09m, Га-35 и Gor-10s, по-видимому, вносят пептидазы с субтилизин-подобной специфичностью. Показано, что культуры не гидролизуют субстраты, специфичные для химотрипсин-подобных и цистеиновых пептидаз, независимо от времени культивирования и источников органического азота.

Анализ внеклеточной протеолитической активности изученных штаммов свидетельствует о различной субстратной специфичности пептидаз у изученных штаммов бактерий.

С помощью использованных методов диализа и ионообменной хроматографии в условиях FPLC на колонке Mono Q (табл. 6) удалось частично очистить фермент с молекулярной массой 19-20 кДа, выделенный из культуральной жидкости *Paenibacillus dendritiformis* штамм Gor-10s. Полученные активные фракции использовали для дальнейшей характеристики пептидазы.

Таблица 6.

Стадии очистки пептидазы, выделенной из культуральной жидкости  
*Paenibacillus dendritiformis* штамм Gor-10s

| Стадия очистки             | Общий белок, мг | Общая активность, ед | Удельная активность, ед./мг белка | Степень очистки | Выход, % |
|----------------------------|-----------------|----------------------|-----------------------------------|-----------------|----------|
| Культуральная жидкость     | 20,56           | 150,4                | 7,32                              | 1,0             | 100      |
| Диализ                     | 9,53            | 119,8                | 12,57                             | 1,7             | 58,2     |
| Ионообменная хроматография | 0,402           | 69,94                | 173,9                             | 23,8            | 4,2      |

Ни ионообменная хроматография, ни гель-хроматография не выявили в культуральной жидкости присутствие еще какой-либо пептидазы со сходной активностью.

Исследования физико-химических свойств ферментов были проведены на очищенном препарате сериновой пептидазы *Paenibacillus dendritiformis* штамм Gor-10s и в культуральных жидкостях штаммов SK1<sup>к</sup>, Nu<sup>к</sup>, K5<sup>к</sup>, K6<sup>к</sup>, ЦЗ<sup>к</sup>, Ur-6<sup>к</sup>, Br-2-2<sup>к</sup>, Ga-9-2<sup>к</sup>, Um-09m и Га-35 (рис. 1).

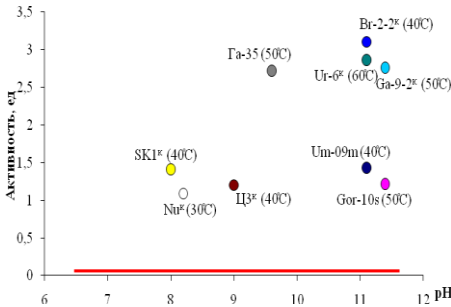


Рисунок 1. pH оптимум и стабильность активности пептидаз изученных штаммов (— - диапазон стабильности пептидаз; в скобках даны оптимумы температуры)

Анализ полученных результатов показал, что максимальная активность ферментов по гидролизу синтетического субстрата GlpAALpNa наблюдается для пептидаз штаммов Ur-6<sup>к</sup>, Br-2-2<sup>к</sup>, Ga-9-2<sup>к</sup>, Um-09m и Gor-10s при pH от 11,0 до 11,3, для пептидаз штаммов SK1<sup>к</sup>, Nu<sup>к</sup>, ЦЗ<sup>к</sup> и Га-35 при pH от 8,0 до 9,8. Все ферменты стабильны в широком диапазоне pH от 6,6 до 11,4. Температурные оптимумы пептидаз колеблются от 30 до 60°C. Полученные нами данные указывают на то, что секретируемые пептидазы изученных бактериальных штаммов имеют оптимум pH в щелочной области и pH стабильность, вполне покрывающую диапазон pH, свойственный местам их обитания.

Анализ функциональных групп активного центра показал, что в препаратах культуральной жидкости исследованных штаммов бактерий преимущественно содержатся пептидазы, относящиеся к классу сериновых пептидаз субтилизин-подобного типа, кроме штамма Um-09m, в культуральной жидкости которого содержится, по крайней мере, два фермента, относящихся к классам сериновых и металлопептидаз.

Среди исследованных нами культур бактерий у штаммов SK1<sup>к</sup> и Nu<sup>к</sup>, растущих на различных источниках азота, обнаружены высокие внеклеточные активности, ингибирующие субтилизиновые и цистеиновые пептидазы.



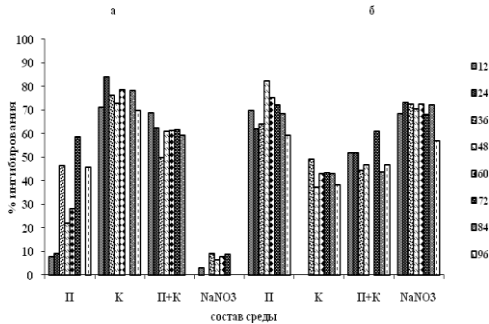


Рисунок 2. Внеклеточная ингибиторная активность субтилизиновых (а) и цистеиновых пептидаз (б) у культур SK1<sup>K</sup>

Так, субтилизин-ингибирующая активность у культуры SK1<sup>K</sup> (рис. 2) ярко выражена на средах с казеином (до 84% ингибирования), пептон+казеин (до 69%) и пептоном до (59%), на среде с неорганическим источником азота ингибирующая активность была слабая и не превышала 9%. Культура Nu<sup>K</sup> также показала высокую ингибирующую активность, но, в отличие от SK1<sup>K</sup>, на среде с пептоном активности не обнаружено. Низкий процент ингибирования обнаружен на среде с неорганическим источником азота только в первые часы культивирования.

Отличительной особенностью цистеин-ингибирующей активности у культур SK1<sup>K</sup> и Nu<sup>K</sup> от субтилизин-ингибирующей являлась высокая активность на средах с неорганическим источником азота (73 и 81%). Причем высокий уровень ингибирования оставался практически неизменным в течение всего времени культивирования.

Обнаруженные нами высокие ингибиторные активности по отношению к сериновым и цистеиновым пептидазам у штаммов SK1<sup>K</sup> и Nu<sup>K</sup>, возможно, защищают сами бактерии и их белковые субстраты от атаки экзогенных пептидаз, как в случае внеклеточного пептидазного ингибитора *B. brevis* (Shiga et al., 1995).

Определение молекулярных масс ингибиторов посредством гель-хроматографии показало, что исследованный препарат культуры Nu<sup>K</sup> содержит, по меньшей мере, два ингибитора с молекулярными массами 60 и менее 10 кДа.

### Новая факультативно-анаэробная органотрофная культура Se-1-10 *Anoxybacillus* sp. nov.

Из пробы поверхностного мата горячего источника Сеюя с температурой 50°C и значением pH 9,3 была выделена факультативно анаэробная грамположительная спорообразующая культура Se-1-10.

**Морфология.** Клетки представляют собой прямые палочки, грамположительные, спорообразующие (рис. 3). Образующиеся эллипсоидальные споры располагались в материнской клетке терминально, несколько расширяя ее. Размер клеток 0,39 x 1,07 мкм. При росте на твердой среде образуют колонии 2-4 мм в диаметре, желтовато-молочного цвета. Факультативные анаэробы.

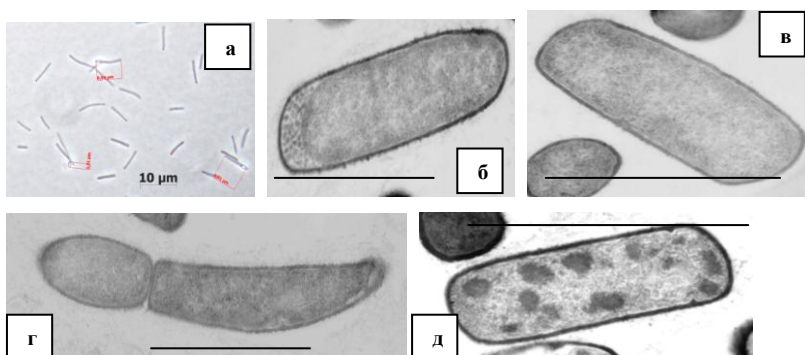


Рисунок 3. Морфология клеток (а) и ультратонкое строение (б, в, г – деление клетки; д – начало процесса спорообразования) микрофотографии (масштаб - 1 µm) штамма Se-1-10.

**Физиологические свойства.** Штамм Se-1-10 активно и стабильно развивается при различных значениях температуры и pH. Культура является факультативным алкалофилом, растущим в области pH от 6,05 до 10,3 с оптимумом 9,5-10,0, умеренным термофилом с оптимумом роста при температуре 50°C.

**Состав жирных кислот.** Доминирующие жирные кислоты штамма Se-1-10 были C<sub>14:0</sub> (2,20%); iso-C<sub>15:0</sub> (66,77%); anteiso-C<sub>15:0</sub> (5,72%); C<sub>15:1w5c</sub> (1,63%); iso-C<sub>16:0</sub> (3,23%); C<sub>16:0</sub> (4,96%); iso-C<sub>17:0</sub> (7,90%); anteiso-C<sub>17:0</sub> (4,19%).

**Генотипическая характеристика.** Результаты анализа сиквенса гена 16S рНК (1517 нуклеотидов) показали, что уровень сходства последовательностей исследуемого штамма Se-1-10 и типовых штаммов *Anoxybacillus flavithermus* strain DSM 2641 (Z26932) и *Anoxybacillus eryuanensis* E112 (GQ153549) составили 98,4 и 98,9%, соответственно (табл. 7).

Таблица 7

Сходство последовательностей штамма Se-1-10 с ближайшими  
ГОМОЛОГАМИ

|  | Штамм<br>Se-1-10 | <i>Anoxybacillus</i><br><i>eryuanensis</i><br>E112<br>(GQ153549) | <i>Anoxybacillus</i><br><i>flavithermus</i><br>DSM 2641T<br>(Z26932) |
|--|------------------|--|--|
| Штамм Se-1-10  | ID               | 0,989  | 0,989  |
| <i>Anoxybacillus eryuanensis</i> E112<br>(GQ153549)    | 0,989            | ID   | 0,984  |
| <i>Anoxybacillus flavithermus</i> DSM<br>2641 (Z26932) | 0,989            | 0,984  | ID   |

Полученные данные позволяют предположить, что штамм Se-1-10 может являться представителем нового вида рода *Anoxybacillus* sp. nov.

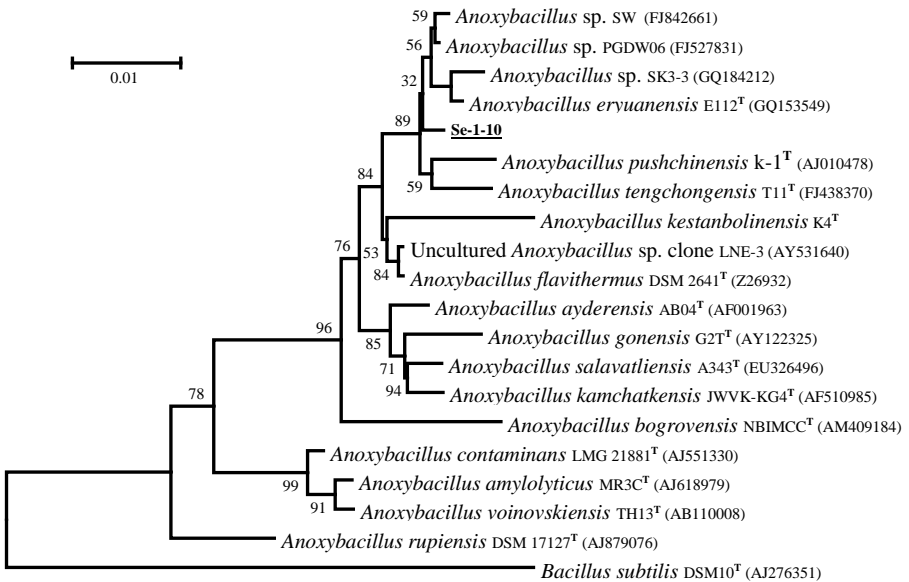


Рисунок 4. Дендрограмма филогенетического положения штамма Se-1-10

На основании проведенных физиолого-биохимических и молекулярно-генетических исследований показано, что штамм Se-1-10 отличается от ранее описанных видов рода *Anoxybacillus* (размеры клеток, окраска колоний, способность к использованию лактозы, мальтозы, целлобиозы и по

профилю жирных кислот). Определение содержания Г+Ц пар и ДНК-ДНК-гибридизация находятся на стадии исследования.

### Внеклеточная протеолитическая активность штамма Se-1-10

Изучена динамика накопления внеклеточной протеолитической активности фермента в процессе роста культуры Se-1-10. Показано, что максимальное накопление фермента в культуральной жидкости происходит в фазе замедления роста (48-60 ч). Штамм показал высокую активность 18,5 ед/мг белка, по специфичному для субтилизин-подобных пептидаз субстрату GIpAALpNa и белковому субстрату азоказеину.

Одним из наиболее важных факторов, определяющих активность внеклеточных ферментов, является наличие в питательной среде оптимального субстрата (Дунаевский и др., 1995). В присутствии легко метаболизируемых источников углерода: глюкоза, фруктоза, лактоза, ксилоза, рамноза, синтез пептидаз резко снижался. При росте культуры на средах с трудно усваиваемыми источниками углерода и азота: дрожжевой экстракт, целлобиоза, триптон, активность, определяемая по гидролизу GIpAALpNa, была выше и достигала 0,44 ед.

В результате последовательной очистки фермента методами диализа и ионообменной хроматографии в условиях FPLC на колонке Mono Q внеклеточная пептидаза штамма Se-1-10 была очищена в 42,7 раз. Выход составил около 1%.

Значения температуры и pH являются одними из важнейших факторов, влияющих на функционирование микробного сообщества

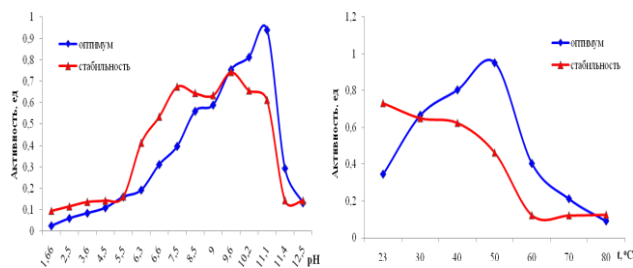


Рисунок 5. pH и температурные оптимумы и стабильности пептидазы Se-1-10

Как следует из приведенных данных, температурный оптимум пептидазы штамма Se-1-10 *Anoxybacillus* sp. nov. составляет 50°C, оптимум pH активности исследуемого штамма находится в щелочной области и составляет 8,0 – 11,4, с максимумом при pH 11,0, что, по-видимому, отражает адаптацию ферментативного аппарата штамма Se-1-10 *Anoxybacillus* sp. nov. к обитанию в щелочных условиях.

Анализ функциональных групп активного центра пептидаз показал, что специфический ингибитор сериновых пептидаз PMSF полностью подавлял активность очищенного фермента штамма Se-1-10. Специфические ингибиторы металлопептидаз (EDTA и о-фенантролин) и цистеиновых пептидаз (IAA) не влияли на активность пептидазы. Эти данные позволяют предположить отсутствие остатков цистеина в белковой глобуле, что является характерным для классических субтилизинов бацилл (Балабан и др., 2007). Таким образом, по типу ингибирования выделенная пептидаза штамма Se-1-10 *Anoxybacillus* sp.nov. относится к семейству субтилизиноподобных ферментов класса сериновых пептидаз.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Известно, что микробные сообщества термальных и щелочных водных систем Забайкалья являются полноценными функциональными системами, эффективно осуществляющие круговорот веществ в процессах продукции и деструкции органического вещества. (Солоноватые ..., 2009; Геохимическая деятельность..., 2011). Наличие органических и минеральных веществ, высокие значения температуры и pH в водной толще, донных отложениях и микробных матах способствует широкому распространению гидролитических термо- и алкалофильных микроорганизмов.

Результаты исследования показали, что в экстремальных водных системах Байкальского региона при температурах от 22 до 70<sup>0</sup>C и pH от 8,0 до 9,7 широко распространены аэробные органотрофные бактерии. Доминирующими физиологическими группами, как в донных осадках, так и в микробных матах были протеолитические бактерии (до 100 млн. кл/см<sup>3</sup>).

Выделенные и изученные нами алкалотолерантные гидролитические бактерии способны развиваться в широком диапазоне температур от 23 до 60<sup>0</sup>C и pH от 7,6 до 10,0. Полученные результаты показали границы приспособляемости и функционирования выделенных бактерий в экстремальных условиях гидротерм Бурятии. Среди определенных с помощью молекулярно-генетических методов бактерий выявлены представители родов *Bacillus*, *Anoxybacillus* и *Paenibacillus*. По совокупности фенотипических и генотипических признаков штамм Se-1-10 отличается от ранее описанных видов рода *Anoxybacillus*, что позволяет отнести выделенный штамм к новому виду. Выделенные культуры в микробном сообществе занимают функциональное положение первичных деструкторов, осуществляющих гидролиз различных органических соединений.

Анализ активности микробного сообщества от экологических факторов в термальных источниках позволил выявить главные факторы (pH и содержание белка), влияющие на функционирование системы. Исследование пептидазной активности в пробах *in situ* показало, что микробное сообщество обладает различным спектром внеклеточных пептидаз, максимально

адаптированных к условиям обитания микроорганизмов, что отражает экологические и метаболические особенности микробного сообщества в термальных системах.

Полученные результаты по изучению внеклеточных пептидаз свидетельствуют о том, что исследованные штаммы обладают различной субстратной специфичностью. Изученные пептидазы алкалофильных и термофильных штаммов показали высокую рН и температурную стабильность, что возможно позволяет им активно функционировать в условиях термальных источников и содово-соленых озер Забайкалья. Проведенные исследования показали присутствие в этих системах активных и разнообразных термофильных и алкалофильных протеолитиков, способных гидролизовать биополимеры (белковые соединения). Пептидазы этих бактерий по своим биохимическим характеристикам могут быть рекомендованы для применения в биотехнологии.

## ВЫВОДЫ

1. В щелочных термальных источниках Забайкалья широко распространены гидролитические бактерии, численность которых составляет от 10 до 100 млн. клеток/см<sup>3</sup>.

2. По результатам пиросеквенирования в микробном сообществе гидротермы Алла доминируют представители филумов *Deinococcus-Thermus*, *Nitrospirae*, *Proteobacteria*, *Firmicutes* и *Chloroflexi*. Выделенные культуры гидролитических факультативно-анаэробных бактерий принадлежат к семействам *Vacillaceae/Paenibacillaceae*.

3. Из термального источника Сеоя выделен и описан предположительно новый вид алкалотермофильной органотрофной бактерии с 98,4% сходства с *Anoxybacillus flavithermus* и 98,9% с *Anoxybacillus eryuanensis*, способной к росту при рН 6,0-10,3 и температуре 37-60°C.

4. По результатам анализа функциональных групп активного центра, физико-химических свойств и субстратной специфичности показано, что секретируемые ферменты относятся к сериновым пептидазам семейства субтилизина. Анализ очищенных препаратов пептидаз показал, что исследуемые ферменты отличаются высокой рН (6,5-11,5) и температурной стабильностью (23-60°C), что позволяет им в природе осуществлять деструкцию ОВ при смене экологических условий в экосистеме.

5. Штаммы бактерий из содово-соленых озер Соленое и Нухэ-Нур обладают высокой ингибирующей активностью пептидаз, в отличие от термофильных бактерий.

6. Функциональная роль исследованных бактерий определяется субстратной специфичностью гидролитических ферментов и высокой метаболической активностью в отношении используемых субстратов.

### Список работ, опубликованных по материалам диссертации

#### Статьи в рецензируемых журналах:

1. Лаврентьева Е.В., Дунаевский Я.Е., Козырева Л.П., Раднагуруева А.А., Намсараев Б.Б. Внеклеточная протееолитическая активность бактерий, выделенных из содово-соленых озер Забайкалья // Прикладная биохимия и микробиология, 2010. Т. 46. №6. С. 630-636.
2. Лаврентьева Е.В., Раднагуруева А.А., Намсараев Б.Б. Протеазная активность *Vacillus hemicellulosolyticum* // Вестник Бурят. госунивер., 2010. Вып. 4. «Биология, география». С. 99-101.
3. Раднагуруева А.А., Лаврентьева Е.В., Намсараев Б.Б., Дунаевский Я.Е. Взаимодействие протеаз с синтетическими химическими субстратами у термофильной бактерии Se-1-10 // Вестник Бурят. госунивер., 2010. Вып. 3. «Химия, физика». С. 5-7.
4. Раднагуруева А.А., Лаврентьева Е.В., Намсараев Б.Б., Дунаевский Я.Е. Биохимическая характеристика культуры Um-09m // Вестник Бурят. госунивер., 2011. Вып. 3. «Химия, физика». С. 94-97.
5. Лаврентьева Е.В., Бабасанова О.Б., Раднагуруева А.А., Намсараев Б.Б. Гидрохимические и биохимические характеристики гидротерм Баргузинской долины // Вестник Бурят. госунивер., 2008. Вып. 3. «Химия, физика». С. 19-24.
6. Раднагуруева А.А., Лаврентьева Е.В., Дунаевский Я.Е. Протееолитическая активность алкалофильных микроорганизмов водных систем Забайкалья. Вестник Бурят. госунивер., 2009. Вып. 4. «Биология, география». С. 98- 101.
7. Лаврентьева Е.В., Раднагуруева А.А., Намсараев Б.Б., Дунаевский Я.Е. Биохимические характеристики микроорганизмов щелочных гидротерм Прибайкалья // Вестник Бурят. госунивер., 2009. Вып. 3. «Химия, физика». С. 11-14.
8. Раднагуруева А.А., Лаврентьева Е.В. Внеклеточная протеазная активность в природных образцах термальных источников Прибайкалья // Известия Иркутского госунивер., 2009. Сер. «Науки о Земле». Т. 2. №2. С. 162-166.

#### Монографии:

9. Лаврентьева Е.В., Дунаевский Я.Е., Раднагуруева А.А. Внеклеточная протееолитическая активность гало-алкалофильных бактерий // Солончатые и соленые озера Забайкалья: гидрохимия, биология, 2009. Изд-во Бурят. госунивер.. С. 157-166.

#### Тезисы:

10. Лаврентьева Е.В., Раднагуруева А.А., Дунаевский Я.Е. Внеклеточная протеазная активность алкалофильных и алкалолелерантных бактерий содово-соленых озер Забайкалья // Материалы 6 Международной научной конференции «Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии». Минск: Изд-во «МикроБио», 2-6 июня 2008. Т. 1. С. 326-328.
11. Лаврентьева Е.В., Раднагуруева А.А. Внеклеточная протеазная активность алкалолелерантных бактерий, выделенных из содово-соленых озер Забайкалья // Материалы 4 молодежной школы-конференции с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии». Москва: Изд-во ООО «МАКС Пресс», 20-22 октября 2008. С. 29-30.
12. Раднагуруева А.А., Лаврентьева Е.В. Внеклеточная протеазная активность в природных образцах термальных источников Прибайкалья // Материалы Всероссийского симпозиума с международным участием «Современные проблемы фи-

зиологии, экологии и биотехнологии микроорганизмов». Москва: Изд-во ООО «МАКС Пресс», 24-27 декабря 2009. С. 156.

13. Lavrentieva E.V., Radnagurueva A.A., Namsaraev B.B Characteristics of proeolitic bacteria from hydrothermal vent of Tsenkher (Central Mongolia) // 1 International conference "Survey of Mongolian aquatic ecosystems in a changing climate: Results, new approaches and future outlook". Ulaanbaatar, Mongolia, 7-10 april 2010. P. 21.

14. Раднагурева А.А., Лаврентьева Е.В. Биохимическая характеристика культуры Se-1-10, выделенной из термального источника Сея // Материалы всероссийской конференции с международным участием «Современные проблемы микробиологии Центральной Азии». Улан-Удэ: Изд-во Бурят. госунивер., 27-28 мая 2010. С. 153.

15. Раднагурева А.А., Лаврентьева Е.В., Намсараев Б.Б. Внеклеточная протеазная активность микроорганизмов гидротерм Байкальской рифтовой зоны // Материалы 17 Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов». Москва: Изд-во ООО «МАКС Пресс», 12-15 апреля 2010. С. 167.

16. Раднагурева А.А., Лаврентьева Е.В., Намсараев Б.Б. Протеазная активность культуры *Bacillus* sp., выделенной из термального источника Сея (Северное Прибайкалье) // Актуальные аспекты современной микробиологии: материалы VI молодежной школы-конференции с международным участием. Москва: Изд-во ООО «МАКС Пресс», 2010. С. 56-58.

17. Лаврентьева Е.В., Раднагурева А.А., Дунаевский Я.Е. Гидролитическая активность микроорганизмов горячих источников Байкальской рифтовой зоны // Материалы международной конференции «Экология и геохимическая деятельность микроорганизмов экстремальных местообитаний». Улан-Удэ и Улан-Батор: Изд-во Бурят. госунивер., 5-16 сентября 2011. С. 118-119.

18. Раднагурева А.А., Лаврентьева Е.В. Алкалотермофильные бактерии из горячих источников Байкальской рифтовой зоны // Материалы международной конференции «Экология и геохимическая деятельность микроорганизмов экстремальных местообитаний». Улан-Удэ и Улан-Батор: Изд-во Бурят. госунивер., 5-16 сентября 2011. С. 152-153.