

УДК 579.26  
DOI: 10.18101/2587-7143-2018-3-26-33

**РАСПРОСТРАНЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ В ВЕРХНИХ СЛОЯХ  
ПОДЗЕМНОЙ БИОСФЕРЫ В ЩЕЛОЧНЫХ ГИДРОТЕРМАХ  
БАРГУЗИНСКОЙ ДОЛИНЫ**

**Е. В. Лаврентьева, Т. Г. Банзаракаева, А. А. Раднагуруева,  
В. Б. Дамбаев, С. П. Бурюхаев, В. Г. Будагаева, Д. Д. Бархутова**

**© Лаврентьева Елена Владимировна**

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник,  
Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН  
Россия, 670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6  
Бурятский государственный университет  
Россия, 670000, г. Улан-Удэ, ул. Смолина 24а  
E-mail: lena\_l@rambler.ru

**© Банзаракаева Туяна Геннадьевна**

кандидат биологических наук, научный сотрудник,  
Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН  
Россия, 670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6

**© Раднагуруева Арюна Арсалановна**

кандидат биологических наук, младший научный сотрудник,  
Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН  
Россия, 670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6

**© Дамбаев Вячеслав Борисович**

кандидат биологических наук, научный сотрудник,  
Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН  
Россия, 670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6

**© Бурюхаев Савелий Петрович**

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник,  
Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН  
Россия, 670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6

**© Будагаева Валентина Григорьевна**

аспирант, Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН  
Россия, 670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6

**© Бархутова Дарима Дондоковна**

кандидат биологических наук,  
Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН  
Россия, 670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6

В данной статье представлены результаты гидрохимических исследований воды в транзитной зоне смешения подземных и поверхностных вод в системе щелочных и слабоминерализованных вод гидротерм Кучигер и Умхей. Было установлено, что в нижних слоях донных осадков температура увеличивается до 45–47 °С. Показано рас-

пространение основных функциональных групп бактерий в донных осадках. Численность гидролитических бактерий уменьшалась к нижним слоям, количество сульфатредуцирующих бактерий (СРБ) в осадках было распределено неравномерно. Культуры сапрофитных и протеолитических бактерий были представлены *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., целлюлолитики — морфотипами родов *Clostridium* и *Cellvibrio*. Среди СРБ преобладали Грам-бактерии в форме вибриона (*Desulfovibrio* sp.) и споровые палочковидные Грам+ бактерии (возможно, *Desulfotomaculum* sp.). Из накопительных культур были выделены бактерии, способные осуществлять первую стадию разложения многих органических полимеров до низкомолекулярных соединений.

**Ключевые слова:** подземная биосфера; зона смешения; гидротермы Баргузинской долины; микроорганизмы.

Подземная биосфера представлена геологически разделенными друг от друга экосистемами, различающимся по физико-химическим, геологическим и трофическим характеристикам (Всевожский, 1991). В формировании химического состава и свойств подземной воды активно участвуют микроорганизмы. Исследования последних лет сформировали общую картину функционирования подземной биосферы: ограниченные источники энергии, лимитированное количество акцепторов и доноров электронов, нехватка микробиологически разлагаемых органических источников углерода (Phelps et al. 1989, Pedersen, 1993, Takai et al. 2001, Onstott et al., 2009; Wanger et al. 2006, Biddle et al., 2006, Huber et al., 2007, Schrenk et al., 2010). В последнее время начаты исследования функционального разнообразия микробных сообществ в верхних зонах подземной сферы щелочных минеральных источников (Намсараев и др. 2006, Brazelton et al., 2010, Tiago, Verissimo, 2012). Эта транзитная зона смешения подземных и поверхностных вод в системе щелочных и слабоминерализованных вод считается своеобразными «окнами» в подземную гидросферу (Sleep et al., 2004). В настоящее время эти исследования находятся на начальном этапе, и открывает широкие возможности получения новых знаний о прокариотной жизни.

Цель исследования: изучить распространение микроорганизмов в зоне смешения поверхностных и подземных вод гидротерм Кучигер и Умхэй.

#### **Объекты и методы исследования**

В период с 2015 по 2017 г. были исследованы горячие источники Умхэй и Кучигер (Баргузинская долина, Республика Бурятия). Физико-химические параметры воды и донных осадков определены в зоне смешения подземных и поверхностных вод в гидротермах Кучигер: Ку-1 (выход горячих вод вблизи грязевой ванны) и Ку-2 (котлован с выходами горячих вод). На минеральных источниках Умхэй — на станциях Um-1 (каптированный выход минеральных вод), Um-2 (некаптированный выход с микробными обрастаниями) и Um-3 (небольшое газизирующее термальное озеро).

Микроэлементный состав воды определен в Геологическом институте СО РАН (г. Улан-Удэ), на масс-спектрометре с индуктивной связанной плазмой высокого разрешения ICP-MS Element XR (Thermo Scientific Fisher, Германия).

Определение внеклеточной протеазной активности в культуральной жидкости у изученных культур проводили по методу Эрлангера с соавт. (Erlanger et al., 1961), используя 5 мМ пара-нитроанилидные субстраты протеаз — трипсиноподобных, химотрипсиноподобных, субтилизиноподобных, цистеиновых и аминок-

пептидаз (ВАРА, GlpFpNA, GlpAALpNA, GlpFApNA и TrpNA, ApNA, LpNA, соответственно) и на белковом субстрате азоказеине, используемом для определения общей активности. Для определения оптимума рН активности исследуемых протеиназ в диапазоне рН 5-12 использовали цитрат-фосфатный, фосфатный и гидрокарбонатный буфер. Температурный оптимум ферментов определяли после 5-минутной инкубации при температурах от 23–80°C.

**Результаты и их обсуждение**

За период исследований температурный режим в донных осадках термальных источников оставался достаточно стабильным, 35,9–40,4 °С в поверхностных слоях источника Кучигер, 35,6–43 °С — в термальном озере Умхэй (таблица 1). Послойное измерение температуры выявило увеличение данного параметра с углублением, так в термальных грязях Кучигера на глубине 60 см в разные годы температура достигала 45–47 °С. В осадках термального озера Умхэй температура также повышалась до 40,4–47 °С в нижних слоях на глубине 12 см. Ниже 12 см начинались твердые горные породы. Исследуемые местообитания характеризуются восстановленными условиями, окислительно-восстановительный потенциал был в пределах — 35 — -400 Мв. Реакция среды была щелочная (рН 9,6-10.1).

В воде и донных осадках термальных источников определен макро- и микро-элементный состав. Основным катионом в минеральных водах является натрий (до 148,6 мг/л — Умхэй, 183,4 мг/л — Кучигер). Среди анионов в водах источника Умхэй преобладали  $\text{HCO}_3^-$  (73,22 мг/л) и  $\text{SO}_4^{2-}$  (55,9 мг/л), в водах источника Кучигер эти же анионы, только в обратном порядке  $\text{SO}_4^{2-}$  (74,8 мг/л) и  $\text{HCO}_3^-$  (51,87 мг/л). Общая минерализация в исследуемых источниках составляла 0,3 — 0,5 г/л.

Таблица 1

Физико-химические параметры в исследуемых источниках, 2016 г.

| Источник                | Донные осадки |      | Вода |     |        |        |
|-------------------------|---------------|------|------|-----|--------|--------|
|                         | слой, см      | t °С | t °С | рН  | М, г/л | Eh, Мв |
| Кучигер, станция Ку — 1 | -             | -    | 38,2 | 9,8 | 0,37   | -35    |
| Кучигер, станция Ку — 2 | 0 — 10        | 42,8 | 40,9 | 9,7 | 0,32   | -50    |
|                         | 20            | 42,4 |      |     |        |        |
|                         | 30            | 42,9 |      |     |        |        |
|                         | 45            | 43,9 |      |     |        |        |
|                         | 50            | 44,2 |      |     |        |        |
|                         | 60            | 45   |      |     |        |        |
| Умхэй, станция Ум-1     | -             | -    | 47,9 | 9,6 | 0,3    | - 400  |
| Умхэй, станция Ум-2     | -             | -    | 40,6 | 9,5 | 0,15   | - 305  |
| Умхэй, станция Ум-3     | 0-5           | 43   | 43   |     | 0,32   | - 324  |
|                         | 5-6           | 45,8 |      |     |        |        |
|                         | 12            | 47   |      |     |        |        |

М — минерализация  
 — осадки не отбирались

В балансе микроэлементов донных осадков гидротерм Кучигер и Умхэй обнаружен высокий процент содержания литофильных элементов (88,7–97,5%) при низких процентах элементов халькофильной (2,2–10,5%) и сидерофильной (0,3–0,9%) групп. Послойный обзор элементов по данной классификации, показал, что с увеличением глубины в осадках источника Кучигер содержание элементов литофильной группы незначительно повышается. В осадках термального озера Умхэй соотношение этих групп по слоям практически не изменяется. В воде исследуемых гидротерм также отмечен высокий процент литофильной группы элементов (81,1–94,4%). Сравнительный анализ обоих источников показал, что в источнике Кучигер содержание халькофильной группы выше (16,4% — вода; 7,9–10,5% — осадки), чем в источнике Умхэй (3,1% — вода; 2,3% — осадки). Поскольку халькофильная группа по классификации Гольдшмидта — это химические элементы сульфидных руд, то, вероятно их количество связано с высокой концентрацией серы в источнике Кучигер — от 15,7 мг/кг до 17,5 мг/кг. В источнике Умхэй содержание серы не превышало 0,8 мг/кг.

**Выделение в накопительные и чистые культуры микроорганизмов ключевых функциональных групп (гидролитиков, хемолитотрофов, сульфатредукторов), их описание, выявление физиолого-биохимических свойств и определение активности термо- и алкалостабильных ферментов.**

На первых этапах разложения органического вещества минеральных источников активное участие принимают гидролитические бактерии, которые разрушают биополимеры. Аэробные и анаэробные протеолитические и целлюлозолитические бактерии обнаружены во всех слоях исследуемых проб. Их количество варьировало в зависимости от глубины залегания донных отложений. Максимальная численность аэробных протеолитиков составляла  $10^4$  кл/см<sup>3</sup> и приходилась на верхние слои иловых осадков (до 4 см), а анаэробных —  $10^3$  кл/см<sup>3</sup> (нижние слои до 16 см). Численность анаэробных целлюлолитиков достигала  $10^2$ – $10^3$  кл/см<sup>3</sup>, аэробных —  $10$ – $10^2$  кл/см<sup>3</sup>. Высокие численности сульфатредуцирующих бактерий (СРБ), способные расти на лактате, и на ацетате ( $10^7$  и  $10^8$  кл/см<sup>3</sup>), выявлены в донных осадках гидротермы Кучигер. В источнике Умхэй на станция Um-3 показано, что численность в верхних слоях донных осадков составляет  $10^2$ – $10^3$  кл/см<sup>3</sup>. Характерно, что к в горизонте 2–4 см численность возрастает до  $10^4$  кл/см<sup>3</sup>, но к горизонту 4–8 см она снова убывает. Максимальная численность обнаружена на горизонте 8–12 см убывая к нижним слоям. Из донных отложений источника Умхэй, были получены накопительные культуры сульфатредуцирующих бактерий. Культуры СРБ морфологически разнообразны и представляют прямые тонкие палочки, тонкие изогнутые палочки, вибрионы. Клетки, как правило, одиночные, редко сцепленные между собой по 2–4 клетки, некоторые вибрионы имеют жгутики. Морфологическая характеристика накопительных культур и выделенных бактерий-деструкторов показало их большое разнообразие. Физиологические группы сапрофитов и протеолитиков были представлены палочками и кокками. Некоторые палочковидные бактерии родов *Bacillus* sp. и *Pseudomonas* sp. обладали подвижностью. Были обнаружены как Грам– так и Грам+ бактерии. Эти выделенные бактерии образовывали пигментированные или белые и бесцветные колонии. Целлюлозоразлагающие бактерии представлены палочковидными бактериями *Clostridium* sp. и *Cellvibrio* sp. Среди СРБ домини-

ровали Грам– бактерии, представленные вибрионами (*Desulfovibrio* sp.), также обнаружены споровые палочковидные Грам+ бактерии (возможно, *Desulfotomaculum* sp.).

Из проб термальных источников Кучигер и Умхэй получены накопительные культуры гидролитических бактерий на среде Пфеннига, с добавлением 1% пептона и целлюлозы.

В накопительных культурах гидролитических бактерий, выделенных из донных осадков и воды термальных источников Умхэй и Кучигер проведен биохимический анализ стандартным методом Эрлангера (Erlanger et al., 1961). Результаты показали, что в колонке ила в источнике Кучигер обнаружена наиболее высокая общая протеолитическая активность на азоказеине и достигала 0,959 ед./см<sup>3</sup>, в колонке ила источника Умхэй активность составила 0,543 ед./см<sup>3</sup>. Высокое содержание органического азота в донных осадках, вероятно, обуславливает и активное развитие протеолитических бактерий с высокой ферментативной активностью.

Из накопительной культуры термального источника Умхэй, путем многократных пересевов была выделена чистая культура Um-14-2. Анализ гена 16S рРНК штамма показал, что он относится к семейству *Thermaceae* филума *Deinococcus-Thermus*, и являются представителем рода *Meiothermus*. По результатам BLAST-анализа наиболее близким к исследуемому штамму оказался вид *Meiothermus ruber* strain 16105 (Y13596.1). Уровень сходства составил 100% (Будагаева, Бархутова, 2015).

Присутствие органотрофных бактерий в транзитной зоне смешения подземных и поверхностных вод в системе щелочных и слабоминерализованных вод термальных источников Кучигер и Умхэй вполне объяснимо, поскольку эти микроорганизмы способны осуществлять первую стадию разложения многих органических полимеров до низкомолекулярных соединений и водорода, которые далее используются сообществом СРБ (Пименов и др. 2012).

Бактерия *Meiothermus ruber*, выделенная из источника Умхэй была изучена на способность секретировать внеклеточные протеолитические ферменты. В качестве субстрата использовали различные *пара*-нитроанилиды 4-х групп пептидаз — трипсин-подобные, химотрипсин-подобные, субтилизин-подобные и цистеиновые (ВАРА, GlpFpNA, GlpAALpNA и GlpFApNA, соответственно) и белковый субстрат азоказеин. Одним из наиболее важных факторов, определяющих активность внеклеточных ферментов, является наличие в питательной среде оптимального субстрата (Дунаевский и др., 1995). У бактерии *Meiothermus ruber* была изучена динамика синтеза внеклеточных пептидаз в процессе культивирования на различных источниках азота. Показано, что наибольшая активность отмечена на синтетических субстратах, специфичных для субтилизин-подобных (GlpAALpNa) пептидаз и аминопептидаз (L-pNa, P-pNa). Характерно, что *Meiothermus ruber* не гидролизовала субстраты, специфичные для трипсин-подобных, химотрипсин-подобных и цистеиновых пептидаз.

Показано, что в процессе роста культур активность внеклеточных ферментов зависит от наличия в питательной среде оптимального субстрата. Так, нами проведено сравнительное изучение синтеза внеклеточных пептидаз в зависимости от различных источников азота (соетон, пептон, глюкоза), а также времени культивирования (до 12 суток) на внеклеточную протеолитическую активность.

Исследования показали, что максимум секретлируемой активности по субстрату GlpAALpNa для штамма Um-14-2 достигался на среде с пептоном соеином и приходился на 2 и 10 сутки культивирования, соответственно.

Пептидазы штамма Um-14-2 имели оптимум активности при pH 8,0 и стабильность в широком диапазоне pH от 4,78 до 11,82.

Поскольку, выделенный штамм по экофизиологическим характеристикам отнесен к термофилам, определение температурного оптимума активности и стабильности ферментов проведены в диапазоне 23-80°C. Показано, что внеклеточные пептидазы штамма Um-14-2 имел оптимум активности при 50°C и стабильность в диапазоне от 23 до 60°C. Определение температурного оптимума и стабильности показало, что выделенный штамм имеет способность функционировать при высоких значениях температуры.

Определение природы функциональных групп активного центра показал, что активность внеклеточных пептидаз по субстрату GlpAALpNA у штамма Um-14-2 на среде с соеином подавляется на 53,2% специфическим ингибитором сериновых пептидаз — фенилметилсульфонилфторидом (ФМСФ). Ингибиторы цистеиновых пептидаз — йодацетамид (ЙАА) и металлопептидаз — этилендиаминтетраацетат (ЭДТА) совсем не оказывали влияния на активность.

Таким образом, субстратная специфичность и совокупность результатов ингибиторного анализа свидетельствуют о присутствии в культуре исследованного штамма внеклеточных сериновых пептидаз субтилизин-подобного типа.

*Работа поддержана бюджетной темой ИОЭБ СО РАН АААА-А17-117011810034-9*

#### **Литература**

1. Будагаева В. Г., Бархутова Д. Д. Термофильные органотрофные бактерии рода *Meiothermus* в щелочных гидротермах Прибайкалья (Бурятия) // Самарский научный вестник. 2015. № 2 (11). С. 30–32.
2. Всеволожский В. А. Основы гидрогеологии: учебник. М.: Изд-во МГУ, 1991. 351 с.
3. Дунаевский Я. Е., Белякова Г. А., Павлюкова Е. Б., Белозерский М. А. Влияние условий культивирования на образование и секрецию протеаз грибами *A. alternata* и *F. oxysporum* // Микробиология. 1995. Т. 64. № 3. С. 327–330.
4. Замана Л. В., Аскарлов Ш. А., Борзенко С. В., Чудаев О. В., Брагин И. В. Изотопы сульфидной и сульфатной серы в азотных термах Баунтовской группы (Байкальская рифтовая зона) // ДАН. 2010. Т. 435, № 3. С. 369–371.
5. Пименов Н. В., Куранов Г. В., Брюханов А. Л., Веслополова Е. Ф., Корюкина И. П., Маслов Ю. Н. Сообщество сульфатредуцирующих бактерий в сероводородных водах источника ЗАО “курорт Усть-Качка” (Пермский край) // Микробиология. 2012. Т. 81. № 6. С. 779–785.
6. Намсараев З. Б., Горленко В. М., Намсараев Б. Б., Бархутова Д. Д. Микробные сообщества щелочных гидротерм. Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2006. 109 с.
7. Biddle J. F., Lipp J. S., Lever M. A., Lloyd K. G., Sørensen K. B., Anderson R., Fredricks H. F., Elvert M., Kelly T. J., Schrag D. P., Sogin M. L., Brenchley J. E., Teske A., House C. H., Hinrichs K. Heterotrophic Archaea dominate sedimentary subsurface ecosystems off Peru // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2006. Vol. 103. P. 3846–3851.
8. Brazelton W. J., Baross J. A. Metagenomic comparison of two thiomicrospira lineages inhabiting contrasting deep-sea hydrothermal environments // PLoS ONE. 2010. Vol.5. e13530.10.1371/journal.pone.0013530.

9. Erlanger B. F., Kokowsky N., Cohen W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin // *Arch. Biochem. Biophys.* 1961. V. 95. (2). P. 271–278.
10. Huber J. A., Mark Welch D. B., Morrison H. G., Huse S. M., Neal P. R., Butterfield D. A., Sogin M. L. Microbial population structures in the deep marine biosphere // *Science*. 2007. Vol. 318. P. 97–100.
11. Karsten Pedersen The deep subterranean biosphere // *Earth-Science Reviews*. 1993. Vol. 34, № 4. P. 243–260.
12. Onstott T. C., Colwell F. S., Kieft T. L., Murdoch L., Phelps T. J. New horizons for deep subsurface microbiology // *Microbe*. 2009. Vol. 4. P. 499–505.
13. Phelps T. J., Raione E. G., White D. C., Fliermans C. B. Microbial activities in deep subsurface environments // *Geomicrobiol. J.*, 1989. Vol. 7, P. 79-91.
14. Schrenk M. O., Huber J. A., Edwards K. J. Microbial provinces in the subsea-floor // *Annu. Rev. Mar. Sci.* 2010. Vol. 2, P. 279–306.
15. Sleep N. H., Meibom A., Fridriksson T., Coleman R. G., Bird D. K. H<sub>2</sub>-rich fluids from serpentinization: geochemical and biotic implications // *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004. Vol. 101. P. 12818-12823.
16. Takai K., Moser D. P., Onstott T. C., Spoelstra N., Pfiffner S. M., Dohnalkova A., Fredrickson J. K. *Alkaliphilus transvaalensis* gen. nov., sp. nov., an extremely alkaliphilic bacterium isolated from a deep South African gold mine // *Int J Syst Evol Microbiol*. 2001. Vol. 51. P. 1245–1256.
17. Tiago I., Verissimo A. Microbial and functional diversity of a subterrestrial high pH groundwater associated to serpentinization // *Environ. Microbiol.* 2013. Vol. 15(6). P. 1687–706.
18. Wanger G., Onstott T. C., Southam G. Structural and chemical characterization of a natural fracture surface from 2.8 kilometers below land surface: biofilms in the deep subsurface // *Geomicrobiology Journal*. 2006. Vol. 23. P. 443–452.

#### **DISTRIBUTION OF MICROORGANISMS IN THE UPPER LAYERS OF THE UNDERGROUND BIOSPHERE IN ALKALINE HYDROTHERMAL WATERS OF THE BARGUZIN VALLEY**

**E. V. Lavrentieva, T. G. Banzaraktsaeva, A. A. Radnagurueva, V. B Dambaev,  
S. P. Buryukhaev, V. G. Budagaeva, D. D. Barkhutova**

**Elena V. Lavrentieva**

candidate of biological science, researcher,  
Institute of General and Experimental Biology SB RAS  
670047, Ulan-Ude, Sakhyanova St., 6  
E-mail: lena\_l@mil.ru  
Buryat State University  
Russia, 670000, Ulan-Ude, Smolina Str. 24

**Tuyana G. Banzaraktsaeva**

candidate of biological science, Senior researcher,  
Institute of General and Experimental Biology SB RAS  
6, Sakhyanovoy, Ulan-Ude, Russia, 670047

**Aryuna A. Radnagurueva**

Cand. Sci. (Biol.), Researcher,  
Institute of General and Experimental Biology SB RAS  
6, Sakhyanovoy St., Ulan-Ude 670047, Russia

**Vyacheslav B Dambaev**

Cand. Sci. (Biol.), Researcher,  
Institute of General and Experimental Biology SB RAS  
6, Sakhyanovoy St., Ulan-Ude 670047, Russia

**Savelii P. Buryukhaev**

Cand. Sci. (Biol.), Researcher, Institute of General and Experimental Biology SB RAS  
6, Sakhyanovoy St., Ulan-Ude 670047, Russia

**Valentina G. Budagaeva**

Postgraduate, Institute of General and Experimental Biology SB RAS  
6, Sakhyanovoy St., Ulan-Ude 670047, Russia

**Darima D. Barkhutova**

Cand. Sci. (Biol.), Head of laboratory of microbiology  
Institute of General and Experimental Biology SB RAS  
6, Sakhyanovoy St., Ulan-Ude 670047, Russia

This article presents the results of hydrochemical studies of water in the transit zone of mixing underground and surface water in the system of alkaline and slightly mineralized waters of Kuchiger and Umhei fluids. The distribution of the main functional groups of bacteria in bottom sediments is shown. Bacterial cultures capable of carrying out the first stage of decomposition of many organic polymers to low-molecular compounds are isolated.

**Keywords:** underground biosphere; mixing zone; Barguzin Valley hydrothermal waters; microorganisms.