

На правах рукописи

СУСЛОВА Мария Юрьевна

**РАСПРОСТРАНЕНИЕ И РАЗНООБРАЗИЕ СПОРООБРАЗУЮЩИХ
БАКТЕРИЙ РОДА *BACILLUS*
В ВОДНЫХ ЭКОСИСТЕМАХ**

03.00.16 – экология
03.00.07 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Улан-Удэ, 2007

Работа выполнена в лаборатории водной микробиологии Лимнологического института СО РАН, г. Иркутск

Научный кандидат биологических наук
руководитель: ст.н.с. Парфенова Валентина Владимировна

Официальные Доктор биологических наук
оппоненты: Профессор Намсараев Баир Бадмабазарович

Кандидат биологических наук
Калашникова Ольга Михайловна

Ведущая организация: Дальневосточный государственный университет,
кафедра общей экологии, Владивосток

Защита состоится «16» мая 2007 г. в 16.00 часов на заседании
Диссертационного совета при Бурятском государственном университете по
адресу: 670000, г. Улан-Удэ, ул. Смолина, 24а, биолого-географический
факультет, конференц-зал
Факс: (3012)210588.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Бурятского
государственного университета.

Автореферат разослан «13» апреля 2007 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Н.А. Шорноева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Бактерии рода *Bacillus* вызывает большой интерес микробиологов по причине повсеместного распространения представителей этого рода, цикла развития, необычной устойчивости их спор к химическим и физическим агентам и патогенности.

В настоящее время проводится широкий спектр исследований представителей данных бактерий, в т.ч. ввиду того, что гетерогенность по физиологическим, экологическим и генетическим характеристикам затрудняет классификацию бактерий рода *Bacillus*.

Несомненно, огромный интерес представляет изучение механизмов устойчивости спор к различным физическим и химическим факторам. Споры с момента обнаружения были признаны самой выносливой среди известных форм жизни на Земле. В состоянии покоя споры метаболизма нет и показывают высокую степень устойчивости к инактивации различными физическими факторами, включая влажный пар, высушивание, ультрафиолетовое и гамма-излучение, вакуум и окисляющие агенты (Nicholson et al, 2000). Несмотря на инактивацию метаболизма, споры остаются способными к непрерывному контролю пищевого состояния их среды и быстро реагируют на поступление подходящих питательных веществ, прорастая и возобновляя вегетативный рост. Покоящиеся споры показывают невероятную долговечность и могут быть обнаружены фактически в любом типе среды обитания на Земле. Например, споры строго термофильного *Bacillus* spp. были изолированы из осадков холодных озёр (Nicholson et al, 2000). Имеются спорные сообщения о том, что жизнеспособные споры *Bacillus sphaericus* были восстановлены из кишки пчелы в Доминиканском янтаре, возраст которого от 25 до 40 миллионов лет (Fischman, 1995; Cano, Borucki, 1995).

Группа спорообразующих бактерий в озере Байкал и других экосистемах изучена недостаточно. Было показано, что эта группа составляет до 20% в составе микробного сообщества этого озера. Бактерии рода *Bacillus* в основном выделяли из придонных слоев воды и донных осадков (Максимова, Максимов, 1989). По результатам молекулярно-генетического анализа из глубоководной пробы воды, отобранной на центральной станции Южного Байкала, были получены всего 3 последовательности, отнесенные к роду *Bacillus* с невысоким процентом гомологии с ближайшими родственниками (Белькова и др., 1996). Термальные источники – это особая экологическая ниша, сообщество микроорганизмов которых является уникальным. И потенциальная ферментативная активность этих термофильных бактерий представляет несомненный интерес. Так, например, из гидротермальных источников Змеиный и Горячинский были выделены специфичные эндонуклеазы рестрикции из *Bacillus stearothermophilus* (Репин и др., 2001). В донных осадках озера Хубсугул бактерии рода *Bacillus* ранее не изучались. Была

проведена работа по определению ферментативной активности донного микробного сообщества (Maximov, 2006).

Исходя из показанной особой устойчивости спор, исследование спорообразующих бактерий в экстремальных условиях высоких и низких температур представляет особый интерес.

Цель и задачи исследования. Цель данной работы – установить распространение, видовой состав и физиолого-биохимическую активность бактерий рода *Bacillus* в экосистемах озера Байкал, озера Хубсугул и термальных источниках Прибайкалья.

Для выполнения данной цели были поставлены следующие задачи:

- изучить распространение исследуемой группы бактерий в воде и осадках оз. Байкал;
- установить закономерности распределения бактерий в районах нефтепроявлений и влияния реки Селенги, содержащей промышленные и бытовые стоки;
- исследовать численность, распределение и разнообразие бактерий рода *Bacillus* в донных осадках оз. Хубсугул;
- отработать метод культивирования и изоляции спорообразующих бактерий из термальных источников Прибайкалья;
- сформировать коллекцию чистых культур бактерий р. *Bacillus* из исследуемых водных объектов и определить их видовой состав и ферментативную активность;
- изучить активность штаммов в процессах деградации различных органических соединений и в процессах биоминерализации в условиях лабораторного эксперимента.

Научная новизна. Впервые группа бактерий рода *Bacillus* показана в различных природных экосистемах озера Байкал, озера Хубсугул и термальных источниках Прибайкалья. Проведено систематическое определение видового состава. Впервые бактерии данной группы выявлены в термальных источниках, отработаны методы их изолирования при высоких температурах, определена ферментативная активность. Впервые установлена роль представителей этой группы в процессах деструкции «байкальской нефти», полициклических ароматических углеводородов, фталатов и биоминерализации соединений кремния.

Практическая значимость. Сформирована коллекция культур бактерий рода *Bacillus*, изолированных из озера Байкал, Хубсугул и термальных источников. Их способность деградировать различные органические соединения – нефть, полициклические ароматические углеводороды (ПАУ), фталаты – и высокая ферментативная активность могут быть использованы в практических целях. Кроме того, бактерии рода *Bacillus* могут быть использованы в экологическом мониторинге как показатели поступления органического вещества.

Защищаемые положения:

1. Бактерии рода *Bacillus* обнаружены во всех исследуемых природных объектах, составляя значительную долю в культивируемом гетеротрофном сообществе оз. Байкал, оз. Хубсугул и термальных источниках Прибайкалья. Видовой состав бактерий рода *Bacillus* в оз. Байкал представлен тремя известными в науке филогенетическими группами данного рода (*B. subtilis* группа I, *B. alvei* группа II, *B. brevis* группа III), а в оз. Хубсугул – одной (*B. subtilis* группа I).

2. Бактерии рода *Bacillus* обладают большим биологическим потенциалом и принимают активное участие в процессах деструкции сложных органических соединений и биоминерализации соединений кремния.

Апробация работы и публикации. Результаты работы были представлены на I микробиологическом конгрессе Европейского микробиологического общества, проходившем в Любляне, Словения (июнь–июль, 2003), на международном Байкальском микробиологическом симпозиуме «Микроорганизмы в экосистемах озер, рек и водохранилищ», проходившем в Иркутске (сентябрь, 2003), на научно-практическом совещании «Перспективы нефтегазоносности Байкала и Западного Забайкалья», г. Улан-Удэ (октябрь, 2003), на межрегиональной научно-практической конференции «Биология микроорганизмов и их научно-практическое использование», г. Иркутск (октябрь, 2004), посвященной 90-летию со дня рождения проф. А. Г. Гриневич, на Четвёртой Верещагинской Байкальской конференции, г. Иркутск (сентябрь-октябрь, 2005), на международной конференции «Проблемы биодеструкции техногенных загрязнителей окружающей среды», г. Саратов (сентябрь, 2005) и на IX Съезде гидробиологического общества РАН, проходившем в г. Тольятти (сентября, 2006). По материалам диссертации опубликовано 11 работ (из них 3 статьи в рецензируемых журналах).

Структура и объем работы. Диссертационная работа состоит из введения, обзорного анализа литературы, 3 глав собственных исследований, заключения, выводов, списка использованной литературы (127 источников, из них 42 – зарубежных) и 8 приложений. Объем работы составляет 163 страниц машинописного текста, включающего 5 таблиц, 34 рисунков и 8 приложений.

Автор выражает сердечную благодарность научному руководителю, зав. лабораторией водной микробиологии к.б.н. Парфеновой В. В., к.б.н. Земской Т. И. за помощь в проводимых исследованиях, д.б.н. Лихошвай Е. В., к.х.н. Горшкову А. Г., ст.н.с. Верещагину А. Л., к.б.н. Павловой О. Н., Хлыстову О. М., к.г.н. Федотову А. П. и всем сотрудникам лаборатории водной микробиологии Лимнологического института СО РАН за оказанную поддержку и сотрудничество при выполнении работ.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ГЛАВА 1. Обзорный анализ литературы

Приведены литературные данные по таксономии и физиолого-биохимической характеристике бактерий рода *Bacillus*. Проанализированы вопросы о степени изученности бактерий рода *Bacillus* в рассмотренных экосистемах, а также о феномене устойчивости спор к различным факторам окружающей среды.

ГЛАВА 2. Объекты и методы исследования

Объектами данного исследования являются озеро Байкал, гидротермальные источники Котельниковский, Хакусы, Змеиный (рис. 1) и озеро Хубсугул в Монголии.

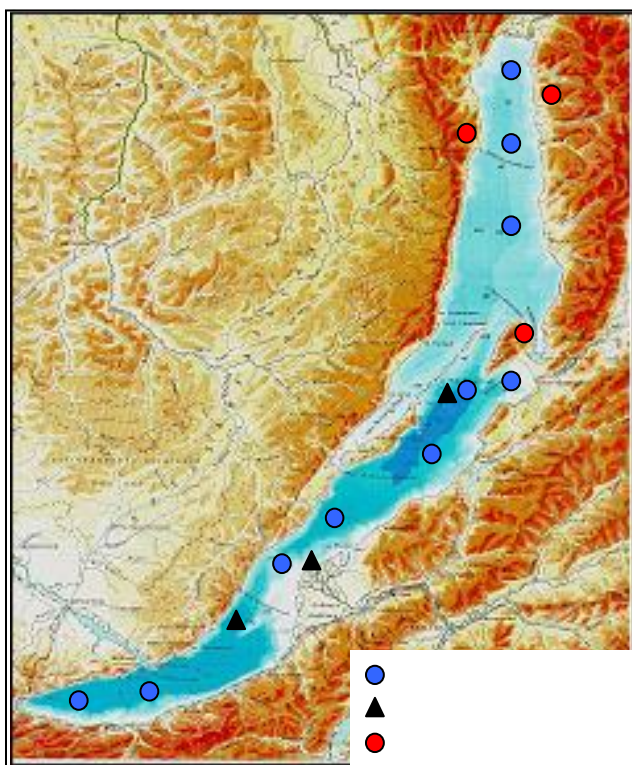


Рис. 1. Места отбора проб воды и донных осадков в озере Байкал

Пробы воды и донных осадков отбирали и обрабатывали в 2000 – 2006 гг. по общепринятым методикам (Романенко, Кузнецов, 1974; Кузнецов, Дубинина, 1989). Водные образцы отбирали в стерильные флаконы батометром, донные отложения – дночерпателем, бентосными и гравитационными трубками. За весь период исследования было отобрано и проанализировано около 1000 проб байкальской воды, 300 проб донных осадков и 20 проб воды и бактериальных матов термальных источников. Распределение, численность гетеротрофов и бактерий рода *Bacillus*, видовой состав данного рода были изучены в пробах воды, отобранных на стандартных гидрологических разрезах по всей

вертикали от поверхностного до придонных слоев Южного, Среднего и Северного Байкала (рис. 1). Особое внимание уделено придельтовому району реки Селенга и району нефтепроявления, где проанализированы пробы воды и донных осадков. Также подробно исследовали керн донных отложений глубинного бурения, отобранных в районе Посольской банки и в озере Хубсугул.

Для выделения бактерий рода *Bacillus* из природных образцов использовали рыбо-пептонный агар, разбавленный в 10 раз (Горбенко, 1961). На данной среде изучали две группы микроорганизмов: гетеротрофов и

представителей рода *Bacillus*. На использованной в работе питательной среде проводили отбор колоний, типичных для *Bacillus*. Признаки, констатирующие принадлежность исследуемых штаммов к роду *Bacillus*: палочковидная форма клеток, спорообразование, положительная окраска по Граму, наличие каталазы, аэробность роста. Дополнительные признаки изучали для видовой идентификации бактерий рода *Bacillus*: посев на среду Хью-Лейфсона для определения способности окислять либо ферментировать углеводы. Дополнительные признаки для идентификации бацилл включают: наличие амилазы, нитратредуктазы, протеазы, выявление пигментообразования, способность роста при +65, +50, +5°C, способность роста на РПА с 7% NaCl, а также в анаэробных условиях. Обязательным признаком в идентификации является V-P реакция (Родина, 1965). Также учитывали наличие параспоральных тел в спорангии, которые определяют принадлежность к энтомопатогенным видам рода *Bacillus* (Определитель бактерий Берги, 1997).

При выделении термофильных бацилл использовали метод накопительной культуры, применяя селективные среды с последующим высевом на твердую среду содержащую 1 % Gelrit (DUCHEFA BIOCHEMIE) и 0.5 % агара. Температура инкубации составила +53°C. Пропорциональный состав gelrit и агара подбирали опытным путем, который позволял среде легко плавиться для посева и не разжижаться в термостате при высоких температурах.

Описаны методы выделения углеводородокисляющих микроорганизмов, проведения экспериментов по деградации 3-х полициклических ароматических углеводородов (пирена, фенантрена и флуорантена) и бис-(2-этилгексил) фталата. Отработан метод выделения бактерий, способных растворять силикаты кальция и проведения эксперимента по деградации бактериями оболочек диатомовых водорослей.

Статистическую обработку данных проводили по стандартным методикам (Рождественский, Чеботарев, 1974) с использованием программного пакета Microsoft Excel 7.0 для Windows 98. Эксперименты проводили в трех повторях. Для полученных данных рассчитывали среднее значение, среднее квадратичное отклонение. При оценке погрешности определения ПАУ, обрабатывали и анализировали эксперименты с 5 штаммами микроорганизмов по три параллельных опыта для каждой культуры. Расчет дисперсии сходимости определения ПАУ проводили по относительным отклонениям результата анализа от среднего значения для каждого штамма. Выводы сделаны с учетом уровня значимости $\alpha = 0.05$.

ГЛАВА 3. Распространение, биоразнообразие и физиолого-биохимическая характеристика представителей рода *Bacillus* в воде, донных осадках озера Байкал и термальных источниках Прибайкалья

Изучение динамики развития и пространственного распределения бактерий рода *Bacillus* в воде озера Байкал связано с необходимостью

определения их доли в культивируемом микробном сообществе, а также роли в экосистеме озера. Исследования проводили в августе 2003 г. и июле 2004 г. (рис. 2).

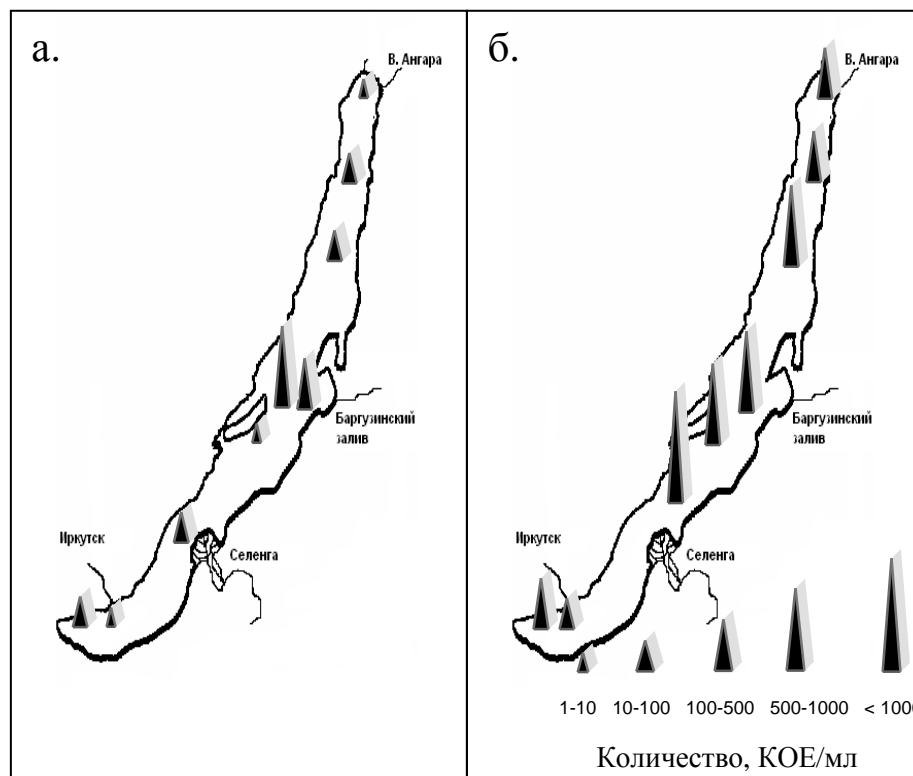


Рис. 2. Пространственное распределение бактерий рода *Bacillus* в поверхностном слое оз. Байкал (а – 2003 г., б – 2004 г.).

Пространственное распределение бактерий рода *Bacillus* зависило от экологических факторов: места отбора проб, глубины водной толщи, сезонных закономерностей. Нами установлено, что бактерии исследуемого рода распределены в Байкале неравномерно. Максимальное количество данных бактерий обнаружено в северной, а минимальное - в южной котловине озера. В Среднем Байкале бактерии рода занимали незначительное положение. В Северном Байкале представители рода *Bacillus* преобладали в гетеротрофном сообществе, составляя в среднем 31% в 2003 г и 47% в 2004 г. На станции Академический хребет вертикальное распределение исследуемой группы коррелировало с распределением гетеротрофных бактерий и в среднем по численности составило 35 %. В южной котловине численность бацилл не превышает 152 кл/мл и составляет 13.5 % от числа гетеротрофных бактерий. Вертикальный срез показал, что в августе 2003 г. бактерии рода *Bacillus* были сконцентрированы в придонных слоях, а в июне 2004 г. в поверхностных слоях (рис. 2).

Микробиологические исследования, проведенные на акватории Селенгинского мелководья, позволяют сделать вывод, что барьером на пути поступления загрязненных и богатых органическим веществом речных вод в озеро, скорее всего, является сама дельта. Основной процесс деструкции

органического вещества происходит в дельте, богатой микроорганизмами, с численностью в воде несколько тысяч клеток в 1 мл, на выходе в озеро количество бактерий снижается до десятков и единиц клеток в миллилитре воды. В устье, на расстоянии 1 км по всей толще воды и на расстоянии 3 км от устья в поверхностном слое численность спорообразующих бактерий составила от 330 до 105 кл/мл. И в придонных слоях на расстоянии от устья 10, 12 и особенно 14 м, они занимали доминирующее место среди всех культивируемых гетеротрофных микроорганизмов (рис. 3). Бактерии данного рода могут быть показателями распространения речных вод в озере.

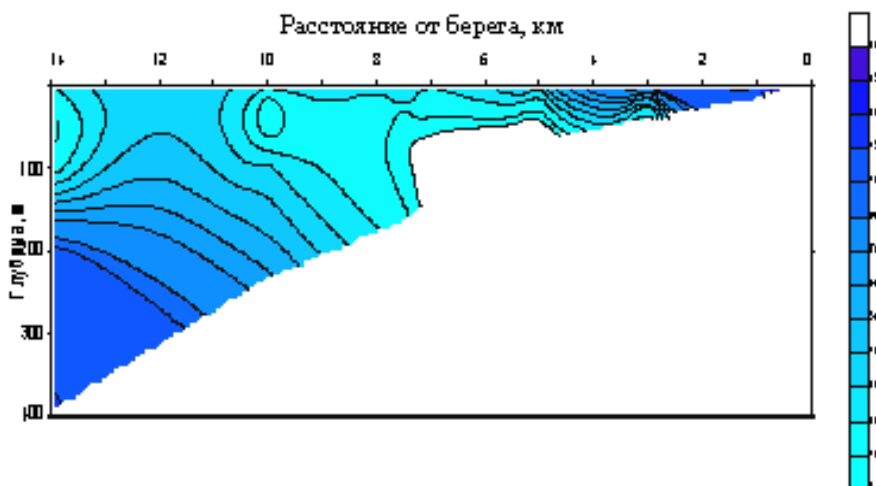


Рис. 3. Распределение спорообразующих бактерий в районе р. Селенги (количество микроорганизмов представлено в кл/мл).

В донных осадках придельтового района р. Селенги отмечено от 0.04% до 53.8% бактерий рода *Bacillus* от количества культивируемых гетеротрофов. На всех исследуемых станциях численность спорообразующих протеолитиков выше, чем численность бацилл, что свидетельствует о деструкции органического вещества белковой природы не только в самой дельте реки, но и в исследуемом районе, где с её водами органика выносится в придельтовый район.

Вызывает научный интерес анализ распределения бактерий рода *Bacillus* в донных осадках, отобранных в Южном Байкале (Посольская банка) в июле 2001 г. Толщина донного осадка составила 316 см. Пробы глубинного керна культивировали при разных температурных режимах: 4, 16, 25 и 37°C. Были получены данные по численности и распределению спорообразующих бактерий по всей толще осадка. При 4°C по всему профилю преобладали нулевые значения. При 16°C выделяли два основных пика численности бактерий рода *Bacillus*, максимальный пик равен 2500 кл/г на глубине 41–44 см. С глубиной их численность снижается до нуля. При температуре 25°C отметили серию пиков с постепенно снижающимися их значениями при максимуме 7600 кл/г (на 7–8 см). Но, как и в предыдущем случае, с увеличением глубины численность снижается до нуля. При 37°C максимальная численность составила 1300 кл/г, но в более глубоких слоях

колонки она повышалась в виде серии пиков с численностью, равной 1140 кл/г. Во временном срезе, с учетом скорости накопления осадка, в голоценовых осадках присутствуют большие количества (до 7.6 тыс. кл/г грунта) бактерий рода *Bacillus*, способных расти при 16, 25, 37°C. В плейстоценовых осадках, относящихся к последнему ледниковью (18 тыс. лет назад, 250-350 см), были найдены жизнеспособные споры микробов рода *Bacillus*, размножающихся при 37°C (рис. 4). Для определения оптимальной температуры роста штаммов, изолированных из глубинных горизонтов, был поставлен эксперимент, по результатам которого можно сказать, что оптимальная температура роста составила 37°C.

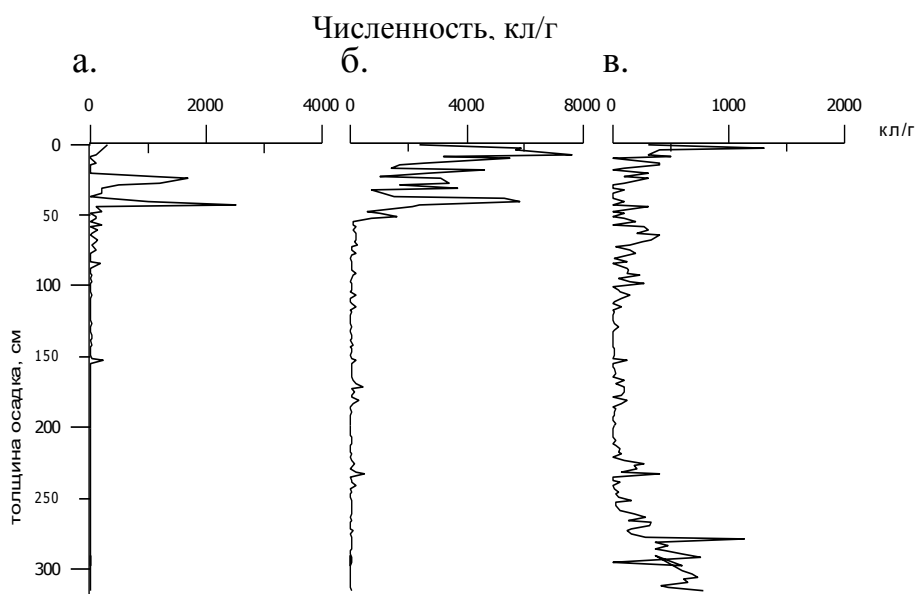


Рис. 4. Распределение бактерий рода *Bacillus*, изолированных из донных осадков Посольской банки при температурах 16°C – а, 25°C – б и 37°C – в.

Также изучали распределение спорообразующих бактерий в донных осадках в районе Академического хребта в 2001 и в 2002 годах. В поверхностных слоях численность бактерий рода *Bacillus* высокая и составила 2600 и 4000 кл/г. грунта. С увеличением глубины их численность падает. Вероятно, это связано с тем, что в верхних слоях донных осадков, куда проникает кислород, распространены аэробные протеолитики. Как известно, изучаемая группа относится к активным протеолитикам.

Биоразнообразие бактерий рода *Bacillus*, изолированных из воды и донных осадков оз. Байкал, представлено следующими видами: *B. subtilis*, *B. alvei*, *B. mycoides*, *B. cereus*, *B. esterificans*, *B. polymyxa*, *B. mesentericus*, *B. mesentericus niger*, *B. mesentericus ruber*, *B. megaterium*, *B. pumilis*, *B. brevis*, *B. coccoides*, *B. benzoovorans*. За время проведения исследований было выделено 300 чистых культур, отнесённых к роду *Bacillus*, 100 из которых были идентифицированы до вида, остальные 200 определить до вида не удалось, т.к. в совокупности полученные диагностические признаки не характерны для стандартных видов, представленных в определителе Берги.

Для уточнения отношения этих полученных штаммов к исследуемому роду совместно с учеными из Кангвонского университета была проведена работа по использованию флуоресцентной гибридизации *in situ* (DuTeau, 1998). На первом этапе были отработаны оптимальные условия гибридизации с чистыми культурами, выделенными нами из донных осадков озера. Было показано, что предгибридизационная обработка клеток бацилл додецилсульфатом натрия предпочтительнее, а оптимальная концентрация формамида – 30%. Всего было протестировано 40 штаммов бацилл и показано, что все исследуемые нами культуры гибридизуются с предложенным зондом (рис. 5), т.е. изолированные бактерии принадлежат к исследуемому роду. В дальнейшем планируется провести гибридизацию с природными образцами и отработать оптимальные условия для количественной детекции бацилл в воде и осадках озера Байкал.

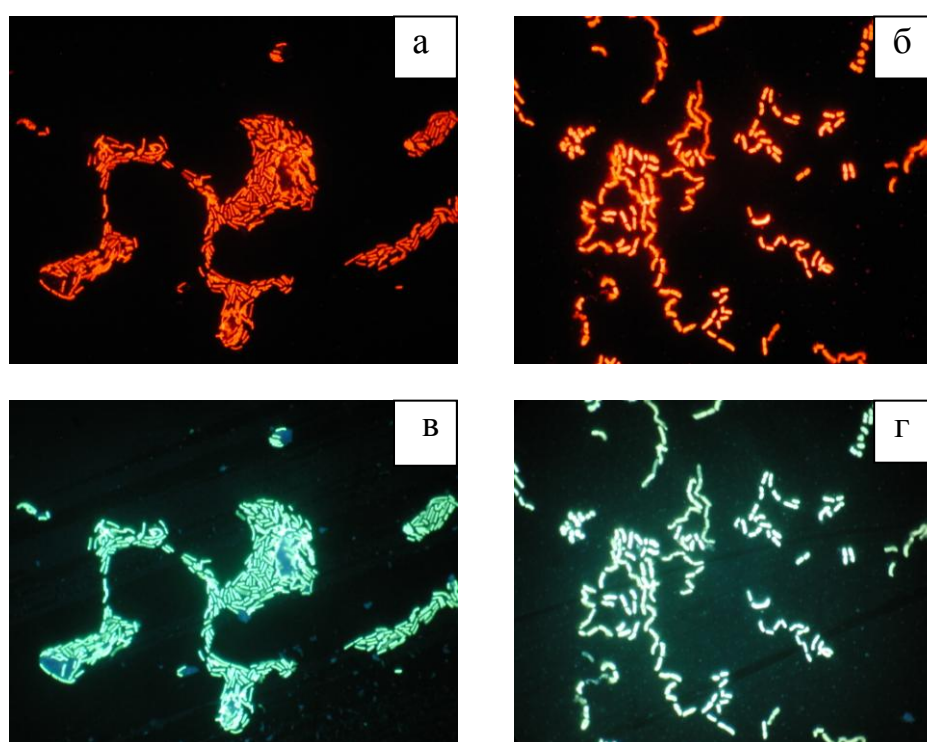


Рис. 5. Гибридизация *in situ* двух чистых культур рода *Bacillus* (а, б – клетки, окрашенные специфичным зондом; в, г – клетки, окрашенные по ДАФИ)

Одним из распространенных видов бактерий рода *Bacillus* является *B. subtilis*, изолированный как из воды, так и из проб донных осадков. Так же повсеместно, но в небольшом количестве были выделены бактерии *B. cereus*. *Bacillus megaterium*, был выделен из глубинных (316 см) слоёв донных осадков (рис. 6). Размеры клеток $1.2-1.5 \times 3-7$ мкм. Споры овальные или продолговатые, $1.5 \times 0.7-1.0$ мкм, расположены эксцентралью, часто – поперёк клеток или в косом направлении. Встречаются культуры с веретеновидными клетками, т.е. с суженными концами. Отличительной чертой данного вида является грубозернистое содержимое клеток, много крупных включений жироподобного или гликогенподобного запасного

питательного вещества. Нередко эти включения заполняют почти всю клетку, придавая ей весьма характерное строение (Красильников, 1949).

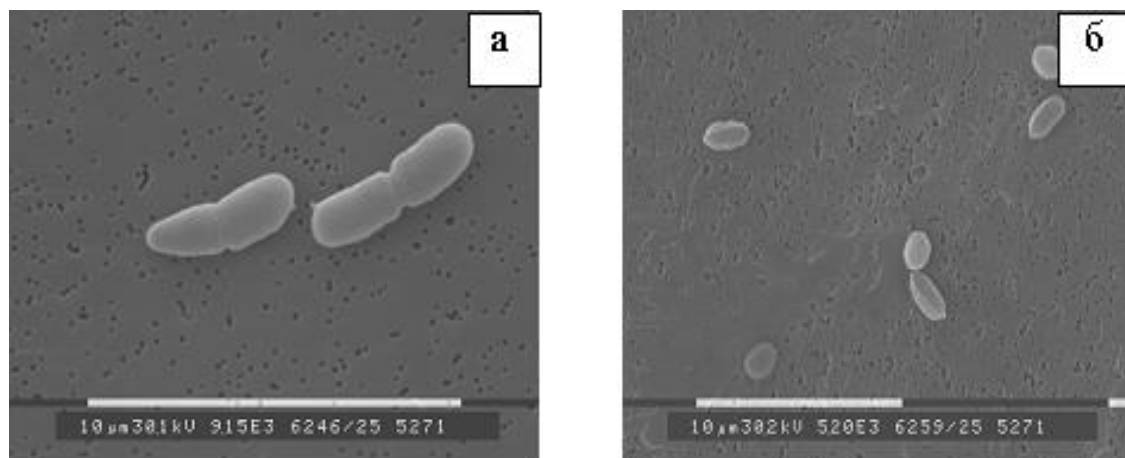


Рис. 6. Морфология *Bacillus megaterium*, выделенных из донных осадков оз. Байкал: а – вегетативные клетки, б – споры (сканирующая электронная микроскопия, увеличение а – 9.15×10^3 , б – 5.2×10^3).

Установлено, что бактерии рода *Bacillus*, изолированные из воды и донных осадков озера Байкал, показали высокую биохимическую активность таких экзоферментов, как протеаза, амилаза, фосфатаза, фосфолипаза, липаза. Протеазной активностью обладают 86% штаммов, амилаолитической – 81% культур. Фосфолипазу «С» и фосфатазу образуют 72 и 76% штаммов, соответственно, липазная активность зафиксирована у 23% исследуемых штаммов. Из всех исследованных штаммов, отнесенных к роду *Bacillus*, 22% культур были активны по всем исследуемым ферментам, и только 2% не проявили никакой активности. Необходимо отметить, что ферментативная активность штаммов, выделенных из донных осадков, выше, чем у штаммов, изолированных из водной толщи озера. Таким образом, проведенные исследования показали, что спорообразующие бактерии, отнесенные к роду *Bacillus*, выделенные из озера Байкал, принимают активное участие в деструкционных процессах, протекающих в озере.

Термофильные микроорганизмы, выделенные из гидротермальных источников Котельниковский, Хакусы и Змеиный, в большинстве своем представлены бактериями рода *Bacillus* и в среднем составляют 53% от культивируемого сообщества. Анализ результатов по культивированию исследуемых микроорганизмов показал, что количество выделенных штаммов из воды или биоматов в большой степени зависит от состава питательных сред, используемых для их культивирования. Вся коллекция термофилов была протестирована на потенциальное наличие ферментативных активностей: лецитиназная и амилазная активности обнаружены у 69 и 46% культур, фосфатазную, протеазную и липазную активности показали более 80% всех штаммов, культивируемых при 53С.

ГЛАВА 4. Бактерии рода *Bacillus* в донных осадках оз. Хубсугул

Микробиологический анализ донных осадков озера Хубсугул заключался в выделении и распределении численности бактерий рода *Bacillus* при разных температурных режимах: 37, 25 и 4°C (рис. 7). С уменьшением температуры численность исследуемой группы бактерий увеличивалась. При температуре 37°C максимальное количество составило 1400 кл/г (рис. 7а), при температуре 25°C численность в два раза возросла и ее значения варьировали около 3500 кл/г (рис. 7б). Численность психрофильных микроорганизмов увеличилась больше, чем в 2 раза и составила 8500 кл/г (рис. 7в).

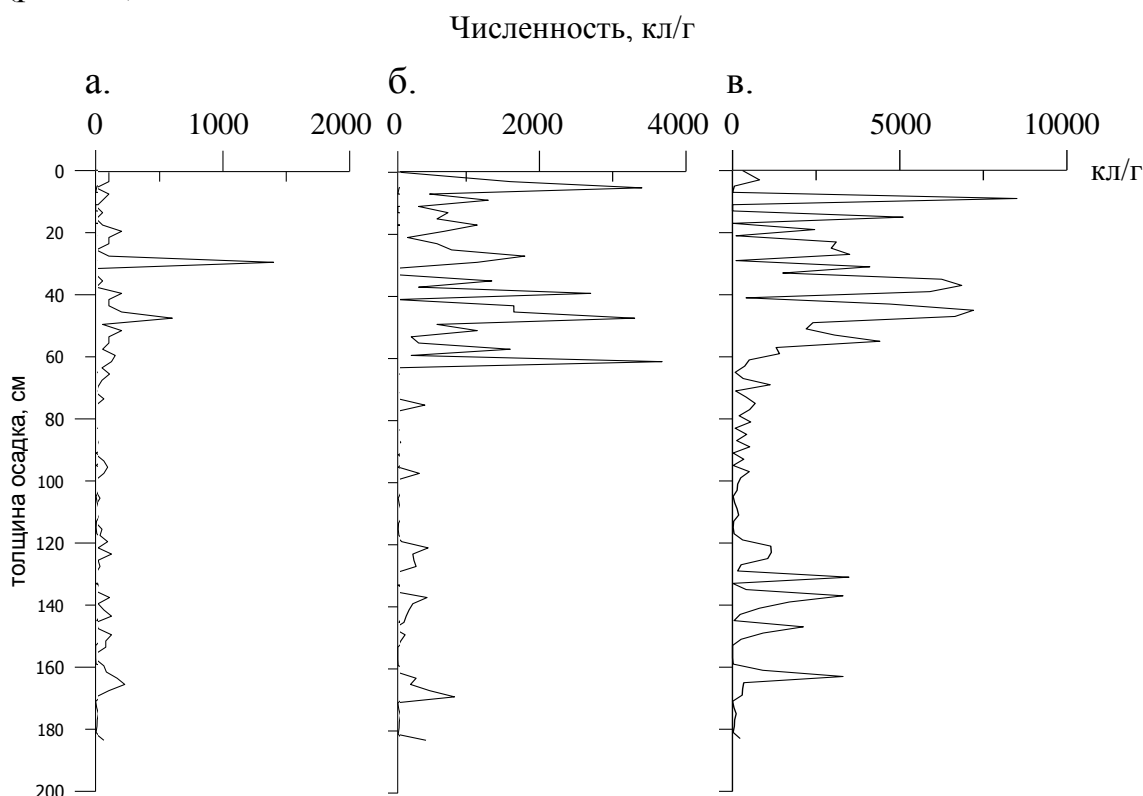


Рис. 7. Распределение численности бактерий рода *Bacillus*, выделенных из озера Хубсугул при температурах 37°C (а), 25°C (б) и 4°C (в).

Рассматривая данную диаграмму (рис. 7в), во временном срезе с учетом скорости осадконакопления, в голоценовых отложениях спорообразующие бактерии, присутствуют в большом количестве (до 8.5 тыс. кл/г грунта), в плейстоценовых осадках, относящимся к последнему ледниковью (с 16 по 25 тыс. лет назад, 53-123 см) численность была не значительной, а на стадии теплого климата опять наблюдается серия пиков численности. Данный анализ, предполагает возможность использовать изучаемую группу бактерий в качестве палеомаркера.

Было выделено 70 чистых культур, которые могут быть отнесены к роду *Bacillus*. Учитывая только морфологические признаки клеток, спор и спорангиев, мы выделили пять основных групп. Преобладали представители

третьей группы – это мелкие грамположительные палочки, при споруляции которых круглая спора раздувает спорангий. В состав этой морфологической группы входят 7 штаммов, видовая принадлежность которых была установлена: это 5 штаммов *Bacillus psychrophilus* (рис. 8) и два штамма *Bacillus globisporus*.

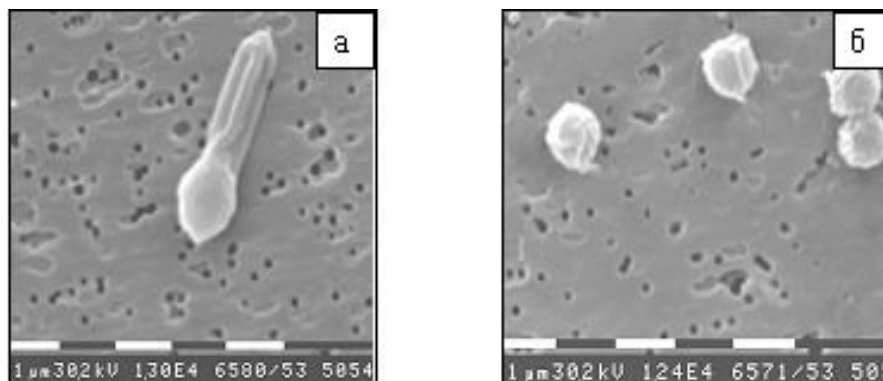


Рис. 8. Морфология спорангия и спор *Bacillus psychrophilus*, выделенного из донных осадков озера Хубсугул (сканирующая микроскопия: а – спорангий, увеличение 1.3×10^4 , б – спора, увеличение 1.2×10^4)

Все выделенные культуры были проанализированы на наличие потенциальной активности следующих ферментов: протеазы, лецитиназы, фосфатазы, липазы и амилазы. Протеолитическую активность при разжижении желатины показало наибольшее количество штаммов и составило 69% от общего количества всех проанализированных культур, а при пептонизации молока этот процент был самый низкий – 3%. Лецитиназной активностью обладали 24% штамма, фосфатазной – 43%. Амилолитические и липолитические ферменты были обнаружены у 34% исследуемых бактерий рода *Bacillus*. Шестнадцать штаммов (23%) не показали ферментативную активность. Не выделены штаммы, которые обладали бы всеми исследуемыми ферментативными активностями.

ГЛАВА 5. Роль микроорганизмов рода *Bacillus* в биодegradации сложных органических соединений и растворении соединений кремния

В последние десятилетия возрос интерес к микроорганизмам-деструкторам различных высокомолекулярных соединений. Загрязнение окружающей среды нефтью, нефтепродуктами, полициклическими ароматическими углеводородами (ПАУ) является проблемой мирового масштаба и в настоящее время остается одной из сложных и многоплановых в экологии и охране окружающей среды. Разрабатываются различные методы очистки от нефтяных загрязнений – механические, физико-химические, биологические. В настоящее время разрабатываются микробиологические методы, основанные на использовании ферментативной активности

микроорганизмов-деструкторов, использующих высокомолекулярные соединения в качестве единственного источника углерода.

Изучение и изоляция из озера Байкал бактерий рода *Bacillus*, обладающих углеводородокисляющей активностью, позволит оценить роль данной группы в процессах очищения и поддержания чистоты байкальских вод.

Изучение распространения углеводородокисляющих микроорганизмов показало, что их распределение в районе нефтепроявлений (рис. 9) пятнистое. Количество культивируемых углеводородокисляющих микроорганизмов в районе самого нефтяного пятна незначительно – до 100 кл/мл; число гетеротрофов, представленных бактериями рода *Bacillus*, достигло 300 кл/мл. Возможно, это объясняется токсическим действием нефти на клетки микроорганизмов и сохранением спор бацилл, устойчивых к неблагоприятным условиям.

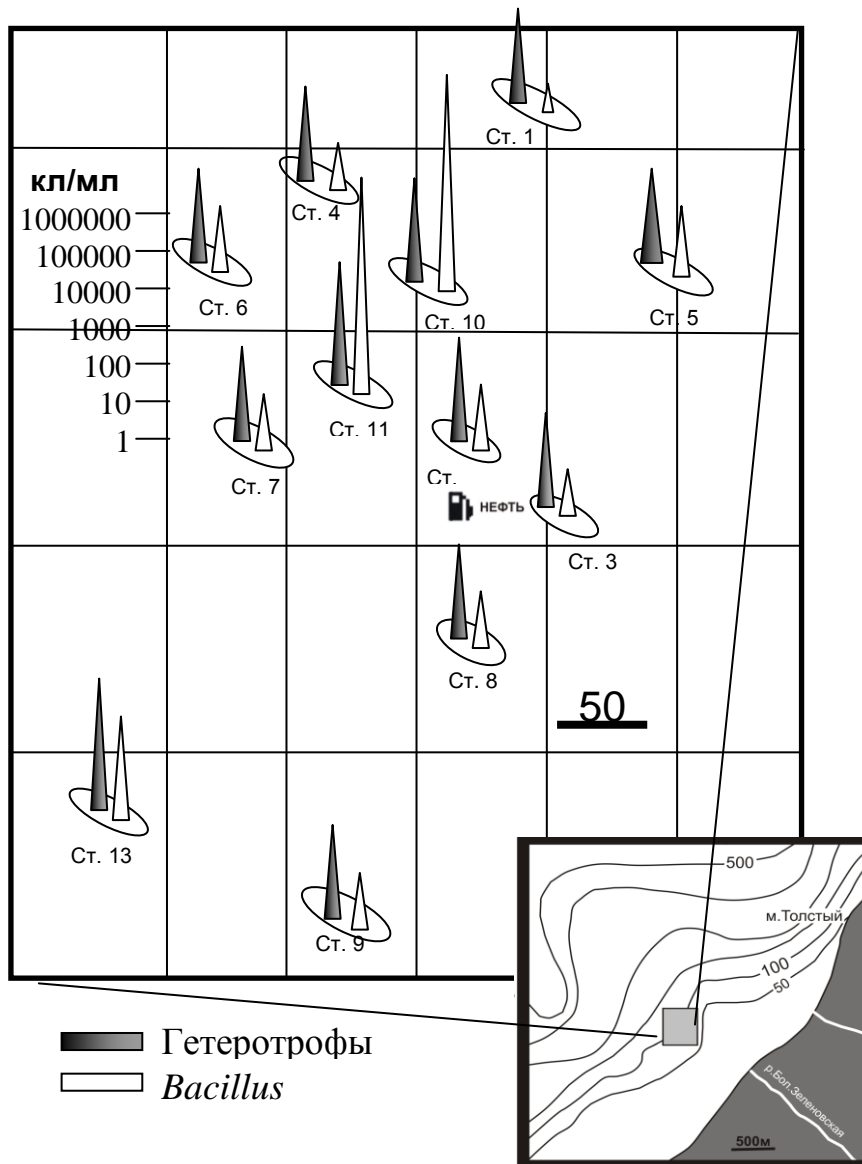


Рис. 9. Распределение гетеротрофных микроорганизмов и бактерий рода *Bacillus* в придонных пробах, отобранных в районе нефтепроявлений, м. Толстый, устье реки Зеленовская.

Также установлено, что в поверхностных пробах воды в районе нефтепроявления численность бактерий, разрушающих углеводороды, колеблется от 13 до 2608 кл/мл. В придонных слоях численность возрастает до 20 тыс. кл/мл. Выделенные микроорганизмы были отнесены к родам *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Bacillus*, и в этой экологической нише бациллы становятся доминирующей группой (рис 9).

Проведенные исследования показали, что культивируемые бактерии рода *Bacillus*, выделенные из донных осадков озера Байкал, способны использовать полициклические ароматические углеводороды в качестве единственного источника углерода и энергии. Степень конверсии в условиях модельного эксперимента составляет 18 – 30%, за исключением штамма № 38, отнесенного к *Bacillus* sp., где конверсия не превышала 2%, причем фенантрен в данных условиях сохранился полностью. Способность селективного действия микроорганизмов на ПАУ наиболее четко прослеживается для штамма № 50 (*Bacillus* sp.), в опытах с которым флуорантен разрушается в 4 раза быстрее, чем фенантрен, и в 2 раза быстрее, чем пирен (рис. 10). Наиболее активным штаммом по отношению к указанным полициклическим ароматическим углеводородам, является штамм № 11, отнесенный к *Bacillus benzoovorans*, где уровень биодеградации флуорантена сопоставим с таковым для пирена и в 2 раза ниже биодеградация фенантрена. На основании результатов модельного эксперимента следует вывод о максимальной биоустойчивости в присутствии байкальских микроорганизмов фенантрена из исследованных ПАУ: фенантрен >> флуорантен ~ пирен.

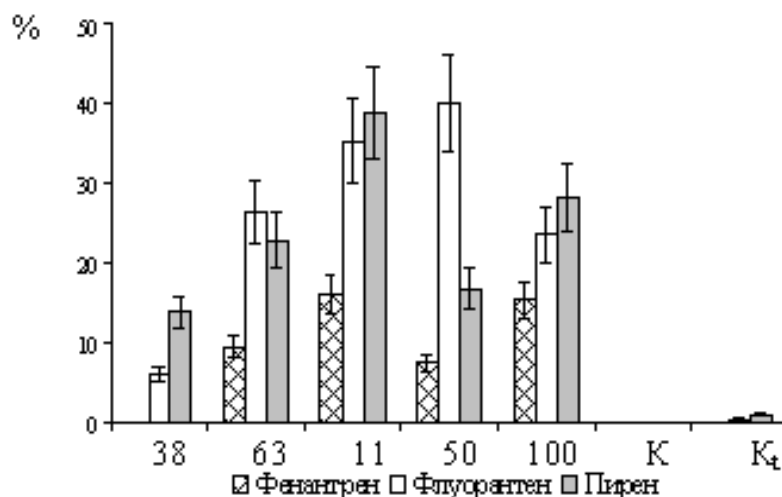


Рис. 10. Дегградация индивидуальных полициклических ароматических углеводородов бактериями рода *Bacillus*.

Наряду с работами по деградации ПАУ были проведены исследования по использованию *бис*-(2-этилгексил)фталат (БЭГФ) микробным сообществом воды р. Селенги и чистыми культурами *Bacillus*. В результате проведенных исследований установлено, что через 18 суток в нестерильной селенгинской воде концентрация фталата составляла 54% от исходной. Для изучения способности чистых культур *Bacillus* к деградации фталата были взяты пять штаммов, два из которых были определены до вида как *Bacillus pumilis* и *B. polytuxa* и три штамма – *Bacillus* sp.; изучение физиолого-биохимических свойств показало, что все штаммы разные. Убыль БЭГФ в растворе за 11 дней составила 17.7–23.3% от добавленного в среду.

Хотя были взяты разные виды микроорганизмов данного рода, процесс деградации прошел с одинаковой скоростью. Количество клеток у четырех из пяти штаммов возросло на порядок, а у одного из них (1ВПБ) – на два порядка. Это позволяет предположить, что спорообразующие микроорганизмы использовали фталат в качестве источника углерода. Возможно, обеспечение постоянного притока биогенных элементов в систему привело бы к более полному разложению БЭГФ. Исследуемые микроорганизмы, несомненно, обладают высоким катаболическим потенциалом в биodeградации органополютантов, обеспечивая чистоту байкальских вод, а само озеро Байкал может стать источником для получения высокоэффективных лабильных штаммов биодеструкторов.

Большой интерес представляют бактерии, способные растворять соединения кремния. И для шести споробразующих культур, выделенных из термального источника Котельниковский, был поставлен эксперимент по деградации панциря диатомовых водорослей чистой культуры *Synedra acus*. Чистые культуры бацилл обладали следующими активностями: штаммы 54 и 55 – протеолитической, штаммы 32 и 140 – амилаолитической, а штаммы 24 и 117 способны растворять силикат кальция. На начальном этапе опыта бактерии окружают клетки диатомовых водорослей. Видимые изменения структуры створок водорослей заметны на 6-й день культивирования (рис.11а). По истечении 14-ти дней тека диатомовых водорослей разрушается (рис.11б). В конце опыта препараты на сканирующей микроскопии также показали разрушение створок исследуемого объекта (рис.11в).

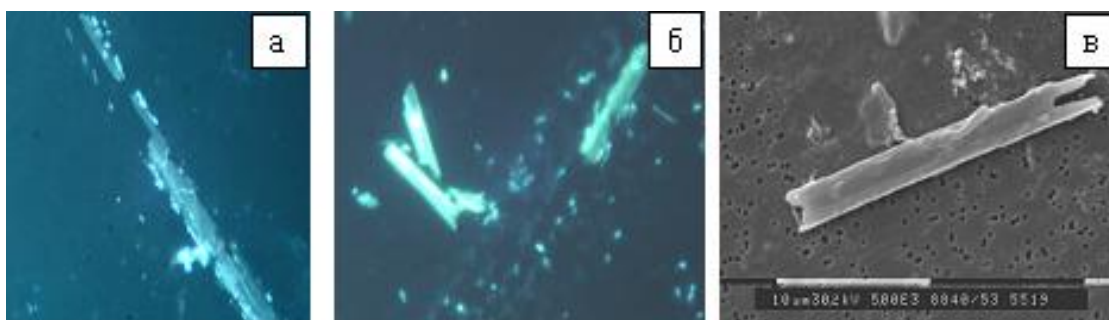


Рис. 11. Части створок диатомовых водорослей при воздействии штамма 24 (а – 6-е сутки опыта, эпифлуоресцентная микроскопия увеличение 0.13×10^4 ; б – 14-е сутки опыта, эпифлуоресцентная микроскопия увеличение 0.13×10^4 ; в – сканирующая электронная микроскопия увеличение 5×10^3 .)

Микроорганизмы, принимающие участие в круговороте кремния, а также их роль в этом процессе для оз. Байкал не изучались, и данные бактерии представляют несомненный научный интерес.

Выводы:

1. Бактерии рода *Bacillus* обнаружены во всех исследованных природных объектах, составляя значительную долю в культивируемом гетеротрофном сообществе оз. Байкал, оз. Хубсугул и термальных источниках Прибайкалья. Видовой состав бактерий рода *Bacillus* в оз. Байкал представлен тремя известными в науке филогенетическими группами бактерий данного рода (*B. subtilis* группа I, *B. alvei* группа II, *B. brevis* группа III), а в оз. Хубсугул – одной (*B. subtilis* группа I).

2. Пространственное распределение бактерии рода *Bacillus* в оз. Байкал характеризуется доминированием в основном в придонных слоях водной толщи. При сравнении пространственного распределения бацилл в воде и в донных осадках озера установлено, что спорообразующие бактерии преобладают в донных осадках как по количественному составу, так и по видовому разнообразию.

3. Основной процесс деструкции органического вещества на акватории Селенгинского мелководья происходит в дельте, богатой микроорганизмами рода *Bacillus*, которые могут быть показателями распространения речных вод в озере.

4. Бактерии рода *Bacillus* активно развиваются в районе нефтепроявлений, увеличивая свою численность на порядок в самой зоне влияния выходов байкальской нефти, и наряду с другими таксономическими группами микроорганизмов активно участвуют в процессе ее деградации.

5. Культивируемые бактерии рода *Bacillus* (420 протестированных штаммов) показали высокую биохимическую активность таких ферментов, как протеаза, амилаза, липаза, фосфатаза и фосфолипаза. Собранную коллекцию бактерий рода *Bacillus* можно успешно использовать в практических и научных целях.

6. Доказано, что бактерии рода *Bacillus*, изолированные из донных осадков озера Байкал, способны эффективно разрушать сложные высокомолекулярные органические вещества. Установлено, что в присутствии бактерий рода *Bacillus* в условиях модельного эксперимента биодеградация ПАУ в течение месяца составляла 18–30%, фталата – 17.7–23.3%. Данные микроорганизмы обладают большим биологическим потенциалом и принимают активное участие в деструкционных процессах, протекающих в озере Байкал.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. Suslova M.J., Parfenova V.V. Bacteria of genus Bacillus in Bottom sediments of lake Baikal // Bacillus Satellite Symposium at FEMS Congress. Applications and Systematics of Bacillus and Relatives. Programme Book – Ljubljna, 2003. – С. 18.
2. Суслова М.Ю., Парфенова В.В. Изучение бактерий рода BACILLUS: количество, распределение, видовой состав // Микроорганизмы в экосистемах озер, рек и водохранилищ: Материалы международного байкальского симпозиума по микробиологии. – Иркутск, 2003. – С. 172.
3. Павлова О.Н., Парфенова В.В., Земская Т.И., Хлыстов О.М., Суслова М.Ю. Изучение бактерий-деструкторов нефти, выделенных из воды и донных осадков озера Байкал // Перспективы нефтегазоносности Байкала и Западного Забайкалья: Материалы научно-практ. конф. – Улан-Удэ, 2003. – С. 96–97.
4. Азарова И.Н., Парфенова В.В., Барам Г.И., Теркина И.А., Павлова О.Н., Суслова М.Ю. Деградация бис-(2-этилгексил) фталата микроорганизмами воды и осадков реки Селенги и озера Байкал в условиях модельного эксперимента // Прикладная биохимия и микробиология. – 2003. – Т.39, № 6. – С. 665 – 669.
5. Белькова Н.Л., Парфенова В.В., Суслова М.Ю., Ан Т.С. Биоразнообразие и активность микробного сообщества горячего источника Котельниковский (озеро Байкал) // Биология микроорганизмов и их научно-практическое использование: Материалы межрегиональной научно-практической конференции, посвященной 90-летию со дня рождения проф. Гриневич А.Г. – Иркутск, 2004. – С. 111–114.
6. Парфенова В.В., Павлова О.Н., Теркина И.А., Суслова М.Ю., Косторнова Т.Я., Никулина И.Г., Синюкович В.Н., Сороковикова Л.М. Изучение микробного сообщества окисленного слоя донных осадков оз. Байкал в придельтовом районе реки Селенга. // Водные ресурсы. – 2005. – Т.3, №3 – С. 227–231.
7. Белькова Н.Л., Парфенова В.В., Суслова М., Ан Т.С., Тадзак К. Биоразнообразие и активность микробного сообщества горячего источника Котельниковский (оз. Байкал). // Известия РАН (серия Биологическая). – 2005. – Т. 32, №6 – С. 664–671.
8. Павлова О.Н., Парфенова В.В., Земская Т.И., Суслова М.Ю., Горшков А.Г. Биодеградация нефти и углеводородов микробным сообществом оз. Байкал. // Четвертая верещагинская байкальская конференция. Тезисы докладов и стендовых сообщений. 26 сентября - 1 октября, 2005 г. – Иркутск, 2005 – С. 146–147.
9. Суслова М.Ю., Парфенова В.В., Павлова О.Н., Бедошвили Е.Д., Лихошвай Е.В. Микроорганизмы гидротермальных источников Прибайкалья, растворяющие силикаты кальция. // Четвертая верещагинская байкальская

конференция. Тезисы докладов и стендовых сообщений. 26 сентября – 1 октября, 2005 г. – Иркутск, 2005 – С. 176–177.

10. Павлова О.Н., Парфенова В.В., Земская Т.И., Сусллова М.Ю., Горшков А.Г., Азарова И.Н. Роль микробного сообщества оз. Байкал в процессах биodeградации сложных органических веществ. // Проблемы биодеструкции техногенных загрязнителей окружающей среды: Международная конференция. – Саратов, 2005 – С. 84–85.

11. Парфенова В.В., Павлова О.Н., Белькова Н.Л., Теркина И.А., Сусллова М.Ю., Мальник В.В. Биоразнообразие и функциональная активность микробного сообщества оз. Байкал. // IX Съезд гидробиологического общества РАН, – Тольятти, 2006. – Т. 2. – С. 83.