

На правах рукописи



Будагаева Валентина Григорьевна

**РАСПРОСТРАНЕНИЕ И ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ БАКТЕРИЙ ГРУППЫ
MEIOTHERMUS-THERMUS В МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВАХ ЩЕЛОЧНЫХ
ГИДРОТЕРМ БАЙКАЛЬСКОЙ РИФТОВОЙ ЗОНЫ**

03.02.08 – экология (биологические науки)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Иркутск - 2019

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Институт общей и экспериментальной биологии Сибирского отделения РАН» (ФГБУН ИОЭБ СО РАН), г. Улан-Удэ

**Научный
руководитель:**

Бархутова Дарима Дондоковна

кандидат биологических наук, заведующий лабораторией микробиологии ФГБУН Института общей и экспериментальной биологии СО РАН

**Официальные
оппоненты:**

Земская Тамара Ивановна

доктор биологических наук, заведующий лабораторией микробиологии углеводов Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Лимнологический институт СО РАН», г. Иркутск

Брянская Алла Викторовна

кандидат биологических наук, ст.н.с. лаборатории молекулярных биотехнологий Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт цитологии и генетики СО РАН», г. Новосибирск

**Ведущая
организация:**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Хабаровский Федеральный Исследовательский Центр ДВО РАН» Институт водных и экологических проблем Дальневосточного отделения РАН, г. Хабаровск

Защита диссертации состоится «28» февраля 2020 г. в 13.00 часов на заседании диссертационного совета Д 212.074.07 при ФГБОУ ВО «Иркутский государственный университет» по адресу 664003, г. Иркутск, ул. Сухэ-Батора, 5, Байкальский музей им. профессора М.М. Кожова (ауд. 219).

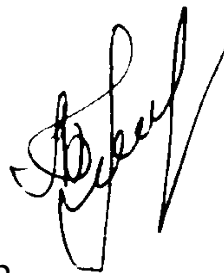
С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБОУ ВО «Иркутский государственный университет» им. В. Г. Распутина по адресу: 664082, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 124, и на сайте университета:

<https://isu.ru/ru/science/boards/dissert/dissert.html?id=171>

Отзывы просим направлять учёному секретарю диссертационного совета по адресу: 664003, г. Иркутск, ул. Карла Маркса, 1, биолого-почвенный факультет ИГУ. Тел./факс: (3952)24-18-55, e-mail: dissovet07@gmail.com

Автореферат разослан «_14_» января 2020 г

Учёный секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук, доцент



А.А. Приставка

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы.

Термальные источники представляют собой уникальные геотермальные местообитания, характеризующиеся высокой температурой и высокими значениями pH, которые создают благоприятные условия для развития термофильных и алкалофильных прокариот в водной толще и донных отложениях (Whitaker *et al.*, 2003; Meyer-Dombard *et al.*, 2005). Наземные горячие источники являются экстремальными экосистемами, и в связи с постоянством химического состава и температуры являются удобными модельными системами для изучения экологии обитающих в них прокариот (Sand, 2003; Coman *et al.*, 2013; Vadhai *et al.*, 2015). Термофилы, населяющие высокотемпературные среды обитания, считаются ближайшими родственниками микроорганизмов, существовавших ранее на Земле (Brock, 1967; Woese *et al.*, 1990; Stetter, 2006). Органотрофные термофильные бактерии играют важную роль в цикле углерода гидротермальных систем. Они участвуют в деструкции органического вещества, создаваемом продуцентами, и их метаболиты используются деструкторами терминального этапа (Namsaraev *et al.*, 2010; Khan *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2018). Филум *Deinococcus-Thermus* является одним из самых широко распространенных в составе домена *Bacteria*. Группа включает термотолерантные виды, найденные в надземных и подземных горячих источниках, а также в горячих искусственных средах обитания. Эти бактерии являются первичными декструкторами в микробном сообществе и проявляют высокую устойчивость к экстремальным условиям, таким как температура окружающей среды, ионизирующее и ультрафиолетовое излучения.

Микробное сообщество играет важную роль в биогеохимических процессах в наземных гидротермах. В результате деятельности различных функциональных групп микроорганизмов (цианобактерий, первичных и вторичных органо- и литотрофных гидролитиков) происходит аккумуляция ряда химических элементов и образование минералов (Phoenix *et al.*, 2000; Franke, Bazyliniski, 2003; Tazaki, 2006; Лазарева *и др.*, 2010)

Цель настоящей работы – изучить распространение бактерий группы *Meiothermus-Thermus*, их биологические особенности и экологическую роль в гидротермах Байкальской рифтовой зоны (БРЗ).

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Оценить экологические условия формирования микробных сообществ щелочных гидротерм БРЗ.
2. Определить таксономическое разнообразие микробного сообщества гидротерм БРЗ методом высокопроизводительного секвенирования.
3. Оценить распространение аэробных органотрофных бактерий группы *Meiothermus-Thermus* в щелочных гидротермах.
4. Выделить, идентифицировать чистые культуры и изучить их экофизиологические свойства.
5. Оценить роль микробного сообщества гидротерм в синтезе полисахаридов и минералообразовании.

Научная новизна работы и значимость работы. С использованием молекулярно-генетических методов впервые охарактеризовано таксономическое разнообразие микробных сообществ щелочных гидротерм БРЗ и определено широкое распространение бактерий группы *Meiothermus-Thermus* в исследуемых гидротермах.

Сравнительный анализ состава доминирующих таксонов выявил существенные различия микробного сообщества БРЗ в зависимости от физико-химических условий, прежде всего температуры. Из гидротерм БРЗ получены и описаны культуры термофильных алкалофильных органотрофных бактерий-деструкторов группы *Meiothermus-Thermus*, способных расти в широком диапазоне температур. Впервые выделены и охарактеризованы бактерии рода *Thermus* из гидротерм БРЗ. В геноме органотрофных бактерий рода *Meiothermus* и *Thermus* впервые выявлен функциональный ген *cbbL*, ответственный за синтез ключевого фермента цикла Кальвина (RubisCO) - индикатора способности к автотрофному росту.

Углеводы являются одними из составных компонентов органического вещества микроорганизмов и играют важную роль в функционировании микробного сообщества. Впервые из микробного мата гидротермы БРЗ выделен индивидуальный гетерополисахарид с высоким содержанием галактозы, глюкозы, маннозы и уроновых кислот, который обладает способностью к связыванию ионов Fe^{2+} и мембраностабилизирующим действием.

Микробное сообщество играет важную роль в биогеохимических процессах в исследуемых гидротермах. Показано, что в микробных матах щелочных гидротерм БРЗ идет процесс биоминералообразования кальцита и кремнезема.

Практическая значимость работы. Выделенные бактерии группы *Meiothermus-Thermus* могут быть использованы в качестве продуцентов термостабильных ферментов, в частности обладающих кератинолитической активностью. Полученные в работе данные могут быть использованы для чтения курсов лекций по микробиологии и экологии в ВУЗах, в справочных изданиях и учебно-методических пособиях.

Основные защищаемые положения

1. Видовое разнообразие микробных сообществ, развивающихся в гидротермах Байкальской рифтовой зоны и активно участвующих в биогеохимических циклах углерода и в аккумуляции различных элементов, было выше в микробных матах и донных осадках по сравнению с водой источников. С понижением температуры гидротерм разнообразие микробного сообщества увеличивается.

2. Органотрофные бактерии группы *Meiothermus - Thermus* широко распространены в щелочных гидротермах, участвуют в деструкции органического вещества и имеют способность к автотрофной фиксации CO_2 через цикл Кальвина-Бенсона-Бассама.

Апробация работы. Результаты исследований были доложены автором на Всероссийском симпозиуме с международным участием «Современные проблемы физиологии, экологии и биотехнологии микроорганизмов», Москва, 2014; IV Регио-

нальной научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Экологические проблемы Байкальского региона», Улан-Удэ, 2014; Международной научной конференции «Экология и геохимическая деятельность микроорганизмов экстремальных местообитаний», Улан-Удэ, 2013; Научно-практической конференции преподавателей, сотрудников и аспирантов, посвященной 90-летию Д.Ш. Фролова, Улан-Удэ, 2015; 11th International Congress on Extremophiles, Kyoto, Japan, 2016; 13th International Conference on Salt Lake Research ICSLR, Ulan-Ude, 2017.

Публикации. По теме диссертации, включая тезисы, опубликовано 15 работ, в том числе 4 работы в периодических изданиях, рекомендованных высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки Российской Федерации.

Личный вклад соискателя состоит в подготовке и проведении экспериментальных исследований на всех этапах работы, интерпретации полученных результатов, написании научных статей.

Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, списка сокращений, обзора литературы, описания материалов и методов исследований, обсуждения результатов, выводов и списка литературы и приложения. Работа изложена на 129 страницах, включает 13 таблиц, 42 рисунка. Список литературы содержит 225 наименований, в т.ч. - 170 зарубежных авторов.

Благодарности. Автор выражает глубокую признательность за общее руководство научному руководителю к.б.н. Д. Д. Бархутовой. Искреннюю признательность автор приносит профессору, д.б.н. В. М. Горленко (ФИЦ Биотехнологии РАН), д.фарм.н. Д. Н. Оленникову (ФГБУН ИОЭБ СО РАН) за практическую помощь и ценнейшие советы. Также автор выражает благодарность за помощь в работе и поддержку всем сотрудникам и аспирантам лаборатории микробиологии ИОЭБ СО РАН, лаборатории экологии и геохимической ФИЦ Биотехнологии РАН. Диссертационная работа выполнена при поддержке проекта «Микробные сообщества экс-

термальных природных систем: биологическое и функциональное разнообразие, биотехнологический потенциал» № 0337-2016-0004, грантов Минобрнауки России (соглашение N 6.1990.2014/К; соглашение N 14.575.21.0067) и РФФИ №14-34-50171 мол_нр, 15-34-51168 мол_нр, 12-04-98079-р, №15-44-04335-р. Ряд исследований проведен в рамках реализации работ по проекту "Биоремедиация и биоконверсия отходов с помощью комплекса фотосинтетических организмов и гетеротрофов в аэробных и анаэробных условиях с генерированием биоэнергии" (Соглашение № 14.583.21.0060 от 17 июля 2017 г.)

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В обзоре литературы дана физико-химическая характеристика щелочных гидротерм. Представлены современные данные о разнообразии термофильного микробного сообщества и их экологической роли в наземных гидротермах. Показано широкое распространение органотрофных бактерий филума *Deinococcus-Thermus* в природных и искусственных термальных средах обитания.

Глава 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объектами исследования служили микробные сообщества воды, микробных матов, донных осадков термальных источников Алла, Гарга, Сеюя, Умхей, Кучигер и Горячинск. Исследуемые гидротермы характеризовались различным температурным режимом (от 34 до 77 °С), значения рН варьировали от 8,1 до 9,7. Для исследования были отобраны пробы воды, донных осадков и микробных матов в летне-осенний период с 2013 по 2015 г.г.

2.2. Методы исследования

2.2.1. Физико-химические методы. Определение физико-химических параметров воды источников проводили в местах отбора проб с помощью портативных приборов и стандартных методов (Резников и др., 1970).

2.2.2. Методы учета численности и выделения чистых культур микроорганизмов. Посев и выделение органотрофных бактерий проводили на модифицированной среде Пфеннига (Кузнецов, Дубинина, 1989) состава (г/л): NH_4Cl – 0,4; KH_2PO_4 – 0,4; MgCl_2 – 0,4; KCl – 0,2; NaCl – 0,5. В качестве ростовых субстратов для органотрофных бактерий использовали (г/л): 1) пируват – 0,5, ацетат – 0,5; дрожжевой экстракт – 0,5; 2) соетон – 1,0; дрожжевой экстракт – 0,5; 3) сахароза – 5,0; дрожжевой экстракт – 0,1; для целлюлозолитиков – полоску фильтровальной бумаги. Отдельно вносили CaCl_2 – 0,1 (г/л); раствор микроэлементов по Пфеннигу – 1 мл; витамин B12 – 10 мкг. Для агаризованных сред добавляли 1,5–2 % агара. pH среды доводили бикарбонатно-карбонатным буфером до 8,5–9,5; температура инкубации 55 °С.

2.2.3. Методы изучения культуральных и физиолого-биохимических свойств бактерий. Культуральные и физиолого-биохимические свойства выделенных культур исследовали по стандартным методикам (Методы ..., 1984; Практикум ..., 2005). Температурные диапазоны развития бактерий от 20 до 80 °С устанавливали в градиентном термостате. Диапазон pH (от 6,0 до 11,0) устанавливали добавлением 10 % Na_2CO_3 и HCl . Способность к использованию различных источников углерода проверяли на минеральной среде, в которую вносили испытуемые источники углерода в концентрации 0,5 – 1 % от объема среды. Пигментный состав бактерий исследовали в препаратах целых клеток в ацетон-метанольных экстрактах. Спектры поглощения снимали на спектрофотометре ЛОМО СФ 56 (Санкт-Петербург) в диапазоне длин волн от 350 до 1100 нм.

2.2.4. Микроскопические методы. Морфотипы бактерий, размеры, подвижность изучали с помощью светового микроскопа Olympus (Япония). Изучение минералов в составе микробного мата проводили с помощью сканирующего электронного микроскопа Hitachi TM 1000 (Япония) с рентгеноспектральным анализатором SwiftED-TM EDX. Просмотр ультратонких срезов и тотальных препаратов осу-

ществляли на трансмиссионном электронном микроскопе (ТЭМ) Jeol JEM 100C (Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ.

2.2.5. Методы определения внеклеточной протеолитической активности.

Внеклеточную протеолитическую активность культуральной жидкости определяли согласно методу Эрлангера (Erlanger *et al.*, 1961) с помощью микропланшетного фотометра StatFax 2100. Общую протеолитическую активность определяли по белковому субстрату азоказеину при длине волны 440 нм. Специфическую протеолитическую активность определяли, используя синтетические субстраты для эндопептидаз: специфичных для субтилизинов (GlpAALpNA), трипсина (BAPA) и аминопептидаз - LpNA, FpNA. Интенсивность окраски определяли при длине волны 410 нм.

2.2.6. Рентгенофазовый анализ микробных матов. Минеральный состав образцов определяли с помощью рентгенофазового анализа на дифрактометре D-8 Advance фирмы BRUKER AXS (CuK α -излучение, графитовый монохроматор). Интенсивности отражений оценивали из дифрактограмм по высоте пиков.

2.2.7. Методы определения углеводного состава микробных матов. Моносахаридный состав микробных матов и полисахаридных фракций определяли после гидролиза с 2 М трифторуксусной кислотой (ТФУ) с последующим ВЭЖХ анализом гидролизатов (Kiyoshima *et al.*, 2002), уроновые кислоты – спектрофотометрическим методом (Usova *et al.*, 1995). Для получения полисахаридов применяли препаративную гель-проникающую хроматографию. ИК-спектры регистрировали на ИК-Фурье спектрометре ФТ-801 (Симекс, Новосибирск, Россия) в интервале 4000-600 см $^{-1}$.

2.2.8. Методы молекулярно - генетического анализа. Выделение ДНК из культур проводили по методике (Булыгина *и др.*, 2002). Амплификацию фрагмента гена 16S рНК проводили с помощью таксон-специфичных праймеров Bac-907 и Arch-915R. Секвенирование полученных ПЦР-фрагментов генов, кодирующих 16S рНК, проводили по методу Сэнгера с соавт. (Sanger *et al.*, 1977) с помощью набора реактивов Big Dye Terminator v.3.1 на автоматическом секвенаторе ABI PRIZM 3730 (Applied Biosystems, Inc., USA). Полученные последовательности сравнивали с по-

следовательностями базы данных «GenBank» с помощью программы «BLAST» (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Редактирование и выравнивание последовательностей проводили с помощью программы «BioEdit». Построение дендрограммы проводили с помощью программного пакета «MEGA 5.0». Тотальную ДНК выделяли с помощью коммерческих наборов «ДНК-сорб» (АмплиСенс, Россия) и «Bacterial Genomic DNA kit» (Axygen, США). Метагеномный анализ V3-V4 переменных районов 16S рРНК проведен на секвенаторе «MiSeq» (Illumina, США) в центре коллективного пользования «Геномика» (г. Новосибирск).

Для идентификации нуклеотидных последовательностей генов RuBisCo (cbbL – большая субъединица гена) в чистых культурах *Meiothermus* и *Thermus* были использованы праймерные группоспецифические системы. Данный анализ проводился в центре коллективного пользования (ЦКП) «Биоинженерия» (ФИЦ Биотехнологии РАН). ДНК выделяли набором PowerSoil DNA Isolation Kit (Mo-Bio) и амплифицировали V3-V4 участок гена 16S рРНК. Секвенирование проводили на платформе MiSeq (Illumina) в ЦКП «Геномика» СО РАН (ИХБФМ СО РАН). Расчеты были проведены в Excel 2010 с использованием XLSTAT.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Экологические условия среды обитания микробного сообщества гидротерм БРЗ

На рост и активность микроорганизмов, а также структуру, функциональное разнообразие микробного сообщества влияет несколько факторов, в том числе температура, окислительно-восстановительный потенциал и другие абиотические факторы среды обитания. Температура и рН воды при выходе на поверхность термальных источников варьировались в пределах 39,0 – 58,0 °С и 9,0 – 10,1. Значения окислительно-восстановительного потенциала (Eh) изменялись от -333 до +55 мВ. Минерализация (TDS) воды термальных источников не превышала 1000 мг/дм³.

Максимальные концентрации минеральных солей отмечены в источнике Гарга (744 мг/дм³). Анализ основных компонент физико-химических параметров показал, что состав воды источников Умхэй и Кучигер был относительно сходен с отличием в содержании магния и сульфида, и небольшими отклонениями в концентрации гидрокарбоната, сульфата, натрия и калия (рисунок 1). В гидротерме Гарга зафиксирована самая высокая водная концентрация хлорида, сульфата, натрия и калия, а также общая минерализация. В источнике Сеюя содержание основных ионов было самым низким. Две основных компоненты описывают 68,7 % от общего расхождения. Первая компонента отделяет высокотемпературные источники Гарга и Горячинск от других. Второй компонент объясняет лишь 21 % наблюдаемых параметров.

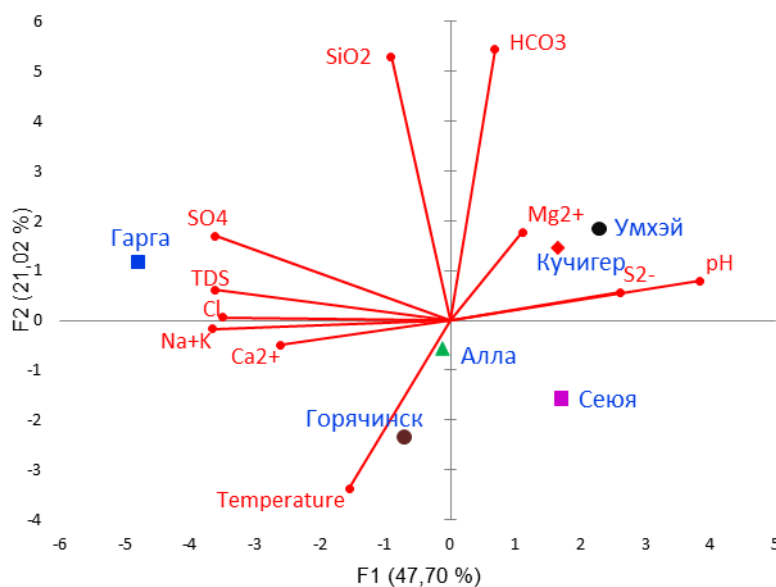


Рисунок 1. Biplot анализа основных компонент (PCA) 11 физико-химических параметров

3.2. Таксономическое разнообразие микробного сообщества гидротерм Байкальской рифтовой зоны

Нами было изучено таксономическое разнообразие микробного сообщества микробных матов гидротерм БРЗ. В зависимости от температуры воды выявлено доминирование отдельных филумов (рисунок 2). Так, *Nitrospirae* и *Deinococcus-Thermus* были преобладающими в сообществе при температуре 65 °С, тогда как *Cloroflexi* и *Atribacteria* были доминирующими типами при температурах 53-58 °С. В

интервале температур 53-58 °С начинало преобладать *Chloroflexi*-содержащее сообщество (Сеюя, Алла – станция 3). Сообщество микробного мата на станции 1 источника Алла (55 °С) таксономически разнообразное, в котором ни один филум не доминирует. При понижении температуры до 45-50 °С доминирующим филумом были *Proteobacteria* (гидротермы Горячинск, Гарга). В качестве содоминирующей были представители *Cyanobacteria*. Количество их последовательностей находилось в обратной зависимости от последовательностей филума *Chloroflexi*. Известно, что в сообществе микробных матов, где присутствуют фотосинтезирующие *Chloroflexi* и *Cyanobacteria*, бактерии *Chloroflexi* обычно переключаются на фотогетеротрофный метаболизм за счет органических соединений, синтезируемых *Cyanobacteria*, а не конкурируют с *Cyanobacteria* за неорганический углерод. Это особенно характерно для микробных матов щелочных гидротерм, где содержание CO₂ в воде ограничено (van der Meer et al., 2003). При температуре воды источников 34 °С (Алла, станция 5) доля представителей *Proteobacteria* составляла примерно 70 % от всего сообщества. Филум *Aquificae* обнаружен в минорных количествах почти во всех микробных матах источников, за исключением источников - Горячинск (45 °С), и Умхэй (43 °С), а также низкотемпературной зоны источника Алла (станция 5, 34 °С). Известно, что в эту группу входят экстремально термофильные бактерии, способные размножаться при температурах до 95 °С. Бактериальное сообщество станций гидротерм с мезофильными температурами (34-43 °С) характеризуется появлением и увеличением количества гетеротрофных бактерий филумов *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chlorobi*, *Planctomycetes*. Сравнительный анализ состава доминирующих таксонов показал существенные различия в зависимости от места отбора пробы и выявил пространственную стратификацию сообщества. Сообщества в микробных матах, развивающиеся при более высокой температуре (53 - 58 °С) были близки по качественному таксономическому составу. Тогда как сообщество микробного мата при температуре 34-51 °С сильно отличалось от высокотемпературных областей. Так, если в высокотемпературной области преобладали филогенетически разнооб-

разные группы *Atribacteria*, *Nitrospirae*, *Chloroflexi*, то при понижении температуры – доминировали *Proteobacteria*. В низкотемпературном мате не выявлены термофильные представители таких филумов как *Atribacteria*, *Nitrospirae*, *Deinococcus-Thermus*, характерные для сообщества высокотемпературных матов.

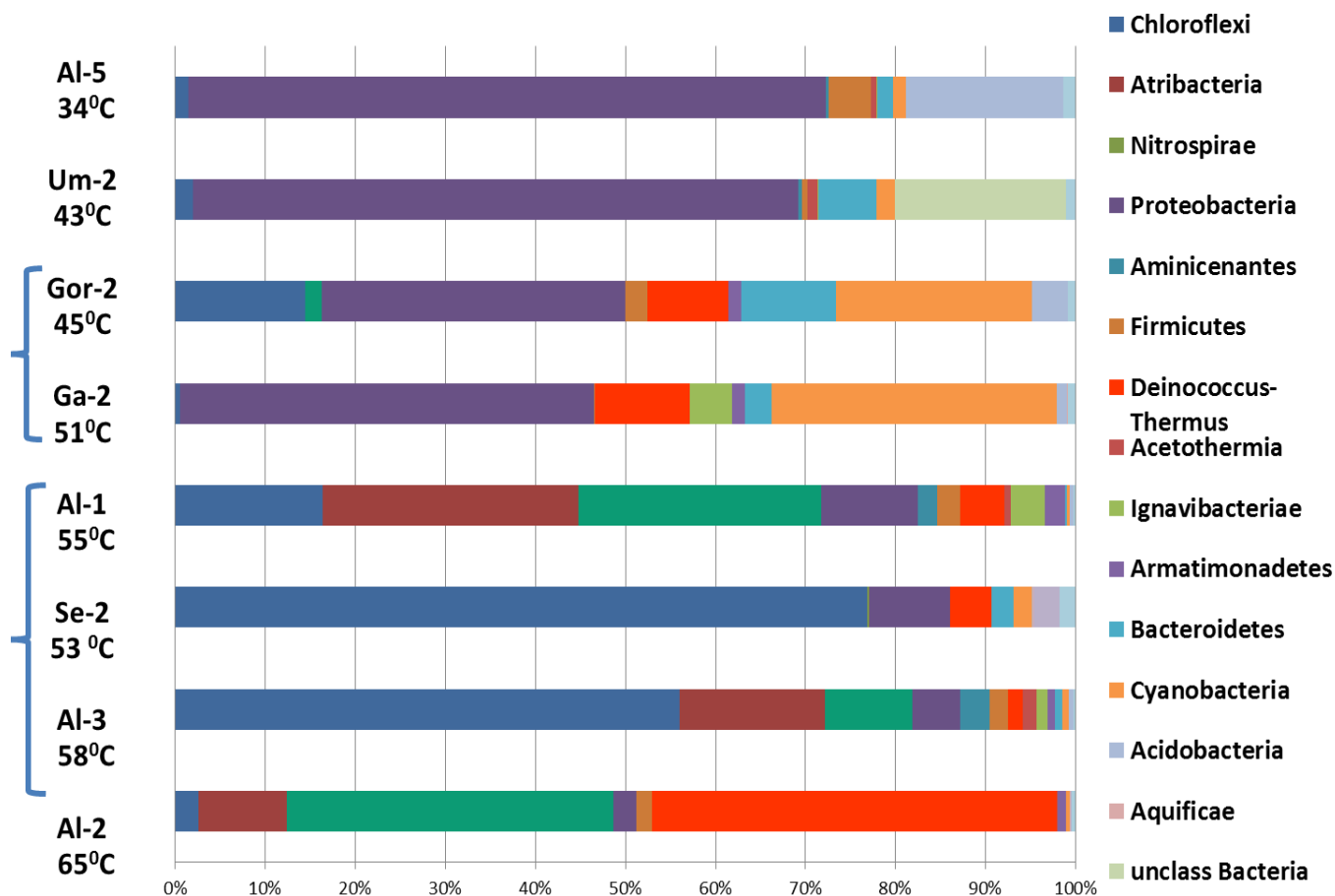


Рисунок 2. Таксономическое разнообразие микробного сообщества матов гидротерм БРЗ, полученное по результатам метагеномного анализа ампликона гена 16S рРНК

Анализ соответствий (СА) позволил определить влияние физико-химических параметров на распространение филумов в соответствии с местообитанием (рисунок 3). Температура, рН, содержание кремниевой кислоты и сульфатов главным образом влияли на распространение представителей филумов *Acetothermia* и *Firmicutes* в источнике Умхэй. Содержание сероводорода и гидрокарбонатов положительно корре-

лировало с распространением представителей филумов *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* в гидротерме Умхэй. Высокое обилие филумов *Atribacteria*, *Nitrospirae*, *Chloroflexi* и *Aminicenantes* в микробном мате гидротермы Алла обусловлено концентрациями магния и кальция. Распространение бактерий филумов *Deinococcus-Thermus*, *Ignavibacteriae*, *Cyanobacteria* тесно связано с минерализацией в источнике Гарга.

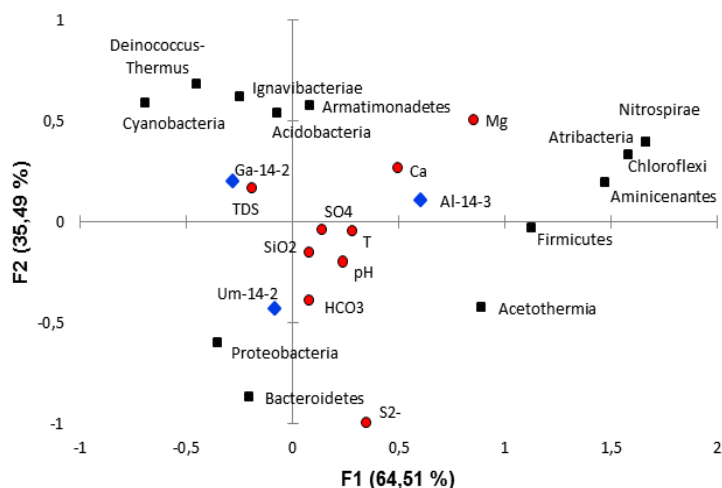


Рисунок 3. Анализ соответствий доминирующих филумов в микробном сообществе гидротерм от физико-химических параметров (Al-14-3 – ист. Алла, ст.3; Ga-14-2 - ист. Гарга, ст.2; Um-14-2 – ист. Умхэй, ст.2)

3.3. Распространение бактерий филума *Deinococcus-Thermus* в щелочных гидротермах БРЗ

Филогенетический анализ сообществ микробных матов, донных осадков и воды термальных источников Байкальской рифтовой зоны показал, что филум *Deinococcus-Thermus* представлен 3 родами: *Meiothermus*, *Thermus* и *Truepera*. Термофильные бактерии данного филума широко распространены в гидротермах с температурой 42 - 65 °С, их доля в сообществе составляла от 1,5 до 49,6 %. Бактерии группы *Meiothermus-Thermus*, осуществляющие аэробную деструкцию органического вещества, были характерны как для сообщества поверхностной воды (до 49,6 % от всех последовательностей), так и мата (до 10,5 %). В иловых отложениях бактерии этой группы не выявлены. Как правило, в микробных матах в основном преобладали бактерии рода *Meiothermus*, а в сообществе воды гидротерм были распространены представители *Thermus* (рисунок 4).

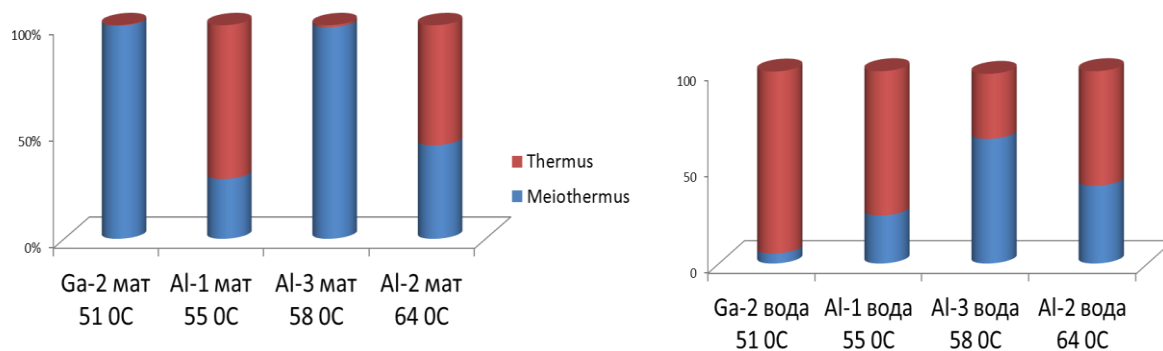


Рисунок 4. Распространение бактерий родов *Meiothermus* и *Thermus* в микробных матах (А) и воде (В) гидротерм БРЗ

3.4. Характеристика органотрофных бактерий, выделенных из термальных источников БРЗ

Из проб микробных матов и донных осадков термальных источников БРЗ было выделено 32 штамма аэробных и факультативно-анаэробных органотрофных бактерий.

Морфология. В чистую культуру было выделено 5 органотрофных бактерий (Al-14-3, Al-15-1р., Al-15-1ж., Ga-14-2, Um-14-2). Они были представлены неспорообразующими, прямыми удлиненными палочками, образующими нити (рисунок 5). Изоляты были выделены на среде с добавлением ацетата, пирувата или соетона в качестве источника углерода. Рост на поверхности твердой среды происходил в виде розовых, красных, оранжевых и желтых округлых, гладких колоний.

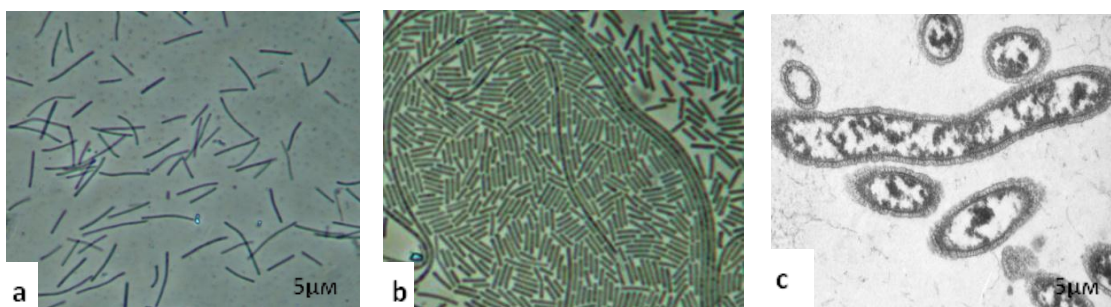


Рисунок 5. Морфология штаммов, выделенных из гидротерм Алла (а) и Умхэй (b) а, b – электронный микроскоп; с – ультратонкие срезы клеток

Экофизиология. Штаммы являются умеренными термофилами, аэробами или мик-

роаэрофилами. Они способны развиваться в широком диапазоне температур (30-60 °С). Для штаммов *Meiothermus* (Al-14-3, Al-15-1р., Ga-14-2, Um-14-2) оптимум температур составлял 45-50 °С, диапазон рН – 6,0-9,5. Культура *Thermus* Al-15-ж. имела хороший рост при температурах от 45-60 °С, с оптимумом 55 °С, в диапазоне рН от 6,5 до 9,5. Анализ ацетон-метанольных фракций клеток показал наличие каротиноидов – β-каротина и зеаксантина, которые, видимо, выполняют защитную роль всего микробного сообщества от супероксидных радикалов и окислительного стресса.

Протеолитическая активность. Максимальная активность по азоказеину у всех изучаемых культур проявляется на среде с пептоном в течение 120-144 ч культивирования и достигала 0,17-0,33 ед./мг белка. При росте на глюкозе значения пептидазной активности варьировали от 0,01 до 0,28 ед. /мг белка. Изучение пептидазной активности на специфичном для субтилизин-подобных пептидаз субстрате – GlpAALpNa показало наличие у штаммов Al-14-3 и Ga-14-2 наиболее высокой внеклеточной протеолитической активности при росте на пептоне, 3,0 и 2,4 ед./мг белка соответственно.

Генотипическая характеристика. Анализ гена 16S рРНК штаммов Al-14-3, Al-15-1, Um-14-2, Ga-14 показал, что они являются представителями рода *Meiothermus*. По результатам BLAST-анализа наиболее близким к исследуемым штаммам оказался вид *Meiothermus ruber*. Штамм Al-15-1ж. был отнесен к роду *Thermus*, уровень сходства с ближайшим валидно описанным видом *Thermus igniterrae* составил 99 %.

3.5. Определение ключевого фермента RuBisCO цикла Кальвина

Микроорганизмы группы *Meiothermus-Thermus* широко распространены в географически удаленных гидротермах, однако их роль в составе микробных сообществах практически не исследована. Установлено, что некоторые виды этого рода способны окислять тиосульфат при наличии органических субстратов (Chung *et al.*, 1997; Намсараев, 2003). Полногеномный анализ выявил в геноме некоторых видов *Meiothermus* гены, ответственные за синтез фермента рибулозо-бифосфат-

карбоксилаза (RuBisCO), ключевого фермента фиксации CO₂ (Muller *et al.*, 2016). Несколько лет назад ген, кодирующий большую субъединицу RuBisCO формы I (*cbbL*), был выбран в качестве функционального маркера для исследования экологии микроорганизмов, фиксирующих CO₂ (Videmsek *et al.*, 2009). В геноме выделенных нами штаммов *Meiothermus* (Al-14-2, Ga-14, Um-14) и *Thermus* (Al-15-1ж.) обнаружен ген *cbbL*. Все штаммы *Meiothermus*, несмотря на фенотипические отличия (цвет культуры, субстратная специфичность и т.д.) по составу аминокислот гена *cbbL* имеют 100 % идентичность. Однако они значительно удалены от ближайшего вида *Meiothermus rufus* (рисунок 6). *Meiothermus ruber* вообще отсутствует на построенной дендрограмме, несмотря на то, что у штаммов *Meiothermus ruber* DSM 1279 и *Meiothermus silvanus* DSM 9946 установлено наличие генов RuBisCO.

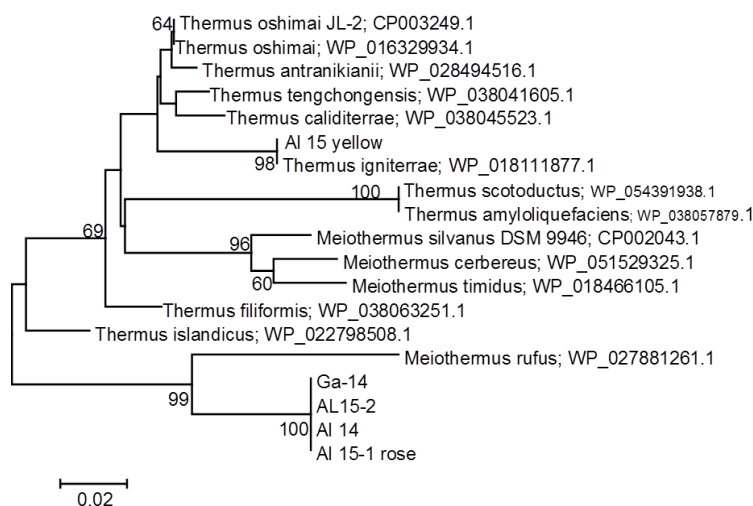


Рисунок 6. Филогенетическое дерево изучаемых штаммов и представителей рода *Meiothermus* и *Thermus*. Построено на основе анализа аминокислотных последовательностей фрагмента гена *cbbL* с использованием метода “neighbor-joining”. Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления, определенная с помощью “bootstrap” анализа

Аналогичный тип *CbbL* штамма *Thermus* (Al-15-1ж.) имеет заметные отличия в аминокислотной последовательности от представителей рода *Meiothermus*. Выделенный нами штамм кластеризуется с *Thermus igniterrae* и другими исследованными в этом отношении видами рода *Thermus*.

Таким образом, выделенные нами штаммы *Thermus* – *Meiothermus* содержат ген *cbbL* и потенциально способны к автотрофной фиксации CO₂. Следует отметить, что гены *cbbL* группы *Meiothermus-Thermus* формируют обособленный кластер от других организмов, осуществляющих фиксацию углекислоты через цикл Кальвина-

Бенсона-Бассама. Этот факт указывает на независимую эволюционную тенденцию распространения данного цикла фиксации углекислоты среди бактерий.

3.6. Минералообразование в микробных матах термальных источников

Изучение минералов микробных матов термальных источников Байкальской рифтовой зоны показало, что при участии микробного сообщества образуется кальцит, аморфный кремнезем и опал. Микроорганизмы участвуют в процессах осаждения минералов либо непосредственно, либо косвенным путем, предоставляя твердые поверхности для гетерогенной нуклеации (Phoenix *et al.*, 2000; Franke, Bazyliniski, 2003; Поверхность и ..., 2013).

С помощью рентгенофазового анализа (РФА) и сканирующей электронной микроскопии показано осаждение кальцита CaCO_3 в микробном сообществе гидротерм Алла и Гарга (рисунок 7). Кальцит является наиболее распространенной и стабильной полиморфной модификацией карбоната кальция, которая зависит от видовой принадлежности штаммов микроорганизмов (Canaveras *et al.*, 2001, Rodriguez-Navarro *et al.*, 2012).

Отложение кремнезема наблюдается в микробном мате гидротерм Гарга, Сеюя, Умхэй. Происходит окремнение чехлов цианобактерий, образуются плотные сплошные слои кремнезема (гейзерит) (рисунок 7). Клетки бактерий *Thermus* способны также к осаждению аморфного кремнезема во время экспоненциальной фазы, сопровождающееся образованием специфического белка (Sip) клеточной оболочки (Inagaki *et al.*, 2003).

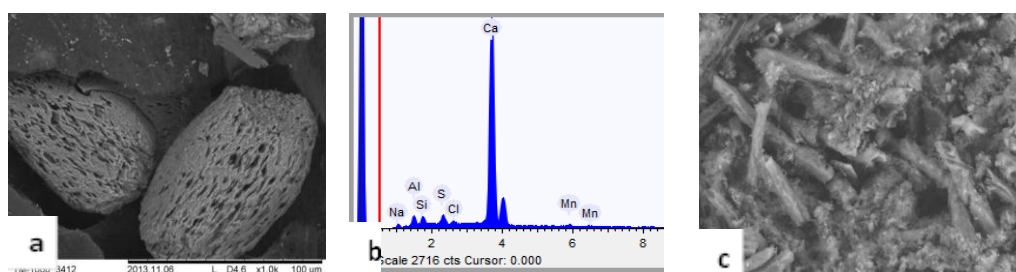


Рисунок 7. Отложения кальцита в цианобактериальном мате гидротермы Гарга (a) и их химический состав (b); c - кремнистые чехлы на нитях цианобактерий в источнике Сеюя

3.7. Исследование углеводного состава микробного сообщества

Внеклеточные полисахариды играют существенную роль в накоплении макро- и микроэлементов микробным сообществом в экстремальных экосистемах. В микробных матах гидротерм БРЗ было показано присутствие четырех видов полисахаридов (таблица 1). Наибольшее содержание маннита – 5,42 мг/г, фукоидана – 15,37 мг/г отмечено в микробном мате из источника Алла (Al-15), альгиновой кислоты – 12,54 мг/г, ламинарана – 11,51 мг/г в источнике Умхей (Um-15-2).

Таблица 1

Содержание экзополисахаридов в образцах микробных матов, мг/г (\pm SD)

Образец	Маннит	Фукоидан	Альгиновая кислота	Ламинаран
Ga-13	2.61 \pm 0.08	5.38 \pm 0.14	2.08 \pm 0.05	7.16 \pm 0.22
Um-15-2	1.86 \pm 0.06	6.21 \pm 0.18	12.54 \pm 0.37	11.51 \pm 0.41
Al-15	5.42 \pm 0.15	15.37 \pm 0.40	6.21 \pm 0.17	9.09 \pm 0.29

Следует отметить, что доминирующим полисахаридом микробного мата из гидротермы Гарга (Ga-13) является ламинаран, из гидротермы Умхей – альгиновая кислота, из гидротермы Алла – фукоидан. Подобное «неравномерное» распределение полисахаридных групп в различных образцах микробных матов, вероятно, обусловлено отличиями в экологических условиях и таксономическом составе присутствующих прокариот. Исследован моносахаридный состав биомассы 3 чистых культур *Meiothermus*. В составе моносахаридов доминировали манноза и глюкоза, в минорных количествах присутствовали галактоза, фукоза и ксилоза.

ВЫВОДЫ

1. Видовое богатство и разнообразие микробного сообщества гидротерм Байкальской рифтовой зоны было выше в микробных матах и донных осадках, чем в воде. С понижением температуры в гидротермах разнообразие бактерий увеличивалось. В сообществе микробных матов, развивающихся при температуре 53-65°C, преобладали филумы *Atribacteria*, *Nitrospirae*, *Chloroflexi*. При температуре 34-51°C доминировали представители *Proteobacteria* и *Cyanobacteria*, а также увеличивалось количество бактерий филумов *Acidobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chlorobi*, *Planctomycetes*.
2. Исследование распространения бактерий группы *Meiothermus-Thermus* выявило их значительное количество в микробных сообществах воды и матов в температурном диапазоне 42-65 °C. Было показано преобладание представителей рода *Meiothermus* в микробных матах и доминирование бактерий рода *Thermus* в сообществах воды.
3. Выделены и охарактеризованы чистые культуры бактерий группы *Meiothermus-Thermus*: 4 из них являлись штаммами вида *Meiothermus ruber*, 1 – *Thermus igniterrae*. Культуры развивались в широком диапазоне температур (30-60 °C), в качестве источника углерода и энергии использовали разнообразный спектр субстратов. В изучаемых культурах выявлены каротиноиды - β-каротин и зеаксантин.
4. Впервые установлено наличие гена *cbbL*, ключевого фермента цикла Кальвина RuBisCO, у штаммов рода *Meiothermus* и *Thermus*, что указывает на их потенциальную способность к автотрофии.
5. При участии микробного сообщества в гидротермах БРЗ образуются кальцит, аморфный кремнезем и опал. Микробное сообщество гидротерм является продуцентом углеводных групп, в том числе полисахаридов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО РЕЗУЛЬТАТАМ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых научных изданиях из перечня ВАК при Минобрнауки России

1. Раднагуруева А.А., Лаврентьева Е. В., Будагаева В. Г., Бархутова Д. Д., Дунаевский Я. Е., Намсараев Б. Б. Органотрофные бактерии горячих источников Байкальской рифтовой зоны// Микробиология. – 2016. – Т. 85. - №3. – С. 347-360
2. Будагаева В.Г., Раднагуруева А.А., Лаврентьева Е.В., Бархутова Д.Д., Оленников Д.Н. Углеводы микробных матов щелочных гидротерм Прибайкалья//Химия растительного сырья. – 2018. - № 1. - С. 45-51
3. Valentina G. Budagaeva, Darima D. Barkhutova. The role of the microbial community in mineral formation in the thermal springs of the Baikal region// Journal of Siberian Federal University. Biology. – 2018. – № 11 (4). – С. 340-355.
4. Бабасанова О.Б., Будагаева В.Г., Бархутова Д.Д., Намсараев Б.Б. Органотрофные бактерии гидротерм Байкальской рифтовой зоны и их функциональная роль в микробном сообществе//Вестник БГУ. Выпуск 4. Биология, география. – Улан-Удэ: Изд-во БГУ. – 2013. – С. 150-153.

Публикации в других рецензируемых научных изданиях

1. Устинова О.В., Будагаева В.Г. Развитие цианобактериальных матов и концентрации хлорофилла *a* в термальных источниках Алла и Уро (Бурятия) в зависимости от температуры// Вестник БГУ. Выпуск 3. Химия, физика. – Улан-Удэ: Изд-во БГУ. – 2014. – С. 81-83.
2. Будагаева В. Г., Устинова О.В., Бархутова Д.Д. Элементный состав микробных матов гидротерм Байкальского региона// Вестник БГУ. Выпуск 3. Химия, физика. – Улан-Удэ: Изд-во БГУ. – 2015. - С. 47-50.
3. Будагаева В. Г., Устинова О.В., Бархутова Д.Д., Намсараев Б.Б. Гидрохимическая и микробиологическая характеристика гидротермы Кучигер//Вестник БГУ. Выпуск 3. Химия, физика. – Улан-Удэ: Изд-во БГУ. – 2015. – С. 59-62.
4. 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.

Тезисы

1. Бабасанова О.Б., Будагаева В.Г., Бархутова Д.Д. Гидрохимические параметры и распространение бактерий-деструкторов в гидротермах Прибайкалья // Матер-лы междунар. науч.

- конф. «Экология и геохимическая деятельность микроорганизмов экстремальных местобитаний» - Улан-Удэ, Россия 11 – 12 июля 2013. - С. 10-11.
2. Будагаева В.Г., Калашников А.М., Бархутова Д.Д. Термофильные гетеротрофные бактерии микробного мата источника Алла // Материалы Всероссийского симпозиума с международным участием «Современные проблемы физиологии, экологии и биотехнологии микроорганизмов» - Москва, 24-27 декабря 2014 г.
 3. Будагаева В.Г., Бархутова Д.Д. Гетеротрофные бактерии рода *Meiothermus* в гидротермах Прибайкалья//Материалы 4-го Байкальского симпозиума по микробиологии «Микроорганизмы и вирусы в водных экосистемах». – Иркутск, 7-12 сентября 2015. - С. 255-256
 4. D.D. Barkhutova, V.G. Budagaeva, M.V. Sukhacheva, D.S. Grouzdev, V.M. Gorlenko, B.B. Kuznetsov. Ribulose-1,5-bisphosphate Carboxylase (RuBisCO), a Key Enzyme of Carbon Dioxide Fixation from Aerobic Thermophilic Heterotrophs // Extremophiles 2016 / Book of Abstracts 11th International Congress on Extremophiles September 12-16, Kyoto, JAPAN. P. 172
 5. Бархутова Д.Д., Будагаева В.Г., Устинова О.В. Роль микробного сообщества горячих источников Байкальской рифтовой зоны в биогеохимических процессах// Материалы Всероссийской конференции с международным участием "Эволюция биосферы и техногенез". – Чита, ИПРЭК СО РАН, 2016. - С. 84-85.
 6. Будагаева В.Г., Бархутова Д.Д. Бактерии рода *Meiothermus*: таксономия и экофизиология // Материалы Всероссийской конференции молодых ученых с международным участием «Биоразнообразие: глобальные и региональные процессы». – Улан-Удэ, ИОЭБ СО РАН. 2016. - С. 18-19.
 7. Budagaeva V.G., Dambinova E.Ts., Barkhutova D.D. Mineral formation in thermal alkaline springs of Baikal region // 13th International Conference on Salt Lake Research (ICSLR 2017) Book of abstracts. Editors by E.Yu. Abidueva, D.D. Barhutova, V.V. Khakhinov. 2017. - С. 75.

Подписано в печать 23.12.2019 г. Формат 60x84 1/16.
Бумага офсетная. Объем 1,5 печ. л. Тираж 150. Заказ № 40.

Отпечатано в типографии Изд-ва Федерального государственного
бюджетного учреждения науки БНЦ СО РАН.
670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6.