

УДК 579.222.3: 579.66: 579.8.06

ВЫДЕЛЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ БАКТЕРИЙ ТЕРМАЛЬНЫХ ИСТОЧНИКОВ СЕВЕРНОГО ПРИБАЙКАЛЯ, ОБЛАДАЮЩИХ ЛИПОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ

© 2013 г. К.Н. Сорокина, А.С. Розанов, А.В. Брянская, С.Е. Пельтек

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия,
e-mail: peltek@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 15 августа 2013 г. Принята к публикации 5 сентября 2013 г.

В работе проведено исследование свойств бактериальной микрофлоры ряда термальных источников Северного Прибайкалья (Байкальская рифтовая зона), характеризующихся широким диапазоном природных условий (рН, температур, органического компонента). Проведена таксономическая идентификация бактерий, показано, что липолитической активностью обладают изоляты, относящиеся к видам *Geobacillus stearothermophilus*, *Anoxybacillus flavithermus* и *Thermoactinomyces vulgaris*. Исследованы их морфологические, биохимические и физиологические свойства. Показано, что в целом полученные штаммы *Geobacillus stearothermophilus* растут при температурах до 70 °С и широком диапазоне значений рН (5–10). Штаммы, отнесенные к роду *Anoxybacillus flavithermus*, росли при температурах 60–70 °С и до рН 11, а *Thermoactinomyces vulgaris* Gus-2-1 имел более узкий диапазон роста при 50–60 °С и рН 7–10. В целом из выделенных штаммов, обладающих липолитической активностью, наиболее интересными для изучения свойств продуцируемых липаз являются представители *Geobacillus stearothermophilus*.

Ключевые слова: термофильные микроорганизмы, липолитическая активность, Байкальская рифтовая зона.

ВВЕДЕНИЕ

Исследование термальных источников для поиска микроорганизмов с уникальными свойствами является актуальной задачей современной микробиологии. Микроорганизмы, а также продуцируемые ими ферменты находят широкое применение в современной биотехнологии. Одними из таких ферментов являются липазы, относящиеся к классу гидролаз, катализирующих реакцию расщепления природных триацилглицеридов с образованием глицерина, жирных кислот и воды. Уникальные свойства этих ферментов позволяют применять их в качестве высокоэффективных регио- и энантиоселективных биокатализаторов (Fishman *et al.*, 1998) в реакции переэтерификации пищевых жиров, а также аммонолизе и других химических процессах (Joseph *et al.*, 2008). В

связи с этим липазы нашли широкое применение в промышленности, в том числе пищевой, фармацевтической, текстильной, в производстве бытовой химии и других областях (Houde *et al.*, 2004), а изучение природных микробных сообществ для поиска новых вариантов термостабильных ферментов представляет большой практический интерес.

В ряде исследований показано, что термальные источники Прибайкалья и Забайкалья являются богатыми по составу микрофлоры (Микробные сообщества ..., 2006). Вопрос о поиске в данных источниках микроорганизмов, обладающих липолитической активностью, а также изучении их свойств остается открытым.

В данной работе были проведены исследование состава микробиологических сообществ горячих источников Северного Прибайкалья,

поиск, а также выделение и скрининг активности термофильных микроорганизмов, проявляющих липолитическую активность. Выделенные штаммы были идентифицированы, изучены их филогенетическое родство, спектр активности и морфологические характеристики.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение микроорганизмов с липолитической активностью из термальных источников

Для получения активных накопительных и чистых культур термофильных микроорганизмов и последующего выделения чистых культур микроорганизмов-продуцентов липолитических ферментов проводили сбор полевого материала в горячих источниках Байкальской рифтовой зоны. Образцы отбирали с соблюдением условий стерильности. Собранные образцы хранили при +4 °С, после чего проводили посев на элективные среды.

Культивирование природного материала проводили на агаризованных средах Лурия–Бергана (LB), среде А (г/л): (0,5 NaCl, 0,5 пептона, 0,4 мясного экстракта, 0,2 дрожжевого экстракта), мясопептонном агаре (МПА). Культивирование проводили при температурах 45–70 °С в течение 1–3 суток. Определение липолитической активности штаммов проводили на агаризованной среде Пфеннига (г/л): KH_2PO_4 – 0,5; NH_4Cl – 0,5; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5; KCl – 0,5; NaCl – 0,5; $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,05; NaHCO_3 – 1,5, содержащей 1,5 % твин-20, -40 и -80.

Идентификация штаммов по нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК

Чистую бактериальную культуру выращивали при температуре 55–65 °С на среде LB, содержащей 2 % агара, в течение 12 ч. Выделение геномной ДНК проводили с использованием набора Wizard SV Genomic DNA Purification System (Promega, США), согласно инструкции производителя. Амплификацию фрагмента 16S рРНК проводили в реакционной смеси общим объемом 50 мкл, содержащей: 20 нг, 0,2 мМ смеси четырех дезоксифосфатов, 1,5 мМ

MgCl_2 , 0,1 мкМ праймеров 16s-8-f-B 5'-AGRGTTTGATCCTGGCTCA-3' и 16s-1350-r-B 5'-GACGGGCGGGTGTACAAG-3', буфер для Taq ДНК-полимеразы и 1 ЕА TaqSE ДНК-полимеразы («Сибэнзим», Россия). ПЦР проводили по следующей программе: 95 °С – 3 мин; 40 циклов (95 °С – 30 с, 54 °С – 20 с, 72 °С – 1 мин 30 с); 72 °С – 10 мин. Определение нуклеотидной последовательности проводили на приборе 3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems) с использованием праймера 16s-8-f-B. Полученные последовательности 16S рРНК сравнивали с известными последовательностями, содержащимися в базе Genbank, с использованием алгоритма BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucscore>).

Филогенетический анализ

Выравнивание полученных последовательностей гена 16S рРНК проводили с использованием программы ClustalW. Построение филогенетического дерева было выполнено с использованием алгоритма ближайших соседей, реализованного в программе MEGA4. Проверку статистической достоверности проводили при помощи бутстреп теста (Tamura *et al.*, 2007).

Микроскопический анализ штаммов

Исследование морфологии выделенных штаммов микроорганизмов методами микроскопии проводили с использованием светового и люминесцентных микроскопов фирмы Karl Zeiss (Axioskop 2 Plus и Axio Scope. A1, Германия). Препараты готовили стандартными методами (Практикум по микробиологии, 2005).

Биохимическая характеристика культур

Биохимическую характеристику штаммов проводили с использованием тест-системы Enterotest-24 (MicroTest, Lachema) в соответствии с инструкцией производителя. Проводили тест на активность уреазы, каталазы и оксидазы, индола, сероводорода, ацетоина; способность к восстановлению нитратов, к гидролизу казеина, желатина, крахмала, деградации тирозина, дезаминированию фенилаланина.

Скрининг физиологических свойств штаммов, обладающих липолитической активностью

Определение диапазона значений pH и температуры, при которых наблюдался рост культур выделенных микроорганизмов в жидкой среде, проводили с использованием системы MicroFlask (Applikon Biotechnology). Посевной материал выращивали путем внесения материала отдельных колоний исследуемых штаммов в лунки 96-луночного планшета в объем 180 мкл среды LB. Культивирование проводили на термостатированном шейкере KS 4000 IC control с установленными держателями для системы MicroFlask в течение 16 ч при 250 об./мин, при температурах от 40 до 70 °С. По окончании культивирования визуально отмечали лунки, в которых наблюдалось увеличение содержания биомассы.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Выделение термофильных бактерий и исследование их свойств

В данной работе для выделения термофильных микроорганизмов были отобраны пробы донных осадков высокотемпературных источников Алла, Гарга, Гусиха, Сея, Уро (Баргузинская долина, Северное Прибайкалье). В работу были взяты образцы из трех источников,

отличавшихся от остальных высокими значениями температур на выходе термальных ручьев, обильным развитием микробных сообществ и богатым органическим субстратом. В табл. 1 приведено описание условий, при которых были отобраны природные образцы, и названия источников.

Культуры микроорганизмов, полученные из природных образцов, очищали от сопутствующих организмов путем многократного пересева на агаризованной среде LB. Полученные колонии тестировали на активность по отношению к твин-содержащим субстратам в диапазоне температур 37–65 °С. Всего было отобрано 11 штаммов, обладавших наибольшей липолитической активностью, для которых была выполнена таксономическая идентификация путем исследования гена 16S рПНК, результаты приведены в табл. 2.

Таким образом, выделенные бактерии были отнесены к видам *Anoxybacillus flavithermus*, *Geobacillus stearothermophilus* и *Thermoactinomyces vulgaris*.

В ходе работы был выполнен филогенетический анализ родства выделенных штаммов. На рис. представлена дендрограмма, отражающая филогенетические отношения использованных в работе штаммов родов *Geobacillus* и *Anoxybacillus*.

Штаммы *G. stearothermophilus* B28, B8, B7, B27 в целом оказались близкими со штаммом *G. stearothermophilus* mt-10 и образовывали

Таблица 1

Описание точек забора образцов воды и грунта термальных источников Северного Прибайкалья

| № | Название источника | Геохимические параметры | Описание пробы | Количество образцов |
|---|---------------------|-------------------------|---|---------------------|
| 1 | Алла (правый берег) | 52–75 °С pH 8,1 | обрастания (маты): зеленые, оранжево-бурые и белые | 30 |
| | Алла (левый берег) | 43–72 °С | сообщество микроорганизмов, цвет – зеленый | 10 |
| 2 | Гарга | 36–74 °С pH 7,3 | мощное поле разноцветных матов (розовые, черные, желто-зеленые). Толщина 5–7 мм | 15 |
| 3 | Уринский | 25–69 °С | многослойные разноцветные цианобактериальные маты | 12 |
| 4 | Гусиха | 43–74 °С pH 8,5 | накипные и плавающие цианобактериальные маты | 5 |
| 5 | Сеюйский | 49–51 °С pH 9,7 | многослойные донные и поверхностные цианобактериальные маты. Толщина до 6 см | 7 |

одну группу за исключением штамма *G. stearothermophilus* Gus 2-3. Бактерии рода *Anoxybacillus*, выделенные в ходе работы, образовывали две разные внутривидовые группы.

Исследование свойств выделенных штаммов бактерий, обладающих липолитической активностью

Морфотипы наиболее активных в культуре штаммов бактерий родов *Geobacillus* и *Anoxybacillus*, а также состав и количество клеток в образцах изучали с помощью микроскопии. Описание колоний пяти выделенных штаммов, обладающих липолитической активностью (B7, B18, B22, B25, B27), и морфологическая характеристика клеток, согласно определителю бактерий Берджи (Boone, Castenholz, 2001), представлены в табл. 3.

Исследуемые штаммы образуют округлые колонии кремового цвета. Края колоний волнистые или слегка волнистые. Профиль колоний слегка выпуклый. Размеры колоний варьируют от 3–5 до 8 мм. Клетки изолятов представлены палочками, размеры которых варьировали от 2–3 × 7–10 мкм до 5 × 8–12 мкм. У исследуемых штаммов выявлено спорообразование. Эндоспоры овальные или сферические, от 1 до 2,5 мкм.

В экспериментах по исследованию биохимических характеристик выделенных штаммов за основу была взята среда Лурия–Бертрани (LB). Определение физиолого-биохимических характеристик проводили на основе методик, описанных в Методах общей бактериологии (Герхард, 1984) и Практикуме по микробиологии (2005).

Таблица 2

Таксономическая идентификация штаммов, выделенных из термальных источников Баргузинской долины

| Штамм | Таксон | Источник |
|---------|---------------------------------------|-------------|
| B7 | <i>Geobacillus stearothermophilus</i> | Алла |
| B18 | <i>Geobacillus stearothermophilus</i> | Алла |
| B22 | <i>Geobacillus stearothermophilus</i> | Алла |
| B25 | <i>Anoxybacillus</i> sp. | Алла |
| B27 | <i>Geobacillus stearothermophilus</i> | Гаргинский |
| Uro-2-1 | <i>Anoxybacillus flavithermus</i> | Уринский |
| Se-1 | <i>Anoxybacillus flavithermus</i> | Сеюйский |
| Ga-1-1 | <i>Anoxybacillus flavithermus</i> | Гаргинский |
| Gus-2-1 | <i>Thermoactinomyces vulgaris</i> | Гусихинский |
| Gus-2-2 | <i>Anoxybacillus flavithermus</i> | Гусихинский |
| Gus-2-3 | <i>Geobacillus stearothermophilus</i> | Гусихинский |

Спорообразование у бактерий выявляли: 1) прогреванием культуры до 80 °С в течение 10 мин и последующим посевом на питательную среду того же состава; 2) микроскопированием старых культур. Для тестирования брали культуры липолитиков, инкубируемых при температуре 60 °С на среде LB в течение 24 ч. Штаммы были проверены на способность к образованию сероводорода, уреазную активность и использование следующих субстратов: лизин,

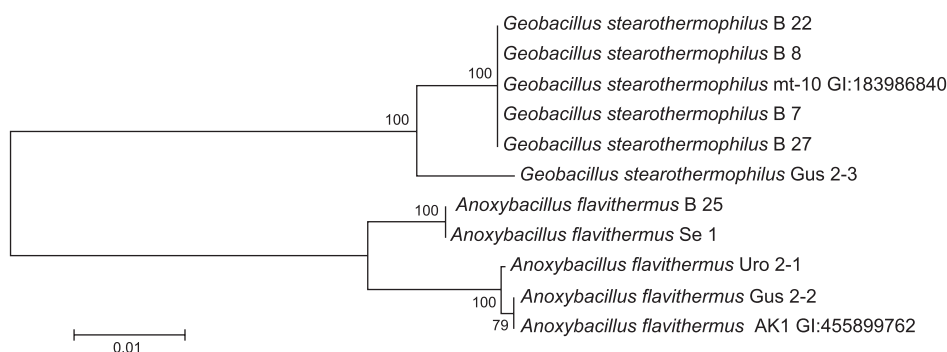


Рис. Филогения штаммов бактерий р. *Geobacillus* и *Anoxybacillus*, выделенных в ходе работы.

Таблица 3

Морфологическая характеристика бактериальных штаммов, обладающих липолитической активностью

| Штамм | Морфология колоний | | | | | Морфология клеток | |
|---------|--------------------|------------|--------------------------|-----------------|------------------|-------------------|---|
| | Форма | Размер, мм | Цвет | Профиль | Край | Морфотип клеток | Размеры клеток, мкм |
| B7 | круглая | 3–5 | кремовые | слегка выпуклый | слегка волнистый | палочки | 2–3 × 7–10 споровые, d = 1,5 |
| B18 | круглая | 3–5 | кремовые | слегка выпуклый | слегка волнистый | палочки | 2–3 × 7–10 споровые, d = 1,5 |
| B22 | круглая | 3–5 | кремовые | слегка выпуклый | слегка волнистый | палочки | 2–3 × 7–10 споровые, d = 1,5 |
| B25 | круглая | 5 | кремовые | слегка выпуклый | слегка волнистый | палочки | 5 × 8–12 споровые |
| B27 | круглая | 3–5 | кремовые | слегка выпуклый | слегка волнистый | палочки | 2–3 × 7–10 споровые, d = 1,5 |
| Uro-2-1 | круглая | 7 | кремовые | слегка выпуклый | слегка волнистый | палочки | 2–3 × 7–10 споровые, d = 2,5 |
| Se-1 | круглая | 5 | кремовые | слегка выпуклый | волнистый | палочки | 2–3 × 7–10 споровые, d = 2,5 |
| Ga-1-1 | круглая | 5 | кремовые | слегка выпуклый | слегка волнистый | палочки | 2–3 × 7–10 споровые, d = 2,5 |
| Gus-2-1 | круглая | до 8 | кремовые с белым налетом | слегка выпуклый | слегка волнистый | мицелий | Субстратный мицелий 0,4–0,8 мкм в диаметре; споровые, d = 1,0 |
| Gus-2-2 | круглая | 5 | кремовые | слегка выпуклый | слегка волнистый | палочки | 2–3 × 7–10 споровые, d = 2,5 |
| Gus-2-3 | круглая | 3–5 | кремовые | слегка выпуклый | слегка волнистый | палочки | 2–3 × 7–10 споровые, d = 1,5 |

орнитин, аргинин, цитрат, малонат, инозитол, адонитол, целлобиоза, сахароза, трегалоза, маннитол, эскулин, сорбитол, рамноза, мелибиоза, раффиноза, дульцит, глюкоза. Липазную активность определяли по образованию зон кристаллизации твина-80 вокруг колоний на плотных агаризованных средах. Все штаммы обладали способностью к росту на среде с комплексными субстратами, внесенными в качестве единственных источников углерода и энергии – дрожжевом экстракте и пептоне. Спектр соединений, утилизируемых штаммами в аэробных и анаэробных условиях, представлен в табл. 4.

Исследуемые штаммы не образуют сероводород, не используют цитрат, малонат, инозитол, адонитол, целлобиозу, сахарозу, трегалозу, маннитол, сорбитол, рамнозу, мелибиозу, раф-

финозу, дульцит, глюкозу. Используют лизин и орнитин. Дают положительную реакцию на β-галактозидазу и эскулин, в ряде случаев – на уреазу. Данные реакции соответствуют характеристике видов *Bacillus*, приведенных в определителе Берджи. Все тестируемые изоляты были схожи по биохимическим характеристикам и способности использовать различные соединения углерода для конструктивного и энергетического метаболизма.

Также для выделенных штаммов проводили исследование оптимума роста культуры при различных температурах и значениях pH среды, результаты приведены в табл. 5.

Для штаммов вида *Geobacillus stearothermophilus* в зависимости от источника свойства незначительно отличались, в том числе штаммы B7, B18, B22, выделенные из источника Алла, и

Таблица 4

Биохимическая активность выделенных штаммов

| Активность/ субстрат | Штаммы | | | | | | | | | | | |
|-------------------------|---------------------------------------|-----|-----|-----|---------|--------------------------|-----------------------------------|------|--------|---------|-----------------------------------|---|
| | <i>Geobacillus stearothermophilus</i> | | | | | <i>Anoxybacillus</i> sp. | <i>Anoxybacillus flavithermus</i> | | | | <i>Thermoactinomyces vulgaris</i> | |
| | B7 | B18 | B22 | B27 | Gus-2-3 | B25 | Uro-2-1 | Se-1 | Ga-1-1 | Gus-2-2 | Gus-2-1 | |
| Сероводород | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – |
| Лизин | +– | +– | +– | +– | + | +– | + | + | + | + | + | + |
| Орнитин | + | +– | +– | +– | + | +– | + | + | + | + | + | + |
| Уреаза | + | + | + | + | – | + | – | – | – | – | – | + |
| Аргинин | – | – | – | – | – | – | + | – | – | – | – | + |
| Цитрат Симмонса | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – |
| Малонат | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – |
| β-галактозидаз | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Инозитол | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – |
| Адонитол | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – |
| Целлобиоза | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – |
| Сахароза | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – |
| Трегалоза | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – |
| Маннитол | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – |
| Эскулин | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Сорбитол | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – |
| Рамноза | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – |
| Мелибиоза | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – |
| Раффиноза | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – |
| Дульцит | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – |
| Глюкоза | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – |

Пр и м е ч а н и е. «+» Положительный рост; «–» отрицательный рост; «+–» слабый рост.

штамм *Geobacillus stearothermophilus* B27, выделенный из Гаргинского источника, в зависимости от температуры (40–70 °С) росли в диапазоне pH 6–10. В отличие от них, штамм *Geobacillus stearothermophilus* Gus-2-3, выделенный из источника Гусихинский, обладал способностью к росту при более низких значениях pH 5–9.

Штаммы *Anoxybacillus flavithermus* Uro-2-1 и *Anoxybacillus flavithermus* Ga-1-1, выделенные из источников Уринский и Гарга, соответственно обладают схожими свойствами (рост при pH 6–11 и температуре 40–70 °С). Штамм *Anoxybacillus flavithermus* Se-1, выделенный из источника Сеюйский, и штамм *Anoxybacillus* sp. B25, выделенный из источника Алла, имели склонность к росту в более щелочных условиях (pH 8–11) и при температуре 40–60 °С.

Штамм *Thermoactinomyces vulgaris*, исследованный в работе, имел узкий температурный диапазон роста (50–60 °С) при pH 7–10.

ОБСУЖДЕНИЕ

Ряд ранее проведенных работ по изучению состава микрофлоры термальных источников Северного Прибайкалья указывает на развитие в них микроорганизмов, обладающих различными активностями. Так, в работе М.Ю. Сусловой с соавт. (2008) показано, что из термальных источников в основном выделяются бактерии рода *Bacillus*, обладающие фосфатазной, протеиназной, липазной и другими активностями. Максимальной протеолитической активностью, как и липолитической, обладали бактерии, выделен-

Таблица 5

Исследование роста культур выделенных микроорганизмов при различных значениях pH и температуры

| Штамм | Температура, °С | | | | |
|---|-----------------|------|------|------|------|
| | 40 | 45 | 50 | 60 | 70 |
| <i>Geobacillus stearothermophilus</i> B7 | 8* | 6–8* | 6–8* | 6–10 | 7–10 |
| <i>Geobacillus stearothermophilus</i> B18 | 8* | 6–8* | 6–8* | 6–10 | 8–10 |
| <i>Geobacillus stearothermophilus</i> B22 | 8* | 6–8* | 6–8* | 6–10 | 8–10 |
| <i>Anoxybacillus</i> sp. B25 | 8–9 | 8–10 | 7–11 | 8–11 | – |
| <i>Geobacillus stearothermophilus</i> B27 | 8* | 6–8* | 6–8* | 6–10 | 8–10 |
| <i>Anoxybacillus flavithermus</i> Uro-2-1 | 7–11 | 7–11 | 7–11 | 7–11 | 8–9 |
| <i>Anoxybacillus flavithermus</i> Se-1 | 8–9 | 8–10 | 8–11 | 8–11 | – |
| <i>Anoxybacillus flavithermus</i> Ga-1-1 | 6–11 | 7–11 | 7–11 | 7–11 | 7–9 |
| <i>Thermoactinomyces vulgaris</i> Gus-2-1 | – | – | 8–9 | 7–10 | – |
| <i>Anoxybacillus flavithermus</i> Gus-2-2 | 6–11 | 7–11 | 7–11 | 7–11 | 7–9 |
| <i>Geobacillus stearothermophilus</i> Gus-2-3 | 6 | 6–7 | 5–8 | 5–9 | 6–9 |

Примечание. * Отмечен слабый рост.

ные из источников Котельниковский и Хакусы. В работе Е.В. Лаврентьевой с соавт. (2009) также было проведено исследование состава микрофлоры термальных источников Прибайкалья. Показано, что выделенные представители также относятся к р. *Bacillus* (*B. hemicellulosolyticum*, *B. licheniformis*, *Anoxybacillus flavithermus*, *Anoxybacillus pushchinoensis*) и обладают протеазной активностью. В работе А.А. Раднагуревой (2009) была исследована протеазная активность микроорганизмов, входящих в состав микробных матов и илов термальных источников Алла, Сея, Умхей, Гусиха и Гарга. Показано, что микроорганизмы из одной и той же станции обладают различной секрецией протеаз, максимальная из них была отмечена у бактерий источника Сея.

В данной работе было выделено и охарактеризовано 11 штаммов термофильных микроорганизмов, обладающих липолитической активностью. Филогенетический анализ родства показал, что выделенные микроорганизмы относятся к видам *Anoxybacillus flavithermus*, *Geobacillus stearothermophilus* и *Thermoactinomyces vulgaris*.

Исследование физиологических характеристик штаммов (влияние pH и температуры на рост культур) показало, что в целом штаммы *Geobacillus stearothermophilus* обладали способностью к росту в широком диапазоне

pH 5–10 и температуры (до 70 °С). Штаммы р. *Anoxybacillus* росли до температуры 60–70 °С и pH 11. Выделенный штамм *Thermoactinomyces vulgaris* отличался от остальных по своим характеристикам.

Таким образом, по результатам проведенных исследований были выявлены штаммы, продуцирующие термостабильные липазы, которые являются перспективными для использования в биотехнологии, в том числе для процессов переэтерификации. Разнообразие условий роста штаммов позволяет заключить, что их липазы будут обладать широким набором полезных характеристик, в том числе термостабильностью и устойчивостью в широком диапазоне значений pH (от 5 до 11). Наиболее перспективные из изолированных штаммов-продуцентов липаз, таким образом, относятся к виду *Geobacillus stearothermophilus*.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (ГК № 14.512.11.0065).

ЛИТЕРАТУРА

Герхард Ф.М. Методы общей бактериологии. Т. 2., Т. 3. М.: Мир, 1984. С. 396.

- Лаврентьева Е.В., Раднагуруева А.А., Намсараев Б.Б., Дунаевский Я.Е. Биохимические характеристики микроорганизмов щелочных гидротерм Прибайкалья // Вестн. Бурят. гос. ун-та. 2009. Вып. 3. Химия, физика. С. 11–14.
- Микробные сообщества щелочных гидротерм / З.Б. Намсараев и др. / Отв. ред. М.Б. Вайнштейн. Рос. акад. наук, Ин-т микробиол. им. С. Н. Виноградского, Сиб. отд-ние, Ин-т общей и эксперим. биол. Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2006. 110 с.
- Практикум по микробиологии / Под ред. А.И. Нетрусова. М.: Академия, 2005. 608 с.
- Раднагуруева А.А., Лаврентьева Е.В. Внеклеточная протеазная активность в природных образцах термальных источников Прибайкалья // Изв. Иркутского гос. ун-та. 2009. Сер. Науки о Земле. Т. 2. № 2. С. 162–166.
- Суслова М.Ю., Парфенова В.В., Теркина И.А. и др. Бактерии рода *Bacillus* в экосистемах горячих источников Прибайкалья и Забайкалья // *Ecology and Safety. Intern. Sci. Publ. (Bulgaria)*. 2008. V. 2. No. 2. P. 54–60.
- Boone D.R., Castenholz R.W. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 2nd ed. N.Y. a.o.: **Springer-Verlag**, 2001. V. 1. 721 p.
- Fishman A., Basheer S., Shatzmiller S., Cogan U. Fatty-acid-modified enzymes as effective enantioselective catalysts in microaqueous organic media // *Biotechnol. Lett.* 1998. V. 20. No. 6. P. 535–538.
- Joseph B., Ramteke P.W., Thomas G. Cold active microbial lipases: some hot issues and recent developments // *Biotechnol. Adv.* 2008. V. 26. No. 5. P. 457–470.
- Houde A., Kademi A., Leblanc D. Lipases and their industrial applications: an overview // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2004. V. 118. No. 1/3. P. 155–170.
- Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0 // *Mol. Biol. Evol.* 2007. V. 24. P. 1596–1599.

ISOLATION AND INVESTIGATION OF BACTERIA WITH LIPOLYTIC ACTIVITY FROM HOT SPRINGS IN THE NORTHERN BAIKAL REGION

K.N. Sorokina, A.S. Rozanov, A.V. Bryanskaya, S.E. Peltek

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia,
e-mail: peltek@bionet.nsc.ru

Summary

We have studied properties of bacterial strains isolated from hot springs in the Northern Baikal region, Baikal Rift Zone, known to have a wide range of growth conditions (pH, temperature, and carbon sources). The phylogenetic analysis and microbiological studies show that thermophilic strains belonging to the *Geobacillus stearothermophilus*, *Anoxybacillus flavithermus*, and *Thermoactinomyces vulgaris* species express lipolytic activity. The isolated *Geobacillus stearothermophilus* strains grow at up to 70 °C in a wide pH range (5–10). The isolates of the *Anoxybacillus* genus can grow at 60–70 °C and pH ≤ 11. *Thermoactinomyces vulgaris* Gus-2-1 has a narrower growth condition range: 50–60 °C and pH 7–10. Of the strains with lipolytic activity isolated in this study, *Geobacillus stearothermophilus* is the most promising for further studies of secreted lipases.

Key words: thermophilic bacteria, lipolytic activity, Baikal Rift Zone.