



УДК 577.151.01

Изучение природного разнообразия микробных сообществ в гидротерме Алла (Бурятия) и оценка их пептидазной активности

Е. В. Лаврентьева, А. А. Раднагуруева, Д. Д. Бархутова,
Б. Б. Намсараев

*Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН, Улан-Удэ
E-mail: lena_l@mail.ru*

Аннотация. С использованием метода пиросеквенирования дана полная характеристика состава бактериального сообщества микробного мата высокотемпературной зоны гидротермы Алла (Баргузинская долина, Бурятия). Изучена внеклеточная протеолитическая активность в нативных образцах микробного мата и ила. Показано, что микробное сообщество гидротермы Алла обладает спектром внеклеточных протеаз и характеризуется вариабельностью в распределении протеазной активности по субстратам.

Ключевые слова: гидротерма, микробное сообщество, пиросеквенирование, протеазная активность.

Введение

В последние десятилетия изучение микробных сообществ термальных местообитаний на молекулярном уровне позволило выявить новые виды бактерий, их метаболические пути и механизмы биохимической адаптации, что значительно обогатило современную фундаментальную микробиологию [1; 2; 4; 5]. Термофильные бактерии представляют одну из наиболее обширных и активно изучаемых групп микроорганизмов и являются источником ферментов и метаболитов для промышленности и медицины. В природных местообитаниях гидротермические бактерии являются важным компонентом микробных сообществ наземных гидротерм и занимают нишу первичных деструкторов благодаря способности гетеротрофно расти на биополимерах различной природы [3].

Целью работы является изучение разнообразия культивируемого и некультивируемого микробного сообщества и выявление функциональной роли протеолитических бактерий в горячем источнике Алла в Баргузинской долине (Курумканский район Республики Бурятия).

Материалы и методы

Из пробы микробного мата высокотемпературной зоны (74–65 °С) гидротермы Алла (N 54°41'735", E 110°44'710", высота над у. м. 706 м) методом пиросеквенирования были определены 2406 валидные нуклеотидные последовательности гена 16S рПНК домена Bacteria. Пиросеквенирование фрагментов гена 16S рПНК выполнено в компании Chunlab Inc. (Сеул, Южная Корея) на приборе Roche/454 Genome Sequencer FLX Titanium с использованием бактериальных праймеров 27F (GAGTTTGATCMTGGCTCAG) и 518R (WTTACCGCGGCTGCTGG). Оценку таксономической сложности сообщества проводили с помощью пакета программ CLcommunity (v. 3.1).

Для исследования протеолитической активности в нативных образцах были использованы маты и ил. Определение внеклеточной протеазной активности на основе фосфатного буфера (рН 7) и в культуральной жидкости проводили по методу Эрлангера с соавторами [7], используя 5 мМ синтетические субстраты N-бензоил-L-аргинил-п-нитроанилид (БАПА), пироглутамил-аланил-аланил-лейцил-п-нитроанилид (ГААЛП), а также с помощью тринитрофенилирования, используя 1%-ный белковый субстрат – желатин (рН 8). Инкубировали в течение 30 мин при температуре 37 °С с последующим спектрофотометрическим определением активности при $\lambda = 410$ нм. За единицу ферментативной активности принимали количество фермента в исследуемом образце, которое расщепляет 1 нмоль продукта в указанных условиях инкубации за 1 мин.

Результаты и обсуждение

В последние годы активное использование методов пиросеквенирования значительно расширило представление о разнообразии культивируемых и некультивируемых форм термофильных микроорганизмов в высокотемпературных экологических нишах. Метод пиросеквенирования позволяет охарактеризовать микробное сообщество, выявляя не только доминирующие микроорганизмы, но и минорные компоненты сообщества, которые играют важную экологическую роль в водных системах.

В составе бактериального сообщества микробного мата гидротермы Алла наибольшую долю составили бактерии филы Deinococcus-Thermus (45 % всех последовательностей 16S рПНК микроорганизмов), относящиеся к широко распространённым в гидротермальных экосистемах всего мира родам *Thermus* (55,8 %) и *Meiothermus* (43,5%) (рис.). Аэробные органотрофы р. *Thermus* в изученном микробном сообществе представлены культивируемым видом *Th. ignitirrae*. Среди бактерий р. *Meiothermus* доминирует *M. hypogaeus*, процент их сходства с ближайшим культивируемым гомологом, выделенным из глубинного ила горячего источника в Японии, варьировал от 94,1 до 96,6 %. Другой представитель этого рода *M. ruber* впервые выделен и описан из горячих источников Алла и Гусиха в Бурятии [6]. Многие представители этой филы синтезируют внеклеточные ферменты, обеспечивающие гидролиз белков и полисахаридов, тем самым осуществляя аэробную деструкцию органического вещества в микробных матах.

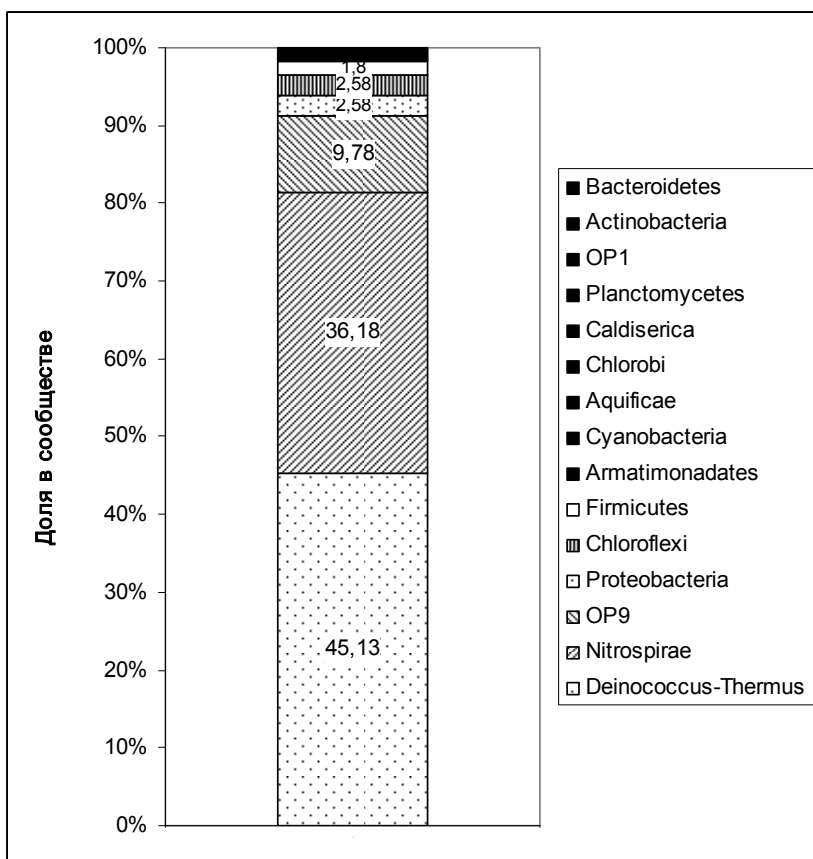


Рис. Состав бактериального сообщества микробного мата гидротермы Алла. Показаны филы с представленностью в сообществе более 1 %

Субдоминантом исследуемого бактериального сообщества является фила Nitrospirae (36 %), представленный в основном некультивируемыми организмами, относящимися к 16 некультивируемым представителям *Thermodesulfovibrio* (83–99 % гомологии). Единственным культивируемым представителем является *Th. yellowstonii* (98–99 % гомологии), выделенный из термофильного мата горячего источника Йеллоустон (США). В структуре микробного мата *Thermodesulfovibrio* осуществляют диссимиляционное восстановление сульфатов, что показывает существенную роль этой группы прокариот в функционировании микробного сообщества.

Тип *Proteobacteria* (2,6 %) включает в себя большое количество некультивируемых таксонов, которые распределены в четырёх классах: альфа, бета, гамма и дельта-протеобактерии, использующие в качестве доноров электронов органические вещества. Термофилы встречаются во всех четырёх классах. В основном это умеренно термофильные организмы.

В состав типа *Firmicutes* (1,8 %) входят аэробные и анаэробные бактерии, широко распространённые в гидротермальных выходах и получающие

энергию за счёт гидролиза широкого спектра углерод- и азотсодержащих субстратов.

Другие представители гетеротрофного блока микробного мата составили менее 1 % последовательностей.

Показано, что микробный мат высокотемпературной зоны источника Алла является автономным устойчивым сообществом, который подчиняется системной трофической организации.

Ведущую роль в функционировании микробного сообщества в экосистемах играют внеклеточные протеолитические ферменты, которые осуществляют гидролиз ряда пептидных связей в молекулах белков, обеспечивая высокие скорости деструкции органических веществ и их перераспределение между компонентами природных экосистем. Относительно постоянные физико-химические условия, качественный и количественный состав органических веществ в циано-бактериальных матах и илах способствует активному развитию в них различных бактерий – деструкторов.

В нативных образцах источника Алла было показано, что увеличение продукции трипсин-подобных протеаз наблюдается при повышении температуры. Максимальная внеклеточная протеолитическая активность была зафиксирована в микробном мате при температуре 65,2 °С. В циано-бактериальных матах источника Алла обнаружены и наибольшие показатели активности по субтилизинподобному субстрату ГААЛП (табл.).

Таблица

Протеолитическая активность микроорганизмов из нативных образцов гидротермы Алла, культивируемых на разных субстратах, ед.

Точки отбора проб	Вид нативного образца и температура (°С)	Вид субстрата		
		БАПА	ГААЛП	Желатин
1	Микробный мат, 65,2	1,44	2,18	5,96
2	Ил, 49,0	1,15	0,29	5,45
3	Ил, 24,0	0,94	0,67	4,8

Наиболее высокая общая внеклеточная протеолитическая активность, определённая методом тринитрофенилирования, выявлена в высокотемпературных зонах отбора 5,96 ед. в циано-бактериальном мате ($T=65,2$ °С) и 5,45 ед. в иле ($T=49,0$ °С). Высокая ферментативная активность, зафиксированная на этих станциях, вероятно, обусловлена скоплением гидролитических бактерий в благоприятных экологических условиях.

Определение протеолитической активности показало, что микроорганизмы из микробных матов и илов на одной станции обладают различной секрецией протеаз. Следует отметить, что высокие значения субтилизинподобной активности проявляются в основном в циано-бактериальных матах, в то время как максимальные величины трипсинподобной активности были определены как в циано-бактериальных матах, так и в илах.

Полученные результаты показывают, что микробное сообщество гидротермы Алла обладает спектром внеклеточных протеаз и характеризуется

вариабельностью в распределении протеазной активности по субстратам. Выявлено, что на протеазную активность оказывают существенное влияние тип субстрата и физико-химические условия источников.

Из ила гидротермы Алла выделен штамм бактерии А1-9-1. Исследование экофизиологии выделенной культуры показало, что он способен развиваться в широком диапазоне температур (35–67 °С) и pH (6,5–9,0) с оптимумом роста при 50 °С и pH 8,0, проявляя свойства алкало- и термотолерантности. Анализ гена 16S показал, что штамм А1-9-1 имеет 96%-ное сходство с *Anoxybacillus pushchinoensis* AT-2 (AB234214).

Показано, что изученный штамм не гидролизует субстраты, специфичные для химотрипсинподобных и цистеиновых протеиназ, независимо от времени культивирования (до 60 ч) и источников органического азота (триптон, казеин и желатин). Отмечено, что штамм А1-9-1 обладает субтилизин-подобной активностью. Характерно, что наибольшая активность обнаружена на среде с триптоном на 36-м часу культивирования. Добавление в среду казеина приводило к постоянной индукции субтилизин-подобных протеиназ в течение всего времени культивирования.

Заключение

Исследования, проведённые в горячем источнике Алла, показали присутствие активных и разнообразных термофильных микробных сообществ, способных гидролизовать биополимеры (белковые соединения). Обнаруженные свойства пептидаз микробного сообщества и представителя р. *Anoxybacillus* являются перспективными для использования их в биотехнологии.

Исследование поддержано грантом Минобрнауки РФ № 1990, ФЦП №8116, интеграционными проектами № 5, 94, 56.

Список литературы

1. Бонч-Осмоловская Е. А. Изучение термофильных микроорганизмов в Институте микробиологии РАН / Е. А. Бонч-Осмоловская // Микробиология. – 2004. – Т. 73, № 5. – С. 644–658.
2. Бонч-Осмоловская Е. А. Термофильные микроорганизмы: общий взгляд / Е. А. Бонч-Осмоловская // Тр. Ин-та микробиологии. – 2011. – В. 16. – С. 5–14.
3. Кубланов И. В. Термофильные микроорганизмы, разлагающие биополимеры / И. В. Кубланов, О. А. Подосокорская // Тр. Ин-та микробиологии им. С. Н. Виноградского. – М. : Наука, 2011. – Вып. XVI. – С. 315–342.
4. Микробные сообщества щелочных гидротерм / З. Б. Намсараев [и др.] // Новосибирск : Изд-во СО РАН. – 2006. – 111 с.
5. Молекулярный анализ биоразнообразия микроорганизмов в источнике Заварзина, кальдера Узон, Камчатка / В. М. Гумеров // Микробиология. – 2011. – Т. 80, № 2. – С. 258–265.
6. Термофильные бактерии горячих источников Бурятии / Г. И. Храпцова [и др.] // Микробиология. – 1984. – Т. 53, вып. 1. – С. 137–141.
7. Erlanger B. F. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin / B. F. Erlanger, N. Kokowsky, W. Cohen // Arch. Biochem. Biophys. – 1961. – Vol. 95. – P. 271–278.

Diversity and Peptidase Activity of Microbial Communities in the Hot Spring Alla (Buryatia)

E. V. Lavrentieva, A. A. Radnagurueva, D. D. Barhutova,
B. B. Namsaraev

Institute of General and Experimental Biology SB RAS, Ulan-Ude

Abstract. Using the method of pyrosequencing a complete characterization of the bacterial community composition in the microbial mat of high-temperature zone of hot spring Alla (Buryatia) is given. Extracellular proteolytic activity in native samples (microbial mats and bottom sediments) was studied. It is shown that the microbial community has a spectrum of extracellular proteases and is characterized by variability in the distribution of protease activity on substrates.

Keywords: microbial mats, pyrosequencing, protease activity.

Лаврентьева Елена Владимировна
кандидат биологических наук
научный сотрудник
Институт общей и экспериментальной
биологии СО РАН
670047, Улан-Удэ, Сахьяновой, 6
тел.: (3012) 43-49-02
e-mail: lena_l@mail.ru

Lavrentieva Yelena Vladimirovna
Candidate of Sciences (Biology)
Research Scientist
Institute of General and Experimental
Biology SB RAS
6, Sakhyanova st., Ulan-Ude, 670047
tel.: (3012) 43-42-29
e-mail: lena_l@mail.ru

Раднагурева Арюна Арсалановна
кандидат биологических наук,
младший научный сотрудник
Институт общей и экспериментальной
биологии СО РАН
670047, Улан-Удэ, Сахьяновой, 6
тел.: (3012) 43-49-02
e-mail: aryuna_rg@mail.ru

Radnagurueva Aryuna Arsalanovna
Candidate of Sciences (Biology)
Junior Research Scientist
Institute of General and Experimental
Biology SB RAS
6, Sakhyanova st., Ulan-Ude, 670047
tel.: (3012) 43-42-29
e-mail: aryuna_rg@mail.ru

Бархутова Дарима Дондоковна
кандидат биологических наук
старший научный сотрудник
Институт общей и экспериментальной
биологии СО РАН
670047, Улан-Удэ, Сахьяновой, 6
тел.: (3012) 43-49-02
e-mail: darima_bar@mail.ru

Barkhutova Darima Dondokovna
Candidate of Sciences (Biology)
Senior Research Scientist
Institute of General and Experimental
Biology SB RAS
6, Sakhyanova st., Ulan-Ude, 670047
tel.: (3012)43-42-29
e-mail: darima_bar@mail.ru

Намсараев Баир Бадмабазарович
доктор биологических наук
заведующий лабораторией
Институт общей и экспериментальной
биологии СО РАН
670047, Улан-Удэ, Сахьяновой, 6
тел.: (3012)43-49-02
e-mail: bair_n@mail.ru

Namsaraev Bair Badmabazarovich
Doctor of Sciences (Biology)
Head of Laboratory
Institute of General and Experimental
Biology SB RAS
6, Sakhyanova st., Ulan-Ude, 670047
tel.: (3012)43-42-29
e-mail: bair_n@mail.ru