

На правах рукописи

РОЗАНОВ
АЛЕКСЕЙ СЕРГЕЕВИЧ

БИОРАЗНООБРАЗИЕ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ГЕОТЕРМАЛЬНЫХ
СООБЩЕСТВ ПРИБАЙКАЛЯ И КАМЧАТКИ - ПЕРСПЕКТИВНЫХ
ИСТОЧНИКОВ БАКТЕРИЙ-ПРОДУЦЕНТОВ ФЕРМЕНТОВ
ДЕСТРУКЦИИ ЛИГНОЦЕЛЛЮЛОЗЫ

03.02.07 – генетика

АВТОРЕФЕРАТ
Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Новосибирск – 2016

Работа выполнена в Лаборатории молекулярных биотехнологий Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (ИЦиГ СО РАН)

**Научный
Руководитель:** **Пельтек Сергей Евгеньевич**, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией молекулярных биотехнологий, заместитель директора ИЦиГ СО РАН

**Официальные
оппоненты:** **Дегтярев Сергей Харитонович**, доктор биологических наук, профессор, зам. директора по науке, ООО «СибЭнзайм», г. Новосибирск

Земская Тамара Ивановна, доктор биологических наук, зав. лабораторией микробиологии углеводов, ФГБУН Лимнологического института СО РАН, г. Иркутск.

Ведущая организация: Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» (ФИЦ Биотехнологии РАН), г. Москва.

Защита состоится “__” _____ 2016г. на утреннем заседании диссертационного совета Д 003.011.01 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», в конференц-зале Института по адресу:

пр-т Академика Лаврентьева 10, г. Новосибирск, 630090

тел. +7(383) 363-49-06 (1321); факс: +7(383)333-12-78;

e-mail: dissov@bionet.nsc.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИЦиГ СО РАН и на сайте Института: www.bionet.nsc.ru.

Автореферат разослан “__” _____ 2016 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

Т.М. Хлебодарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Исследование структуры микробных сообществ высокотемпературных вод геотермальных источников одна из задач фундаментальной микробиологии. Особый интерес представляют макроскопические образования, сформированные матрикс образующими микроорганизмами, поскольку микробиологический состав этих сообществ и биохимические связи, формирующиеся в них, несут информацию об эволюции биосферы Земли.

Кроме фундаментальной экологической составляющей изучения микробиологического разнообразия микробные сообщества геотермальных мест обитания интересны с точки зрения поиска термофильных бактерий и их белков для биотехнологии [Elleuche et al., 2014]. Учитывая общие тенденции изменения требований к условиям технологических процессов, в первую очередь увеличение их температур, и повышению стабильности используемых препаратов, вклад термофильных микроорганизмов и их ферментов в осуществлении промышленных биотехнологических процессов будет возрастать [Turner et al., 2007, Nasunuma et al., 2013].

Центральной проблемой биотехнологии в настоящее время является постоянно растущий спрос на первичную субстанцию микробиологического синтеза - сахара, традиционно получаемые из крахмала и сахарозы. Альтернативным источником сахаров является лигноцеллюлозная биомасса растений [Iqbal et al., 2013]. Но процесс ее переработки оказался сложным. Существующие ферментативные препараты не позволили создать технологию комплексной переработки лигноцеллюлозы, которая могла бы по экономической эффективности конкурировать с методами получения сахаров из крахмало- и сахарозо-содержащих частей растений. Это привело к активизации поиска новых методов предобработки лигноцеллюлозы и совместимых с ними ферментов и их комплексов.

Среди прочих выделяется метод предобработки лигноцеллюлозного сырья, основанный на применении ионных жидкостей (ИЖ). Этот метод позволяет разрушать кристаллическую решетку целлюлозы и организовывать разделение компонентов лигноцеллюлозы. Что является одними из ключевых моментов в процессе предобработки. Однако оказалось, что ИЖ могут существенно ингибировать работу ферментов [Zhao et al., 2009, Hong et al., 2012]. Исследования феномена нестабильности ферментов в присутствии ИЖ показали, что устойчивость белков к их воздействию хорошо коррелирует с общей устойчивостью. Имеющаяся в литературе информация свидетельствует о том, что источником высокостабильных белков являются микроорганизмы экстремальных мест обитания, в первую очередь высокотемпературных [Engel et al., 2012].

На территории России располагается большое количество геотермальных мест обитания, не достаточно изученных как с точки зрения микробиологии, так и с точки зрения их биотехнологического потенциала. В первую очередь это геотермальные источники Прибайкалья, Камчатки и Курильских островов. Работы, направленные на изучение микробного разнообразия с использованием современных метагеномных подходов, весьма малочисленны и сосредоточены на изучении микробного разнообразия горячих источников Камчатки [Gumerov et al., 2011, Rozanov et al., 2014, Chernyh et al., 2015]. Работы, посвященные подробному изучению геотермальных источников Прибайкалья с использованием современных методов появились совсем недавно, в конце 2015 г [Gaisin et al., 2015].

Большинство микроорганизмов природных экосистем культивируется плохо или не культивируется вообще, в связи с чем назрел потенциал для внедрения новых культура-независимых методов изучения микробных сообществ. Эту нишу заняли методы метагеномики, которые позволяют проводить микробиологическое и экологическое описание микробиологических сообществ и исследовать их метаболические возможности без культивирования. Современный смысл этот термин приобрел в 2004 году, когда вышли первые работы, использующие массовое параллельное секвенирование для изучения микробиомов [Tyson et al., 2004, Venter et al., 2004].

Изучение микробиологических сообществ уже на протяжении более ста лет дает материал не только для фундаментальной науки, но и для решения прикладных задач. В ходе выполнения работ внимание было сфокусировано как на изучении микробного разнообразия, так и на поиске материалов для биотехнологического применения, в частности на выделении термофильных бактерий и поиске новых вариантов ферментов для гидролиза лигноцеллюлозы.

Цель и задачи исследования

Целью данной работы является изучение биоразнообразия геотермальных микробных сообществ и поиск в них ферментов деструкции лигноцеллюлозы.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить **следующие задачи**:

1. Описать разнообразие микробных сообществ термальных источников Камчатки и Прибайкалья с установлением генетического разнообразия по гену 16S рРНК в препаратах суммарной ДНК микробных сообществ;
2. Выделить штаммы термофильных бактерий из исследуемых микробных сообществ и провести их характеристику;
3. Провести полногеномное секвенирование найденных штаммов термофильных бактерий;

4. Выявить гены ферментов деструкции лигноцеллюлозы в установленной структуре геномов термофильных бактерий и клонировать их в экспрессирующий вектор;

5. Нарботать биомассу рекомбинантных штаммов-продуцентов и произвести очистку клонированных белков;

6. Изучить свойства полученных ферментов, в том числе их активность в присутствии ионных жидкостей.

Научная новизна работы

Впервые с использованием высокопроизводительных методов геномики проведен анализ: микробного мата источника Гаргинского (Прибайкалье). Впервые описана филогенетическая структура бентосного микробного сообщества источника Заварзина, расположенного в кальдере вулкана Узон (Камчатка).

Из образцов микробных сообществ, отобранных во время экспедиционных работ в зоны геотермальной активности Камчатки и Прибайкалья, выделены в чистую культуру и охарактеризованы термофильные аэробные бактерии, принадлежащие к трем родам: *Geobacillus*, *Anoxybacillus*, *Thermoactinomyces*. Один из штаммов был идентифицирован как новый вид, которому было присвоено название *Geobacillus icigianus*. Проведено полногеномное секвенирование шести термофильных штаммов, относящихся к родам *Geobacillus*, *Anoxybacillus*, *Thermoactinomyces*.

В геноме ранее не изученных *G. stearothermophilus* штаммов 22 VKPM В-11678 и 53 были обнаружены гены ферментов деструкции компонентов лигноцеллюлозы. Гены ферментов: эндо-1,4-β-глюканазы, ксилан-1,4-β-ксилозидазы, эндо-1,4-β-ксиланазы, α-глюкуронидазы, α-L-арабинофуранозидазы были использованы для создания рекомбинантных продуцентов. Впервые проведено исследование влияния ионных жидкостей на свойства эндо-1,4-β-ксиланазы и ксилан-1,4-β-ксилозидазы *G. stearothermophilus* VKPM В-11678.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Анализ генетического разнообразия микробных матов источника Гаргинского (Прибайкалье) и источника Заварзина (Камчатка), будут способствовать лучшему пониманию межвидовых взаимодействий экстремофильных микробных сообществ. Обнаруженный новый вид *Geobacillus icigianus*, может послужить источником новых форм стабильных ферментов.

Ферменты разрушающие связи лигноцеллюлозы *G. stearothermophilus* 22 VKPM В-11678 продемонстрировали достаточно высокую ферментативную активность и способность функционировать при температурах более 55°C. Было показано, что фермент ксилан-1,4-β-ксилозидаза *G. stearothermophilus* 22 VKPM В-

11678 показал высокую стабильность в присутствии 1-бутил-3-метилимидазолиум хлорида [bmim]Cl, что свидетельствует о возможности использования этого фермента для создания комплексов белков, направленных на гидролиз лигноцеллюлозы в присутствии ИЖ.

Положения, выносимые на защиту

- Генетическая структура фототрофного микробного мата источника Гаргинского (Прибайкалье) обеспечивает формирование практически замкнутых циклов основных химических элементов углерода, серы и азота, поддерживаемых бактериями типов Planctomycetes, Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes (класса *Clostridia*) и Thermi, а также аноксигенными фототрофами типов Chloroflexi и Chlorobi. Основную первичную продукцию обеспечивают цианобактерии рода *Leptolyngbya*.

- Генетическая структура донного микробного мата геотермального источника Заварзина (Камчатка) демонстрирует, что большинство микроорганизмов этого мата способны использовать серу в качестве акцептора электронов. Основу сообщества составляют матрикс образующие бактерии типов *Caldiserica* и *Dictyoglomi*, первичную продукцию и азотфиксацию обеспечивают представители типов Aquificae и Nitrospirae, соответственно.

- Штамм *Geobacillus* sp. G1W1, тип Firmicutes, выделенный из образцов донных отложений геотермальных источников Камчатки, согласно данным филогенетического анализа и полногеномного секвенирования определен как новый вид – *Geobacillus icigianus*.

- Фермент ксилан-1,4-β-ксилозидаза, ген которого был обнаружен в ходе геномного секвенирования штамма *G.stearothermofillus* 22 VKPM B-11678, выделенного из геотермальных источников Прибайкалья, обладает свойствами, обеспечивающими возможность его эффективного использования в технологических процессах деструкции лигноцеллюлозы с применением ионных жидкостей.

Вклад автора

Большая часть экспериментальной работы выполнена автором лично. Диссертационная работа выполнялась в период с сентября 2007 г по декабрь 2013г, в соответствии с планом научных исследований Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (ИЦиГ СО РАН) по теме проекта VI.58.1.3. “Метаболомно-протеомное профилирование молекулярно-генетических систем и процессов” (координатор проекта к.б.н. С.Е. Пельтек), а также по теме государственных контрактов ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2013

годы»: № 14.512.11.0072 от 19.04.2013 г. «Разработка биокаталитических методов превращения биомассы мискантуса в этанол»; №14.512.11.0057 от «03» апреля 2013 г. «Разработка методов генетической модификации термофильных микроорганизмов с целью создания термоустойчивых штаммов-продуцентов, предназначенных для трансформации сахаров из возобновляемых источников биомассы в биоэтанол». Сбор материалов бентосных отложений в Прибайкальском регионе для выделения термофильных бактерий проводился автором лично в период с 08.09.2007 по 22.09.2007г. Материалы микробных матов Прибайкалья и образцы геотермальных источников Камчатки были предоставлены сотрудником лаборатории молекулярных биотехнологий ИЦиГ СО РАН к.б.н. с.н.с. Брянской А.В., описание нового штамма *G.icigianus* и микробных матов было выполнено совместно с к.б.н., с.н.с., Брянской А.В.

Научные положения диссертационной работы и выводы базируются на результатах собственных исследований автора.

Апробация работы

По результатам работы опубликовано 6 статей в журналах из списка ВАК. Материалы были представлены на одной российской и трех международных конференциях. По результатам работ получен один патент.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для выполнения представленных в диссертационной работе исследований был применен широкий спектр современных методов: работа с бактериями (культивирование, выделение новых штаммов, филогенетическое и фенотипическое описание, выращивание бактерий в условиях биореактора); метагеномные исследования природных биологических объектов (подготовка библиотек для 16S рРНК метагеномного секвенирования, выполнение секвенирования); анализ генетического материала микроорганизмов (выделение ДНК, секвенирование отдельных маркеров, полногеномное секвенирование с использованием методов высокопроизводительного секвенирования); клонирование и наработка рекомбинантных белков; анализ белковых препаратов при помощи ПААГ; очистка белковых препаратов при помощи высаливания; спектрофотометрические методы при анализе ферментативных активностей белковых препаратов.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

16S рРНК метагеномный анализ микробных матов источника Гаргинского (Прибайкалье)

В долине реки Баргузин расположено значительное количество гидротерм. Воды исследованных геотермальных источников имеют щелочной рН, в основном более 9.0, температура до 75°C. Несколько отличается от других геотермальных источников Прибайкалья источник Гаргинский. Эти отличия

закключаются в следующем: воды источника выходят одним потоком, а рН источника равен 8.1. Температура вод источника на изливе составляет 74°C. По течению термального ручья формируются микробные маты. Фотографии микробного мата источника Гаргинского представлены на рисунке 1. Для изучения биологического разнообразия обнаруженных в источнике Гаргинском микробных сообществ был проведен филогенетический анализ при помощи 16S рРНК метагеномного секвенирования. Были проанализированы следующие образцы: микробные обрастания на камнях вблизи излива $t = 74^{\circ}\text{C}$ (точка Га1) и образцы микробного мата,

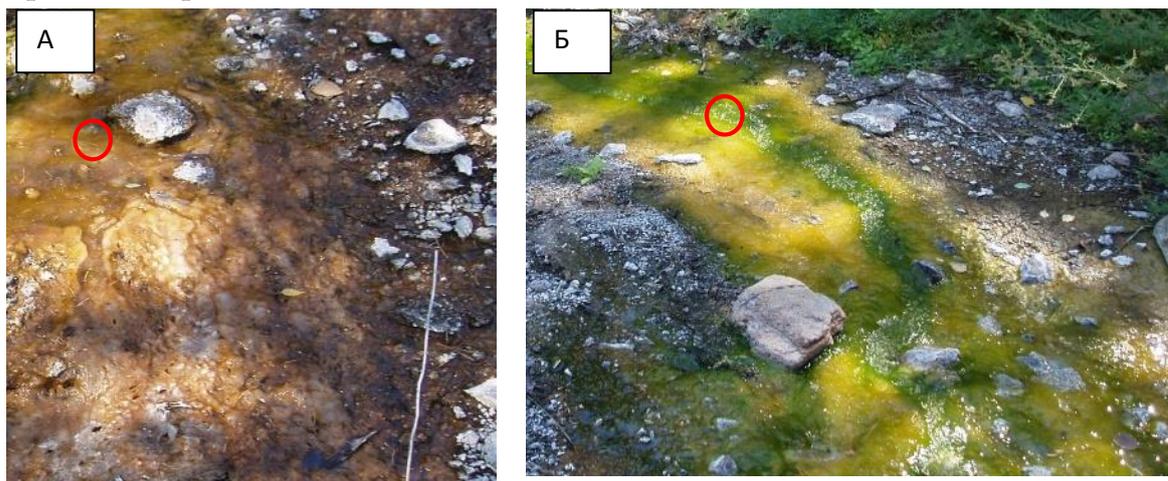


Рис. 1. Цианобактериальный мат источника Гаргинского. А – микробный мат в верхней части потока, красным кольцом отмечено место отбора пробы - точка Га-2; Б – цианобактериальный мат в средней части потока, красным кругом отмечено место отбора пробы - точка Га-3

развивающиеся в течении ручья при разных температурах: 70°C (точка Га2, Рис.1А), 55°C (точка Га3, Рис.1А) и 45°C (точка Га4). Данные о генетическом разнообразии исследованных образцов в виде накопительных столбчатых диаграмм представлены на рисунке 2.

Согласно проведенному анализу в наиболее высокотемпературной точке в микробных обрастаниях доминировали бактерии типов Firmicutes (Bacilli) (21,9%) и Proteobacteria (21,4%), а также Archaea (19,8%). Представители Firmicutes (Bacilli) были более всего близки по полученным последовательностям к мезофильным бактериям и скорее всего попали в образец с поверхностными потоками. Наиболее представленным типом архей оказались Crenarchaeota. ОТЕ–1 (операционная таксономическая единица) образца Га1, составляющая 7.9% от числа всех последовательностей и почти половину всех последовательностей архей, наиболее близка к *Thermoproteus uzonensis* [Mardanov et al., 2011] выделенной из проб, отобранных в кальдере вулкана Узон на Камчатке. Согласно данным, представленным в статье, ее оптимум рН составляет 5.5. Но тем не менее

в источнике Гаргинском она активно развивается при более высоком рН. Еще один вид ОТЕ–3 образца Га1, 4.4% от общего числа последовательностей, имеет уровень схожести 99% к штамму *Vulcanisaeta souniana*, выделенному из горячих источников Японских островов [Itoh et al., 2002].

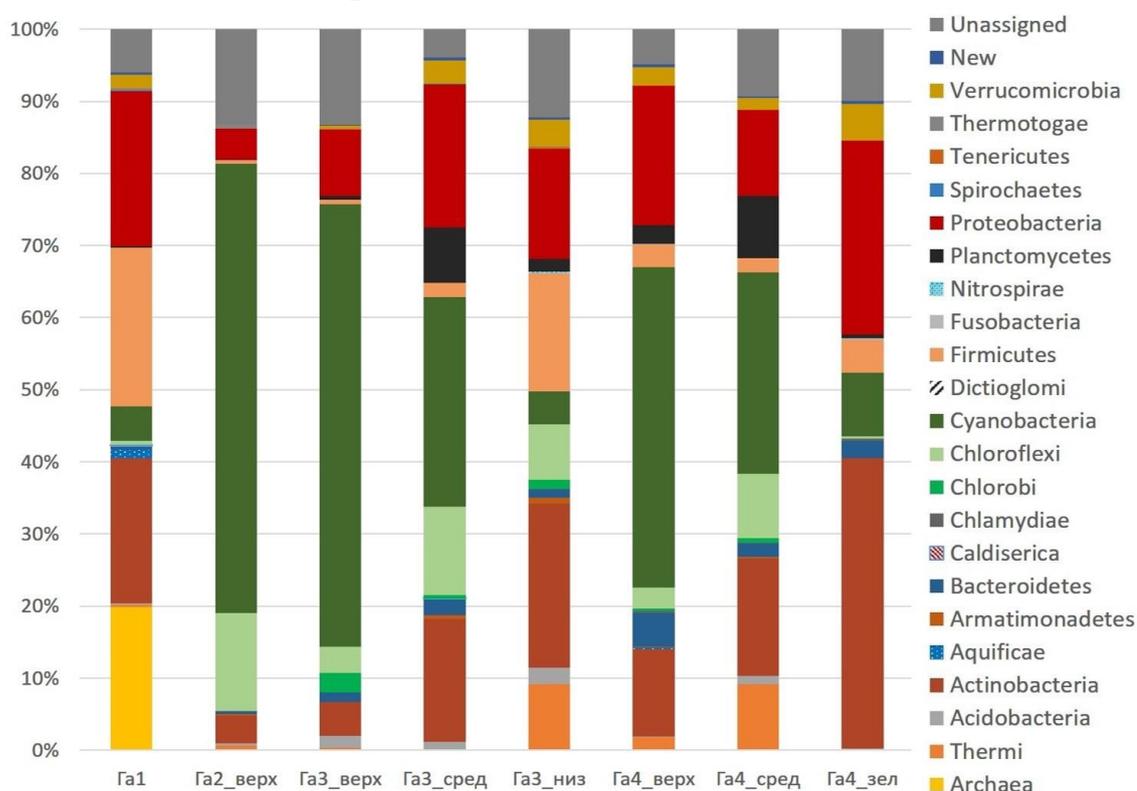


Рис. 2. Представленность различных типов микроорганизмов в исследуемых образцах микробного мата источника Гаргинского согласно 16S рНК метагеномному анализу.

Эта архея также относится к ацидофильным и анаэробным. Для других ОТЕ–7 и ОТЕ–84, имеющих долю от общего числа последовательностей по 2.8%, не было выявлено близкого сходства по последовательности гена 16S рНК к известным видам. Для ОТЕ–7 последовательности со степенью сходства 96% были обнаружены в геотермальных источниках Японии [Kimura et al., 2010] и Таиланда (NCBI/nr). Для последовательности ОТЕ–84 последовательности со степенью сходства 97% были обнаружены в геотермальных источниках Исландии [Mirete et al., 2011]. Менее представленные последовательности архей в большинстве случаев имели схожесть на уровне менее 95% к последовательностям в базах данных NCBI.

Основу микробного мата (точки Га2 – Га4) источника Гаргинского составляют цианобактерии, близкие к *Leptolyngbya* sp. O-77, выделенному из горячих источников Японии [Nakatogí et al., 2014]. Доля последовательностей этого микроорганизма среди всех последовательностей для каждой пробы достигает 60% в верхних слоях микробного мата. Присутствие *Leptolyngbya*

наблюдается в микробных матах нейтральных и щелочных геотермальных источников Румынии [Coman et al., 2013], Тенгчонг (Китай) [Pagaling et al., 2012], Неоquen (Аргентина) [Urbieta et al., 2015], Йеллоустон (США) [Lau et al., 2005], доминирование цианобактерий этого рода в микробных матах описано для гидротерм северо-востока Австралии [McGregor et al., 2008], Гренландии [Roeselers et al., 2007]. Доминирование цианобактерий, наиболее близко относящихся к *Leptolyngbya* наблюдается и в других источниках Прибайкалья согласно данным Gaisin с соавторами [Gaisin et al., 2015]. Кроме *Leptolyngbya*, в отдельных образцах значительную представленность имеет род *Synechococcus*, ОТЕ-1 в образце Га2-верх, и представители *Nostocaceae*, ОТЕ-4 в образце Га3-сред.

Анализ аноксигенных фототрофов выявил наличие трех групп микроорганизмов, две из которых относятся к типу Chloroflexi, это ОТЕ порядка *Chloroflexus* и *Anaerolineae* [Yamada et al., 2006], еще одна группа, это микроорганизмы, относящиеся к типу Chlorobi [Bryant et al., 2012]. Аноксигенные фототрофные бактерии часто образуют слои микробного мата в которых они преобладают, обычно это слой, расположенный ниже под слоем цианобактерий, что, например, наблюдается в расположенном в пределах одной рифтовой зоны геотермальном источнике Аллинском [Gaisin et al., 2015]. Однако в микробном мате источника Гаргинского не сформировались слои, в которых они бы доминировали.

Во всех образцах микробного мата источника Гаргинского и в образце Га1 представители типов Proteobacteria и Actinobacteria доминировали среди гетеротрофных микроорганизмов. Тип Actinobacteria в основном был представлен двумя порядками: *Acidimicrobiales* и *Actinomycetales*. Разнообразие Proteobacteria было выше чем у Actinobacteria, в основном они были представлены порядками: *Rhizobiales*, *Rhodobacterales*, *Rhodospirillales*, *Sphingomonadales*, *Burkholderiales*, *Pseudomonadales* и *Xanthomonadales*.

Присутствие представителей типа Proteobacteria в значительном количестве описано для микробных сообществ, в том числе и микробных матов практически всех геотермальных источников: Анды, Колумбия [Jiménez et al., 2012], Южная Африка [Tekere et al., 2013], Камчатка (Мутновский, кальдера вулкана Узон) [Bernd Wemheuer et al., 2013], Малазия [Chan et al., 2015], Тенгчонг (Китай) [Pagaling et al., 2012], Румыния [Coman et al 2013] Испания [López-López et al., 2015], Йеллоустон (США) [Meyer-Dombard et al., 2005] и др. Представители же типа Actinobacteria не описываются как доминирующие в микробных сообществах геотермальных источников. Однако их присутствие показано для многих источников: Камчатка (Россия), Тенгчонг (Китай), Невада (США) [Song et

al., 2009], Бор-Кхлуенг (Тайланд) [Kanokratana et al., 2004], Япония [Iino et al., 2010] и во многих других.

В среднем и нижнем слоях микробного мата источника Гаргинского появляются в значительных количествах представители других типов. Так, в среднем слое микробного мата (образец Га3-сред и Га2-сред), выявлено наличие представителей типа Planctomycetes, они занимают 7-9% от общего числа последовательностей. Представители типа Verrucomicrobia наблюдались в количестве до 5% в образцах, отобранных из точек Га3 (кроме Га3 верх) и Га4. Наличие представителей типа Planctomycetes и Verrucomicrobia описано для многих геотермальных источников. В анаэробном слое точки Га3 (55°C) (образец Га3-низ, (рис. 11.)) были выявлены представители типа Firmicutes в количестве 14.6%, в основном класс *Clostridia*.

16S рРНК метагеномный анализ бентосного микробного сообщества источника Заварзина (Камчатка)

Геотермальные воды источников кальдеры вулкана Узон представлены в основном кислыми и нейтральными источниками. Общий вид микробных матов, характерных для термальных источников кальдеры вулкана Узон представлен на рисунке 3А. В жерле источника Заварзина, расположенного в кальдере вулкана Узон, были выявлены накипные донные бурые органо-минеральные матоподобные структуры коричневого цвета, толщиной около 0,3 см (**бентосное микробное сообщество**) (Рис.3Б).

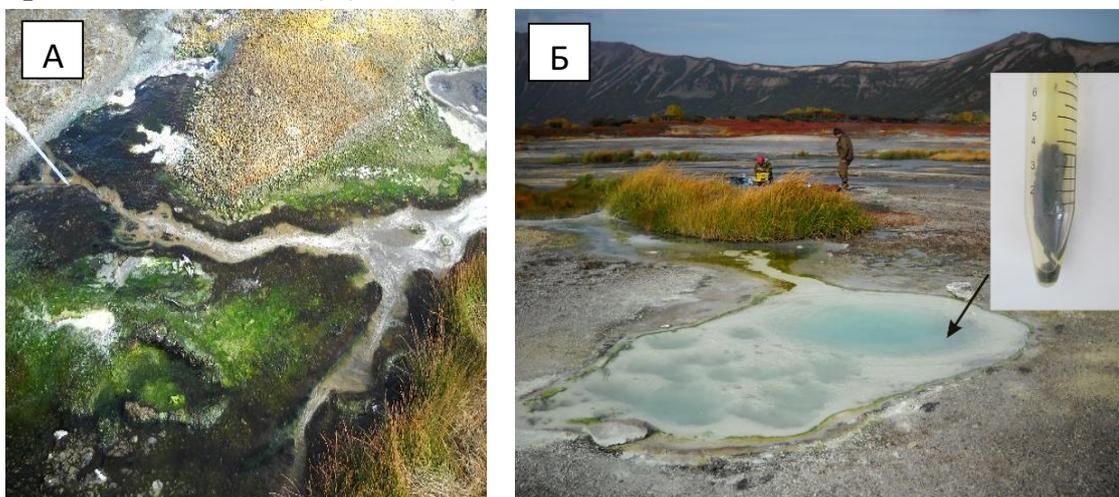


Рис.3. Микробные образования геотермальных источников кальдеры вулкана Узон. Обозначения: А – Общий вид микробных образований, характерных для щелочных и нейтральных термальных источников; Б – микробные сообщества, представленные нитями серных бактерий.

Для анализа филогенетического состава микробного сообщества бентосного микробного мата источника Заварзина был применен метод метагеномного секвенирования гена 16S рРНК. По результатам исследования

были получены данные о численности микроорганизмов, населяющих бентосный микробный мат источника Заварзина. Соотношение выделенных таксономических групп микроорганизмов в сообществе бентосного мата источника Заварзина представлено на рисунке 4.

В основном в состав бентосного микробного сообщества входили представители матрикс образующих гетеротрофных бактерий *Caldiserica* [Mori et al., 2009] и *Dictyoglomi* [Saiki et al., 1985], широко распространенных в геотермальных местах обитания. К автотрофным микроорганизмам относятся представители Aquificae, азотфиксацию могут обеспечивать представители Nitrospirae [Sonne-Hansen & Ahring, 1999] и Thaumarchaeota [Pester et al., 2011]. Большинство микроорганизмов, обнаруженных в бентосном микробном сообществе, или сами относятся к хемогетеротрофам, или к ним относятся их ближайшие родственные микроорганизмы. Среди полученных последовательностей 2.7% были отнесены к домену Archaea. Были обнаружены представители типов Crenarchaeota (1%), Euryarchaeota (0.1%) и Thaumarchaeota (1.6%). Разнообразие представленных в сообществе типов очень велико, что говорит о большом разнообразии процессов, протекающих в бентосном микробном сообществе.

Было проведено сравнение полученных данных с данными по микробному составу вод источника Заварзина, опубликованными в 2011 году в работе Гумерова [Gumerov et al., 2011]. В результате было показано, что состав микробного сообщества вод и бентосного микробного сообщества источника Заварзина имеют значительное качественное сходство, но сильно отличается по доминирующим видам. Только представители Aquificae занимают значительную долю и там, и там, в водах это самая многочисленная группа - 32.3%, а в бентосном микробном сообществе 12.7% от общего числа последовательностей [Gumerov et al., 2011]. Качественно схожие данные для этого источника были получены в работе Burgess с соавторами [Burgess et al., 2012], но несовпадение в постановке экспериментов и применяемых подходах не позволяет провести количественное сравнение. Обнаруженные в работе последовательности имеют сходство как с последовательностям известных микроорганизмов, выделенных из геотермальных мест Камчатки, Японии и Йеллоустон (США), так и с последовательностям некультивируемых микроорганизмов. Наибольший уровень сходства наблюдался с последовательностями, полученным в ходе метагеномных исследований геотермальных источников Камчатки. [Burgess et al., 2012]

Выделение термофильных микроорганизмов. Их описание и филогенетический анализ.

Из проб донных отложений и микробных образований, отобранных в геотермальных источниках Прибайкалья и Камчатки, были выделены аэробные

термофильные микроорганизмы порядка *Bacilli*. Полученные штаммы росли при рН от 6.5 до 11, и при температуре от 50 до 75°C. Согласно филогенетическому

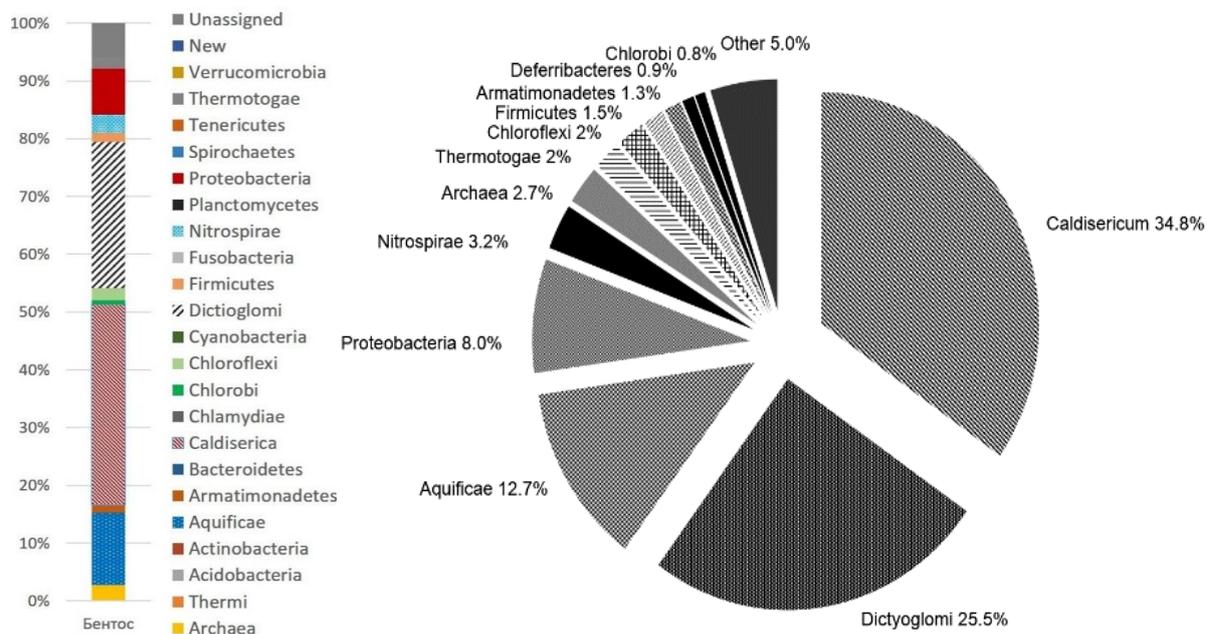


Рис. 4. Соотношение таксонов микроорганизмов, выделенных из бентосного сообщества источника Заварзина на основании анализа данных метагеномного секвенирования гена 16S рРНК. Слева – столбчатая диаграмма аналогичная той, что представлена для микробных сообществ источника Гаргинского. С права - круговая диаграмма в порядке уменьшения представленности типа.

анализу по гену 16S рРНК полученные штаммы определены как: бактерии рода *Geobacillus icigianus* (Камчатка), бактерии рода *Geobacillus stearothermophilus* (Прибайкалье), бактерии рода *Anoxybacillus thermanum* (Камчатка), бактерии рода *Anoxybacillus flavithermus* (Прибайкалье), бактерии рода *Thermoactinomyces sp.* (Прибайкалье). Для представителей всех пяти групп микроорганизмов, выделенных в ходе работы, было проведено полногеномное секвенирование.

Согласно проведенному филогенетическому анализу штамм *Geobacillus sp.* G1W1, выделенный из проб, отобранных в геотермальных источниках Камчатки, на филогенетическом древе располагается на отдельной ветви, достаточно удаленной от типовых штаммов, что позволило выявить его принадлежность к новому, ранее не известному виду, после чего он был подробно описан и депонирован как новый вид *Geobacillus icigianus* [Bryanskaya et al., 2014].

Исследование свойств ферментов, участвующих в деструкции лигноцеллюлозы, найденных в геноме *G. stearothermophilus* штамм 22 (Прибайкалье).

При аннотировании полученных последовательностей в геноме *G. stearothermophilus* штаммов 22 и 53 (Прибайкалье), были обнаружены последовательности генов, участвующих в деструкции гемицеллюлозы. Выявлен

оперон, состоящий из 5 генов: эндо-1,4-β-глюканазы, ксилан-1,4-β-ксилозидазы, эндо-1,4-β-ксилазазы, α-глюкуронидазы, α-L-арабинофуранозидазы. Обнаруженные гены ферментов ксилан-1,4-β-ксилозидазы, эндо-1,4-β-ксилазазы, α-глюкуронидазы, α-L-арабинофуранозидазы были клонированы в экспрессирующую конструкцию *E.coli*. Результаты электрофоретического разделения белков биомассы полученных рекомбинантных штаммов *E.coli*, отобранных для дальнейшей работы, после индукции экспрессии, представлены на рисунке 5.

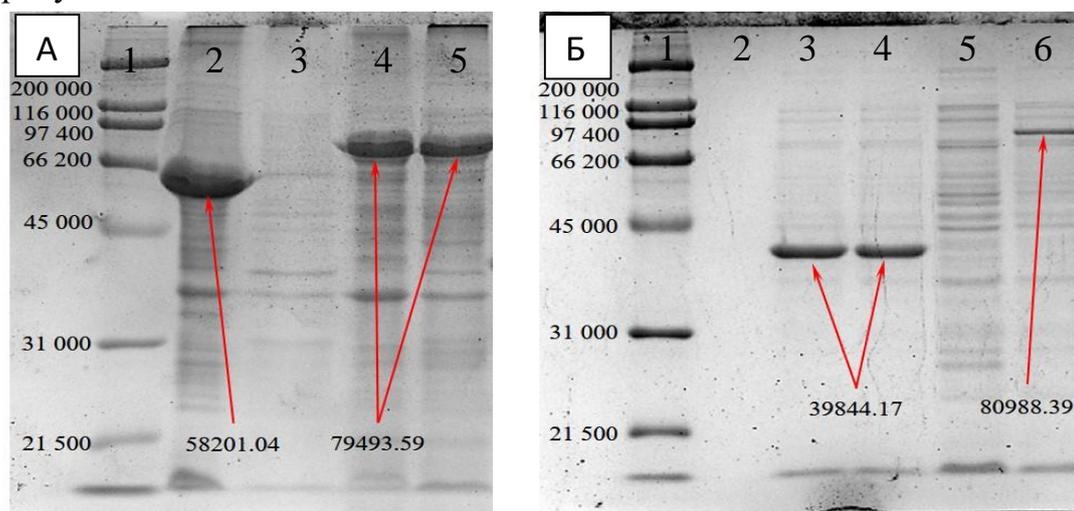


Рис. 5. Электрофореграмма белков клонов *E.coli*, несущих экспрессирующий вектор pQE30 со встроенными генами ферментов. (А) 1 дорожка – маркер молекулярного веса (BioRad); 2,3 – клетки, несущие конструкции для синтеза α-L-арабинофуранозидазы; 4, 5 – клетки, несущие конструкции для синтеза ксилан-1,4-β-ксилозидаз. (Б) 1 дорожка – маркер молекулярного веса (BioRad); 2 – пустая дорожка; 3, 4 – клетки, несущие конструкции для синтеза эндо-1,4-β-ксилазазы; 5, 6 – клетки, несущие конструкции для синтеза α-глюкуронидазы.

Соответствие рекомбинантных белков ферментам деструкции лигноцеллюлозы *G. stearothermophilus* штамма 22 было подтверждено при помощи масс-спектрометрического анализа триптических гидролизатов белковых фракций, полученных в ходе электрофоретического разделения в ПААГ-ДСН, и секвенирования экспрессирующих векторов.

Изучение свойств полученных рекомбинантных ферментов

На рисунке 6 приведены графики зависимости ферментативных активностей полученных нами препаратов рекомбинантных белков от температуры и pH. Из приведённых графиков можно видеть, что все три исследованных ферментных препарата сохраняют активность при температуре 60°C. Рекомбинантная ксилан-1,4-β-ксилозидаза и эндо-1,4-β-ксилаза активны в диапазоне pH от 4 до 6,5, тогда как α-глюкуронидаза активна при pH > 6,5 и имеет оптимум при pH 7,5 – 8,0. Близкие свойства были описаны для наиболее схожих по последовательности

ферментов, выделенных из родственных микроорганизмов *G.stearotermofillus* [Zaide et al., 2001] [Rastogi et al., 2010] [Huang et al., 2014]. Температурный оптимум роста *G.stearotermofillus* штамм 22, в геноме которого были обнаружены гены ферментов деструкции лигноцеллюлозы, составляет более 60°C, при этом штамм сохраняет способность к росту до 75°C. Согласно полученным данным о свойствах ферментов, их температурная стабильность оказалась несколько ниже температурного максимума роста микроорганизма, в геноме которого они были обнаружены.

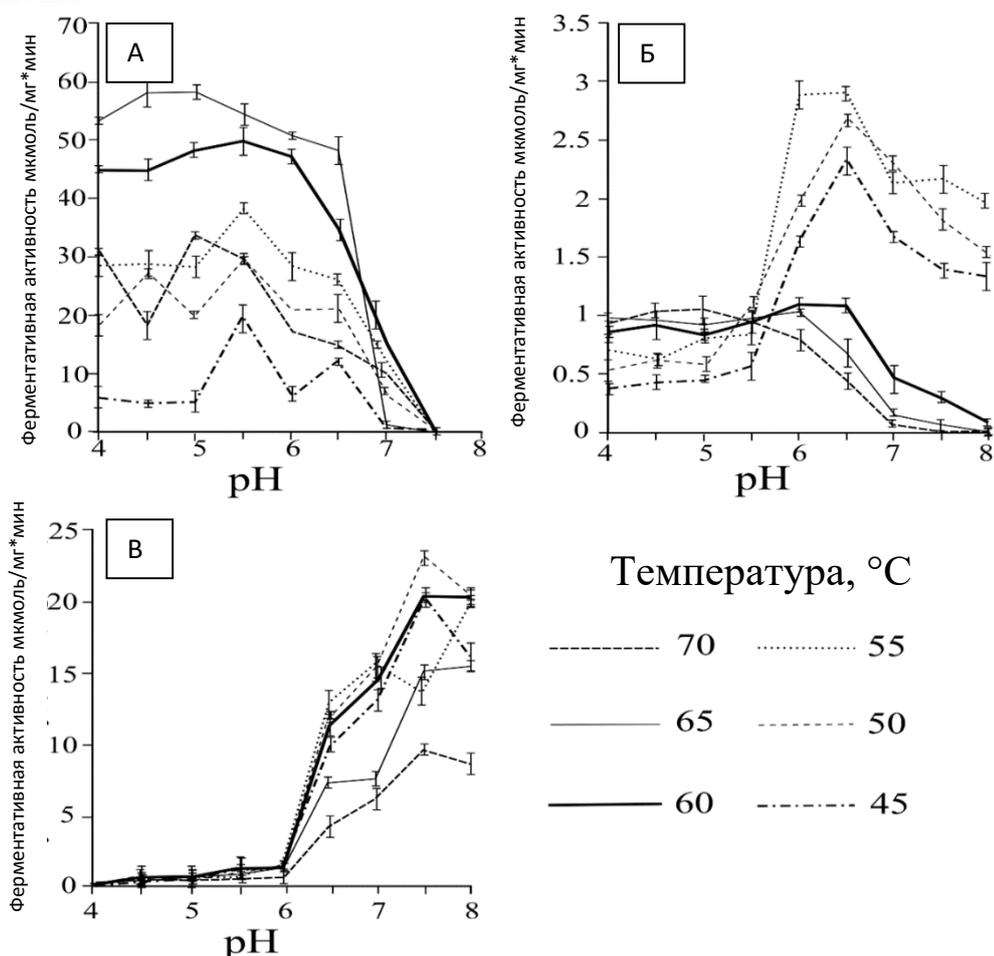
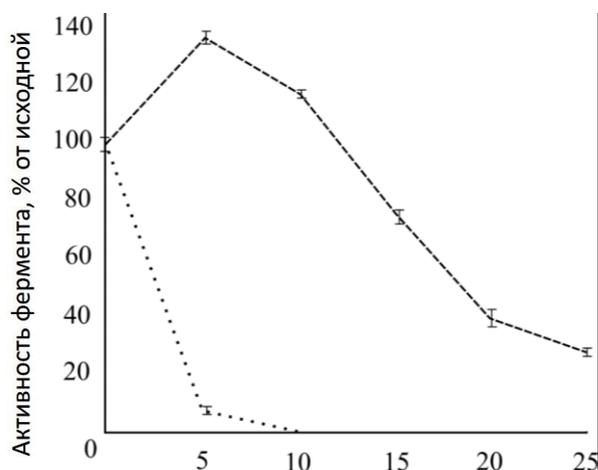


Рис. 6. Зависимость активности полученных ферментных препаратов от температуры и рН. А – активность ксилан-1,4-β-ксилозидазы; Б – активность эндо-1,4-β-ксиланазы; В – активность α-глюкуронидаза;

Анализ влияния 1-бутил-3-метилимидазолиум хлорида [bmim]Cl на свойства эндо-1,4-β-ксиланазы и ксилан-1,4-β-ксилозидазы (Рис.7.) показал, что полученный нами фермент ксилан-1,4-β-ксилозидаза демонстрирует увеличение ферментативной активности при концентрации ионной жидкости 5 и 10%. При дальнейшем повышении концентрации ионной жидкости ферментативная активность падает, и при 15%-ной концентрации [bmim]Cl теряется около 30%

активности от контрольной. Дальнейшее повышение концентрации [bmim]Cl сопровождается усилением падения ферментативной активности.

При максимальной исследованной концентрации ионной жидкости 25%, активность ферментативного препарата ксилан-1,4- β -ксилозидазы составила



Концентрация [bmim]Cl в реакционной смеси

Рис. 7. Активность ферментов в присутствии различных концентраций ионных жидкостей. Пунктиром — ксилан-1,4- β -ксилозидаза, точками — эндо-1,4- β -ксилазы

около 30% от активности, показанной для ферментативного препарата в оптимальных условиях без ИЖ. Ферментативная активность рекомбинантного фермента эндо-1,4- β -ксилазы демонстрирует резкое снижение уже при минимальной концентрации [bmim]Cl, равной 5%. При концентрации [bmim]Cl, равной 10%, ферментативная активность препарата эндо-1,4- β -ксилазы не наблюдается. Согласно представленным в литературе данным о влиянии ионных жидкостей на ферменты

нет общей тенденции к потере или увеличению активности при низких концентрациях ИЖ, также по-разному реагируют ферменты и на более высокие концентрации ИЖ [Jaeger, Pfaendtner 2013]. На примере целлюлаз термофильных микроорганизмов было показано, что ферменты ингибируются ИЖ по-разному, и способны работать при максимальных концентрациях ИЖ от 0 до 40% [Gladden et al., 2014].

ВЫВОДЫ

1. Основой микробного мата источника Гаргинского (Прибайкалье) являются цианобактерии, рода *Leptolyngbya*. Аноксигенные фототрофы типов Chloroflexi (*Chloroflexus*, *Anaerolineae*) и Chlorobi не занимали доминирующего положения, но присутствовали в значительном количестве в высокотемпературных частях микробного мата. Большую часть гетеротрофных микроорганизмов составили представители типов Proteobacteria и Actinobacteria. Археи в значительном числе (19.9%) были выявлены в самом высокотемпературном (74°C) образце из исследованных. Метаболизм микробного мата в основном строится на взаимодействии фотоавтотрофных и гетеротрофных микроорганизмов.

2. Структуру бентосного микробного сообщества источника Заварзина формируют представители типов *Caldiserica* (34,8%) и *Dictyoglomi* (25,5%). Менее представленными в исследуемом бентосном сообществе были бактерии, обеспечивающие первичную продукцию, литоавтотрофные бактерии *Aquificae* (12,7%). Следующие по численности представители *Deltaproteobacteria* (7,3%). Азотфиксацию в сообществе обеспечивают *Nitrospirae* (3,2%).

3. Выделенные в чистую культуру из образцов микробных матов и донных отложений Камчатки и Прибайкалья бактерии филогенетически были отнесены к трем родам: *Geobacillus*, *Анохубациллус* и *Термоактиномицес*.

4. Штамм *Geobacillus* sp. G1W1, выделенный из образцов донных отложений геотермальных источников Камчатки, определен как новый вид - *Geobacillus icigianus* тип Firmicutes.

5. Согласно данным полногеномного секвенирования в геноме *G.stearothermophilus* (штаммы 22 и 53) выявлены гены четырех ферментов деструкции лигноцеллюлозы: эндо-1,4-β-ксиланазы, ксилан-1,4-β-ксилозидазы, α – глюкуронидазы и α-L-арабинофуранозидазы. На основе найденных генов были получены соответствующие рекомбинантные продуценты.

6. Найденные ферменты эндо-1,4-β-ксиланаза, ксилан-1,4-β-ксилозидаза и α–глюкуронидаза являются термостабильными и проявляют ферментативную активность при температуре 60°C.

7. Установлено, что ксилан-1,4-β-ксилозидаза ингибируется 1-бутил-3-метилимидазолиум хлоридом только при концентрации 15% и более.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах списка ВАК, рекомендованные для защиты диссертации:

1. **Rozanov, A. S.**, Ivanisenko, T. V., Bryanskaya, A. V., Shekhovtsov, S. V., Logacheva, M. D., Saik, O. V., Malup, T. K., Demenkov, P. S., Goryachkovskaya, T. N., Ivanisenko, V. A., & Peltek, S. E. (2014). Bioinformatics analysis of the genome of *Geobacillus stearothermophilus* 22 Strain isolated from the Garga hot spring, Baikal Region. *Russian Journal of Genetics: Applied Research*, 4(4), 267-272.
2. Bryanskaya, A., **Rozanov, A.**, Slynko, N., Shekhovtsov, S., & Peltek, S. (2014). *Geobacillus icigianus* sp. nov., a new thermophilic bacterium isolated from Valley of Geysers, Kamchatka. *Int j syst evol micr*, ijs-0.
3. **Rozanov, A. S.**, Meshcheryakova, I. A., Shekhovtsov, S. V., & Peltek, S. E. (2014). Current state of genetic and metabolic engineering of the genus *Geobacillus* aimed at production of ethanol and organic acids. *Russian Journal of Genetics: Applied Research*, 4(3), 218-226.
4. **Rozanov Aleksei S.**, Sushentseva Natalya N., Malup Tatiana K., Goryachkovskaya Tatiana N., Demidova Elisaveta V., Meshcheriakova Irina A., Demidov Evgeniy A., Peltek Sergey E. Analysis of enzymes of the hemicellulose

complex from *Geobacillus stearothermophilus* 22 VKPM B-11678 isolated from Garga hot spring, Russia (2015) Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic, Accepted manuscript (unedited version) available online: 9-APR-2015, DOI information: 10.1016/j.molcatb.2015.04.001

5. N.L. Dobretsov, E.V. Lazareva, S.M. Zhmodik, A.V. Bryanskaya, V.V. Morozova, N.V. Tikunova, S.E. Peltek, G.A. Karpov, O.P. Taran, O.L. Ogorodnikova, I.S. Kirichenko, **A.S. Rozanov**, I.V. Babkin, O.V. Shuvaeva, E.P. Chebykin (2015). Geological, hydrogeochemical, and microbiological characteristics of the Oil site of the Uzon caldera (Kamchatka). Russian Geology and Geophysics, 56(1), 39-63
6. **Rozanov, A. S.**, Bryanskaya, A. V., Malup, T. K., Meshcheryakova, I. A., Lazareva, E. V., Taran, O. P., Ivanisenko, T.V., Ivanisenko, V.A., Zhmodik, S.M., Kolchanov, N.A. & Peltek, S. E. (2014). Molecular analysis of the benthos microbial community in Zavarzin thermal spring (Uzon Caldera, Kamchatka, Russia). BMC genomics, 15(Suppl 12), S12.

Получен патент на штамм *Escherichia coli* EX pQE30 - продуцент эндоксилаказы бактерии *Geobacillus st. 22*. (Авторы: **Розанов А.С.**, Демидова Е.В., Малуп Т.К., Пельтек С.Е. № 2542486, Оpubл. 20.02.15)

Тезисы на 1-й Российской и 3-х международных конференциях.

1. **Розанов А.С.**, Сушенцева Н.Н., Малуп Т.К., Горячковская Т.Н., Демидова Е.В., Мещерякова И.А., Демидов Е.А., Брянская А.В., Пельтек С.Е. Изучение ксиланолитических ферментов *Geobacillus stearothermophilus* 22 VKPM B-11678 (Горячий источник Гарга, Россия) 2015 [VIII Московский международный конгресс "БИОТЕХНОЛОГИЯ: СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ"]

2. A.V. Bryanskaya, **A. S. Rozanov**, T. K. Malup, E. V. Lasareva, O. P. Taran, T. V. Ivanisenko, V. A. Ivanisenko, N. A. Kolchanov, S. E. Peltek Microbial Communities of the Thermal Springs of the Geyser Valley and Uzon Caldera (Kamchatka) Using Pyrosequencing 2014 [10th International Congress on Extremophiles]

3. Брянская А.В., **Розанов А.С.**, Малуп Т.К., Старостин К.В., Демидов Е.А., Шеховцов С.В., Мещерякова И.А., Горячковская Т.Н., Банникова С.В., Сушенцева Н.Н., Демидова Е.А., Голубева Е.С., Уварова Ю.Е., Пельтек С.Е. Характеризация коллекции экстремофильных микроорганизмов ИЦИГ СО РАН 2014 [VI съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров (ВОГиС) и ассоциированные генетические симпозиумы]

4. **Розанов А.С.**, Брянская А.В., Малуп Т.К., Лазарева Е.В., Таран О.П., Иванисенко Т.В., Иванисенко В.А., Жмодик С.М., Колчанов Н.А., Пельтек С.Е. Сравнительный анализ состава микробного сообщества воды и бентоса термального источника Заварзина, кальдера Узон, Камчатка. - 2013 [международная научная конференция «Экология и геохимическая деятельность микроорганизмов экстремальных мест обитаний»]