



УДК 576.807.8

## **Внеклеточная протеазная активность в природных образцах термальных источников Прибайкалья**

А. А. Раднагуруева ([aryuna\\_rg@mail.ru](mailto:aryuna_rg@mail.ru)), Е. В. Лаврентьева

**Аннотация.** В пяти термальных источниках были определены белок, численность протеолитических микроорганизмов и внеклеточная протеазная активность в природных образцах. Показано, что численность бактерий в донных осадках и микробных матах варьировала в пределах от 10 до 100 000 клеток/см<sup>3</sup>. Обнаружена высокая внеклеточная протеазная активность по субстратам ВАРА и желатина, преимущественно в циано-бактериальных матах.

**Ключевые слова:** термальные источники, протеолитические бактерии, численность, протеазная активность.

### **Введение**

Ведущую роль в процессе деструкции органического вещества играют внеклеточные протеолитические ферменты, осуществляющие гидролиз ряда пептидных связей в молекулах белков.

В зависимости от условий водной среды и донных осадков, активности гидролитических ферментов могут проявляться в разной степени – активироваться либо инактивироваться различными органическими и неорганическими соединениями биогенного происхождения [1, 2]. В природных образцах исследованных гидротерм было проведено изучение протеазной активности.

Целью исследования было определение численности, белка и протеазной активности в природных образцах.

### **Объекты и методы**

Были исследованы пробы воды, донных отложений и цианобактериальных матов термальных источников Алла, Сея, Умхей, Гусиха и Гарга, отобранных летом 2008 г. (табл. 1). Температуру воды источников измеряли сенсорным электротермометром Prima (Португалия). pH источников измеряли портативным pH-метром рНер (Португалия).

Численность микроорганизмов проводили методом десятикратных разведений на модифицированной среде Пфеннига, следующего состава (г/л): NH<sub>4</sub>Cl – 0,4; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 0,5; NaNO<sub>3</sub> – 0,4; MgCl<sub>2</sub> – 0,2; Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 0,5; NaCl – 0,5; KCl – 0,5; дрожжевой экстракт – 0,1; раствор микроэлементов по Липперту, Витману – 1 мл; витамин В<sub>12</sub> – 20 мкг. В качестве субстратов вносили пептон (1,5 %). pH среды доводили карбонатно-бикарбонатным буфером, инкубация при 51°C.

Таблица 1

## Типы проб, места отбора и температура

Источник	№	Точки отбора и температура отбора (°С)					
		1	2	3	4	5	6
Гарга	1	песок – 74	ил – 73,5	ил – 73	н. о.	н. о.	н. о.
Сея	2	ил – 49,8	м. м. – 49	ил – 49	ил – 47	ил – 45	м. м. – 45
Алла	3	ил – 75,8	ил – 74	ил – 76,4	н. о.	н. о.	н. о.
Умхей	4	ил – 47,6	ил – 45,7	ил – 41,7	н. о.	н. о.	н. о.
Гусиха	5	ил – 43	ил – 53	ил – 62	песок – 45	н. о.	н. о.

Примечание: «н. о. – не отобраны».

Микроорганизмы, обитающие в природной пробе, были исследованы на способность секретировать внеклеточные протеазы, активные на различных пара-нитроанилидных субстратах и на белковом субстрате желатине, используемой для определения общей активности. Протеазную активность по отношению к синтетическим субстратам определяли спектрофотометрически при 410 нм по количеству образовавшегося п-нитроанилида. Остаточную активность фермента определяли по методу Эрлангера и др. [4] в течение 30 мин при 37°, используя в качестве субстрата 5мМ растворы GlpAALpNA, BAPA в диметилформамиде. За единицу ферментативной активности принимали такое количество фермента, которое расщепляет 1 ммоль продукта за 1 мин.

Содержание белка определяли по методу Лоури с соавторами [3].

### Результаты и обсуждение

Численность протеолитических бактерий в донных осадках и микробных матах варьировала в пределах от 10 до 100 000 клеток/см<sup>3</sup>. Наибольшее число микроорганизмов обнаружено в поверхностном микробном мате источника Сея и в донных осадках источника Алла (100 000 клеток/см<sup>3</sup>).

Для источника Гарга характерно увеличение численности протеолитических бактерий при понижении температуры, тогда как концентрация белка уменьшается (рис. 1). Схожая картина зависимости характерна для всех источников. Максимальная численность (1000 клеток/см<sup>3</sup>) отмечена при температуре 73 °С.

Изучение биохимических параметров показало, что наиболее высокая общая внеклеточная протеазная активность (табл. 2) выявлена в источнике Сея – от 0,126 до 1,021 ед. в илах и от 0,354 до 1,085 ед. в цианобактериальных матах. Высокая ферментативная активность, зафиксированная на этих станциях, вероятно, обусловлена скоплением гидролитических бактерий в благоприятных экологических условиях. Активное разложение желатин было отмечено в образцах источников Гусиха (0,116–0,508 ед.) и Алла (0,214–0,484 ед.). Пробы из источника Гарга характеризовались незначительной активностью по желатине (0,128–0,234 ед.).

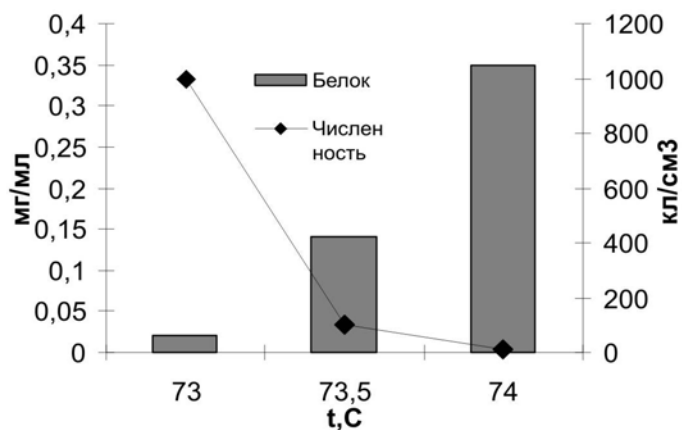


Рис. 1. Зависимость концентрации белка и численности микроорганизмов от температуры в источнике Гарга

Таблица 2

Общая протеазная активность по желатине

Источник	№	Точки отбора (активность, ед.)						
		1	2	3	4	5	6	
	1	2	3	4	5	6	7	8
Гарга	1	0,128	0,128	0,234	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.
Сея	2	1,021	1,085	0,23	0,21	0,126	0,354	
	1	2	3	4	5	6	7	8
Алла	3	0,328	0,484	0,214	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.
Умхей	4	0,124	0,18	0,424	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.
Гусиха	5	0,116	0,508	0,406	0,45	н. о.	н. о.	н. о.

Нами был проведен сравнительный анализ протеазной активности микроорганизмов в микробных матах и илах в одном температурном диапазоне 45–49,8 °C в источнике Сея (рис. 2). Определение протеазной активности показало, что микроорганизмы микробных матов и илов из одной и той же станции обладают различной секрецией протеаз. Следует отметить, что высокая активность трипсинподобной активности проявляется на третьей станции (0,556 ед.) в образце донных осадков, в то время как максимальная величина субтилизинподобной активности была определена в поверхностном цианобактериальном мате (0,437 ед.) на второй станции. Относительно постоянные физико-химические условия, качественный и количественный состав органических веществ в цианобактериальных матах способствуют активному развитию в них различных бактерий – деструкторов.

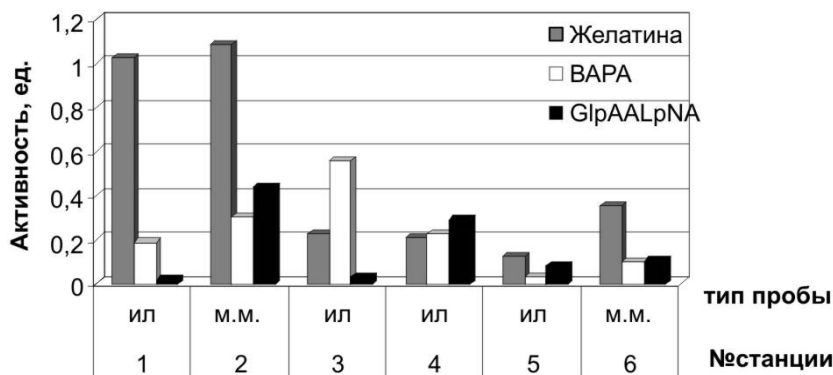


Рис. 2. Внеклеточная протеазная активность в источнике Сея

В образцах источников Алла, Умхей выявлена высокая трипсинподобная активность (рис. 3). Значения протеазной активности составили от 0,016 до 0,646 ед. Образцы источника Гусиха характеризовались низкими значениями активности. Следует отметить, что в ранних наших исследованиях секретируемые протеазы культур микроорганизмов относились к классу сериновых протеаз субтилизинподобного типа. Результаты данных исследований показывают, что активность по тому или иному субстрату определяется специфичностью видового состава микроорганизмов, продуцирующих внеклеточные протеазы в окружающую среду.

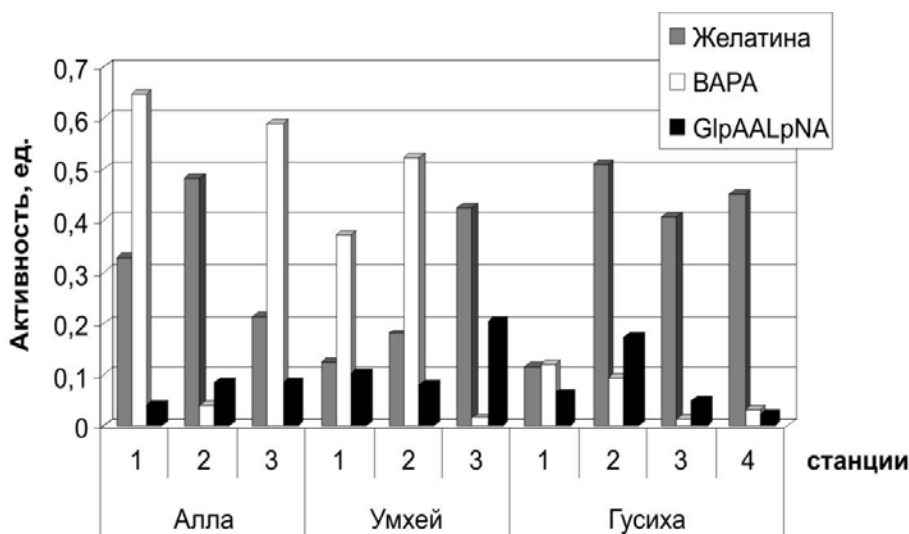


Рис. 3. Внеклеточная протеазная активность в источниках Алла, Умхей, Гусиха

## Выводы

Полученные результаты позволяют заключить, что микробное сообщество щелочных термальных источников обладает широким спектром внеклеточных протеаз и высокой вариабельностью в распределении протеазной активности по типу образца. Показано, что на протеазную активность микроорганизмов оказывают существенное влияние ряд экологических факторов, в частности физико-химические условия источников и тип субстрата. Наибольшие значения протеазной активности в природных образцах характерны для микробных матов. Проведенные исследования показывают определяющую роль ферментативных процессов в трансформации органического вещества в природных экосистемах.

*Работа поддержана грантами РФФИ № 07-04-00651а, 08-04-98018, Программой РАН «Происхождение и эволюция биосферы», МО РФ № 2. 1. 1/2165, НОЦ «Байкал».*

## Список литературы

1. *Корнеева Г. А.* Внеклеточная протеазная активность в компонентах криосферы / Г. А. Корнеева, Н. А. Буданцева, Ю. Н. Чиждова // Изв. РАН. Серия биологическая. – 2004. – № 5. – С. 625–633.
2. *Корнеева Г. А.* Изучение ферментативного гидролиза казеина в морской воде / Г. А. Корнеева, С. В. Карченко, Е. А. Романкевич // Изв. РАН. Серия биологическая. – 1990. – № 6. – С. 821–829.
3. *Нетрусов А. И.* Практикум по микробиологии / А. И. Нетрусов, М. А. Егорова, Л. М. Захарчук. – М.: Академия, 2005. – 608 с.
4. *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. – V. 95. – P. 271–278.

## Extracellular Protease Activity in Natural Samples of hot Springs of Pribaikalye

A. A. Radnagurueva, E. V. Lavrentieva

**Annotation.** The hot springs protein, abundance of proteolytic microorganism's extracellular protease activity in natural samples has been defined. It is shown that abundance of bacteria in bottom sediments and microbic mats varied on 10 to 100 000 cells/sm<sup>3</sup>. It is found out high extracellular protease activity on substrate BAPA and gelatin, mainly in cyanobacterial mats.

**Key words:** hot springs, proteolytic bacteria, abundance, protease activity.

*Раднагуруева Арюна Арсалановна  
лаборатория микробиологии  
Институт общей экспериментальной  
биологии СО РАН  
аспирант  
670047, Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6  
тел.: 8(3012) 43-49-02*

*Лаврентьева Елена Владимировна  
кандидат биологических наук  
лаборатория микробиологии  
Институт общей экспериментальной био-  
логии СО РАН  
научный сотрудник  
670047, Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6  
тел.: 8(3012) 43-49-02*