

На правах рукописи



Кашкак Елена Сергеевна

**Разнообразие микробных сообществ термальных источников
Восточного Саяна**

Специальность 03.02.08 «Экология»
(биологические науки)

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Иркутск - 2016

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Бурятский государственный университет» (ФГБОУ ВО «БГУ») и Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН» (ФГБУН ИОЭБ СО РАН)

Научный руководитель: Данилова Эржена Викторовна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории микробиологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института общей и экспериментальной биологии Сибирского отделения Российской академии наук

Научный консультант: Намсараев Баир Бадмабазарович, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией микробиологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института общей и экспериментальной биологии Сибирского отделения Российской академии наук

Официальные оппоненты:

Карначук Ольга Викторовна, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой физиологии растений и биотехнологии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет», г. Томск

Белых Ольга Ивановна, кандидат биологических наук, доцент, заведующий лабораторией водной микробиологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Лимнологического института Сибирского отделения Российской академии наук, г. Иркутск

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии микроорганизмов Российской академии наук (ФГБУН ИБФМ РАН), г. Пущино

Защита диссертации состоится 30 ноября 2016 г. в 13.00 ч. на заседании диссертационного совета Д212.074.07 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 им. В.Г. Распутина Иркутского государственного университета по адресу: 664074, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 124, и на сайте ИГУ: <http://isu.ru/ru/science/boards/dissert/dissert.html?id=81>

Отзывы просим направлять ученому секретарю диссертационного совета по адресу: 664003, г. Иркутск, ул. Карла Маркса, 1, Биолого-почвенный факультет. Тел/факс: (3952) 241855; e-mail: dissovet07@gmail.com

Автореферат диссертации разослан “ ____ ” октября 2016 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Приставка Алексей Александрович

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. В термальных источниках под влиянием подземных вод развиваются и функционируют уникальные популяции микроорганизмов. Исследования разнообразия микробных сообществ гидротермальных местообитаний дают возможность определить их экологическую роль, расширяют представления о физико-химических границах существования и функционирования живых систем и представляют интерес для поиска микроорганизмов, имеющих высокий биотехнологический потенциал (Streit, Schmitz, 2004; Wang et al. 2012; Акимов и др., 2013; Alsop et al. 2014).

В настоящее время активно изучаются микробные сообщества наземных гидротерм областей активного вулканизма, которые имеют широкий диапазон температур, pH и минерализации (Бонч-Осмоловская и др., 1999; Брянская и др., 2006; Гумеров и др., 2011; Намсараев и др., 2011; Wemheuer et al., 2013; Калашников и др., 2014; Colman et al., 2014; Rozanov et al., 2014; Gaisin et al., 2015 и др.). Район Восточного Саяна (Байкальская рифтовая зона) характеризуется большим разнообразием мезотермальных источников, выходы которых приурочены к областям молодого вулканизма. Исследования микробных сообществ минеральных источников в данном регионе недостаточно изучены и немногочисленны (Данилова и др., 2001; Данилова и др., 2009; Дульцева и др., 2006; Татаринцов и др., 2006; 2010). До настоящего времени изучение разнообразия микробных сообществ в минеральных источниках Восточного Саяна с помощью молекулярно-генетических методов не проводилось.

Цель работы: изучить филогенетическое и функциональное разнообразие микробных сообществ в экосистемах термальных источников Восточного Саяна.

Основные задачи исследования:

1) оценить экологические условия формирования микробных сообществ в термальных источниках Хойто-Гол и Жойган;

2) определить таксономическое разнообразие микробного сообщества воды, матов и илов гидротерм Хойто-Гол и Жойган с помощью метода высокопроизводительного секвенирования;

3) выделить культуры бактерий функциональных групп: аноксигенных фототрофных, аэробных сероокисляющих, сульфат- и железоредуцирующих бактерий, и идентифицировать их на основе полифазной таксономии;

4) охарактеризовать структуру микробных сообществ и оценить роль микроорганизмов в круговороте биогенных элементов.

Научная новизна и практическая значимость работы. Впервые с использованием молекулярно-генетических методов охарактеризовано видовое разнообразие культивируемого и некультивируемого микробного сообщества гидротерм Восточного Саяна. Впервые из исследуемых гидротерм выделены и описаны чистые культуры сульфатредуцирующих, сероокисляющих и аноксигенных фототрофных бактерий. Выделенные штаммы бактерий могут быть использованы в биотехнологии, в частности в процессах биоремедиации. Свыше 300 тыс. последовательностей 16S рНК бактерий, полученных в результате пиросеквенирования, внесены в мировую базу данных NCBI, что имеет практическое значение для сравнительного анализа микроорганизмов. Полученные результаты также могут быть использованы в учебном процессе по экологии и микробиологии в высших учебных заведениях.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов Минобрнауки России (соглашение № 6.1990.2014/К; соглашение № 14.575.21.0067), РФФИ (№№ 12-04-90853-мол_рф_нр, 14-34-50176-мол_нр), Председателя Правительства Республики Тыва, Бурятского госуниверситета для поддержки молодых ученых, конкурса «Академическая мобильность» Фонда Михаила Прохорова.

Основные защищаемые положения.

1. Таксономическое разнообразие микробных сообществ термальных источников Жойган и Хойто-Гол формируется в сходных ландшафтно-климатических условиях и определяется гидрохимическим составом воды источников. В составе бактериальных сообществ гидротерм Хойто-Гол и Жойган значимая роль принадлежит филумам *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* и *Firmicutes*. В источниках состав доминирующих филотипов на уровне семейства и рода отличается.
2. Видовой состав культивируемых микроорганизмов круговорота серы (аэробных сероокисляющих, сульфатредуцирующих бактерий и аноксигенных фототрофных бактерий) в микробных матах минеральных источников сходен.
3. В сульфидсодержащих гидротермах Хойто-Гол цикл серы выражен повсеместно. В гидротермах Жойган, содержащих в воде закисное железо, круговорот серы локален и активизируется в местах, где происходит пассивное накопление и разложение органических остатков с вторичным образованием сульфида.

Степень достоверности и апробация результатов. Автор принимал личное участие в экспедиционных, экспериментальных работах, обработке, анализе и обсуждении результатов, написании научных статей и материалов конференций.

По материалам диссертации опубликовано 11 печатных работ, из них 4 статьи из перечня ВАК. Результаты исследований были доложены и обсуждены на международных и российских конференциях: «Экология и геохимическая деятельность микроорганизмов экстремальных местообитаний» (Улан-Удэ–Уланбаатар, 2011), «Central Asian environmental problems and potential solutions» (Дархан, Монголия, 2013), «Развитие физико-химической биологии и биотехнологии на современном этапе» (Иркутск, 2013), «Курортная база и природные лечебно-оздоровительные местности Тувы и сопредельных регионов» (Кызыл, 2013), «Systems Biology and Bioinformatics» (Новосибирск, 2015).

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 132 страницах и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, заключения, выводов, списка литературы, включающего 211 наименований. Диссертация содержит 15 таблиц и 36 рисунков.

Список сокращений: АФБ – аноксигенные фототрофные бактерии; ЗНБ – зеленые нитчатые бактерии; ЗСБ – зеленые серобактерии; ПНБ – пурпурные несерные бактерии; СОБ – сероокисляющие бактерии; СРБ – сульфатредуцирующие бактерии; Fe-РБ – железоредуцирующие бактерии; Хл – хлорофилл; БХл – бактериохлорофилл.

Благодарности. Работа посвящена светлой памяти научного руководителя Намсараева Б.Б. Автор выражает глубокую благодарность к.б.н. Даниловой Э.В., д.б.н., проф. Горленко В.М. и всем сотрудникам и аспирантам лаборатории микробиологии ИОЭБ СО РАН и лаборатории экологии и геохимической деятельности микроорганизмов ИНМИ РАН за помощь и поддержку.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В главе обобщены и представлены сведения о разнообразии микробных сообществ минеральных источников, влиянии экологических условий на разнообразие, а также функциональной активности микробных сообществ минеральных источников.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследования служили микробные сообщества воды, микробных матов и илов гидротерм Хойто-Гол и Жойган, находящихся в отрогах Восточного Саяна. Гидрохимические и микробиологические исследования образцов проводили в 2011-2014 гг.

Методы исследования. Определение физико-химических характеристик воды в местах отбора проб проводили с помощью портативных приборов и стандартных методов гидрохимии (Резников и др., 1970; Намсараев и др., 2005).

Учет численности и выделение чистых культур основных групп микроорганизмов проводили методом предельных разведений на селективных питательных средах (таблица 1). Значение pH сред устанавливали 10%-ными растворами HCl или Na₂CO₃. Температура инкубации составляла 30°C.

Таблица 1. Среда, использованные для выделения и культивирования основных групп микроорганизмов

Компоненты (г/дм ³ дистиллированной воды)	Аноксигенные фототрофные бактерии				СОБ	СРБ	Fe-РБ
	ЗНБ	ЗСБ	ПСБ	ПНБ			
Na ₂ SO ₄	0,5	0,5	0,5	0,5	2,5	2,5	-
KH ₂ PO ₄	0,5	0,5	0,5	0,5	0,7	0,7	0,7
NH ₄ Cl	0,5	0,5	0,5	0,5	0,2	0,2	0,2
MgCl ₂ ·7H ₂ O	0,2	0,2	0,2	0,2	0,4	0,4	0,4
KCl	0,33	0,33	0,33	0,33	-	-	-
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
NaHCO ₃	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Na ₂ CO ₃	-	-	-	-	-	-	0,5
Na ₂ S ₂ O ₃ ·5H ₂ O	0,5	-	-	0,5	2,0	-	-
Na ₂ S·9H ₂ O	0,7	0,7	0,7	0,3	-	1,0	-
Ацетат натрия	1,0	-	-	1,0	-	-	3,0
Лактат натрия	-	-	-	-	-	2,0	2,0
Дрожжевой экстракт	-	-	-	0,5	-	0,1	0,1
Витамин В ₁₂	-	-	-	-	20 мкг/л		
раствор микроэлементов (Pfennig, 1965)	1 мл/л						
комплекс витаминов (Pfennig, Lippert, 1966)	1 мл/л			-	-	-	-
pH среды	7,8 – 8,0	6,8 – 7,2	7,8 – 8,2		7,0 – 7,5		

Аноксигенные фототрофные бактерии (АФБ) выращивали анаэробно при освещенности 2000 лк. Пигментный состав АФБ определяли на спектрофотометре СФ-56 (ЛОМО, Россия). В экспериментах в среду вносили соли закисного железа и микроскопически определяли способность откладывать окислы железа культурами АФБ. О развитии сероокисляющих бактерий (СОБ) судили по помутнению среды за счет образования серы и изменению цвета среды с бромтимолблау с сине-зеленого на желтый при изменении pH. При выделении сульфатредуцирующих бактерий (СРБ) к основной среде добавляли 0,1 г FeSO₄·7H₂O. О росте СРБ судили по образованию черного осадка FeS и измерению количества образованного сульфида (Практикум..., 2005). Культивирование железоредуцирующих бактерий (Fe-РБ) проводили на питательной среде с добавлением нерастворимого слабокристаллического оксида железа (III) – ферригидрита (Slobodkin et al., 1997). О развитии Fe-РБ судили по образованию чёрного осадка магнетита или сидерита.

Микроскопические методы. Чистоту культур, морфологию клеток изучали с помощью световых микроскопов Axiostar PLUS (Carl Zeiss, Германия) и BX41 (Olympus, Япония). Тотальные препараты и ультратонкие срезы изучали при помощи трансмиссионной электронной микроскопии на микроскопе Jeol JEM 100С (Япония). Исследование поверхности и элементного состава микробных матов и пленок, образовавшихся при культивировании СОБ, проводили на сканирующем электронном микроскопе SEM TM-1000 (НИТАСНИ, Япония).

Молекулярно-биологические методы. ДНК клеток монокультур нитчатых АФБ выделяли с помощью ЦТАБ-метода (Wilson, 2001). ДНК клеток всех остальных культур бактерий выделяли с помощью метода, описанного ранее Булыгиной с соавторами (Булыгина и др., 2002). Молекулярно-генетическую идентификацию монокультур АФБ и чистых культур СОБ и СРБ проводили посредством анализа последовательностей генов 16S рРНК и *fmoA* (Fenna–Matthews–Olson protein) в центре коллективного пользования (ЦКП) «Биоинженерия» (г. Москва). Для идентификации культур Fe-РБ был применен денатурирующий градиентный гель-электрофорез (ДГГЭ), как описано ранее (Muyizer et al., 1993) с последующим секвенированием ПЦР-фрагментов из индивидуальных полос. Данный анализ выполнен Гавриловым С.Н. в лаборатории термофильных микроорганизмов ИНМИ РАН (г. Москва). Из накопительных культур Fe-РБ была выделена тотальная ДНК с помощью ранее описанного метода (Булыгина и др., 2002). Амплификацию фрагмента гена 16S рРНК (фрагмент с 500 по 900 н. по *E. coli*) проводили с помощью таксон-специфичных праймеров (на основные филумы доменов *Bacteria* и *Archaea*) Bac-907R (Muyizer et al., 1995) и Arch-915R (Casamayor et al., 2002). Все полученные последовательности проверяли и корректировали в программе BioEdit (Hall, 1999). Сравнительный анализ нуклеотидных данных с последовательностями базы данных GenBank проводили с помощью программных пакетов BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Построение филогенетических деревьев вели с помощью пакета программ MEGA v.6.06 (<http://www.megasoftware.net/mega.php>).

Метагеномный анализ микробного сообщества. Тотальную ДНК выделяли с помощью коммерческих наборов «ДНК-сорб» (АмплиСенс, Россия) и «Bacterial Genomic DNA kit» (Axygen, США) с учетом предложенных ранее модификаций (Белькова, 2009). Метагеномный анализ V3-V4 переменных районов 16S рРНК проведен на секвенаторе «MiSeq» (Illumina, США) в ЦКП «Геномика» (г. Новосибирск). Для анализа были использованы универсальные праймеры (на

основные филумы доменов Bacteria и Archaea) 343F (5'-CTCCTACGGRRSGCAGCAG-3') и 806R (5'-GGACTACNVGGGTWTCTAAT-3') в сочетании с адаптером последовательностей Illumina. Для биоинформационного анализа полученных библиотек использовали ресурсы Pyrosequencing pipeline (<https://pyro.cme.msu.edu>) (Wang et al., 2007; Cole et al., 2014). Полученные последовательности выравнивали и кластеризовали с использованием программы Complete Linkage Clustering (<https://pyro.cme.msu.edu>). Таксономическое разнообразие сообщества оценивали при различных кластерных расстояниях, соответствующих следующим таксонам: 0,03 (97%) – вид, 0,05 (95%) – род, 0,1 (90%) – семейство, используя программу Rarefaction (<https://pyro.cme.msu.edu>). Диаграммы Венна были построены с помощью графического редактора SmartArt, расчеты выполнены в Excel 2010 с использованием макросов.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Развитие микробных матов в минеральных источниках Восточного Саяна в зависимости от экологических условий среды обитания

Минеральные источники Хойто-Гол имеют 5 выходов с термальной (32,5-33,6°C) водой вдоль берега р. Аршан. Все выходы воды имели нейтральные или слабощелочные значения pH (таблица 2). Содержание сероводорода варьировало от 0,52 до 7,05 мг/дм³. По литературным данным, содержание его достигало 20 мг/дм³ (Данилова и др., 2009). Концентрация железа не превышала 0,6 мг/дм³. Тип воды источников – гидрокарбонатный кальциево-натриевый.

Таблица 2. Физико-химические параметры воды минерального источника Хойто-Гол

Станция	Описание микробных матов	t, °C	pH	[H ₂ S] ₃ , мг/дм ³	[CO ₂] ₃ , мг/дм ³	[Fe _{общ}] ₃ , мг/дм ³
Hg1 верхний выход источника	Тонкая зеленая биопленка толщиной 1 мм	34,0	7,32	6,69	57,0	0,40
Hg2 новый выход	Темно-зеленый мат толщиной 5 мм	33,6	7,33	7,03	12,7	0,37
далее по ручью:						
Hg2-1 в 3 м от ст. Hg2	Зеленый мат с белыми и рыжими обрастаниями толщиной до 2 см	33,4	7,45	7,05	45,4	0,60
Hg2-2 в 5 м от ст. Hg2	Серный мат с зелеными вкраплениями толщиной 1 см	32,6	7,84	7,28	48,6	-
Hg2-3 ручей после ванного комплекса №1	Зеленый мат с белыми обрастаниями толщиной 1 см	32,5	7,65	7,17	38,9	0,46
Hg2-4 ручей после ванного комплекса №2	Светло-зеленый мат толщиной 7 мм	32,7	7,35	7,03	23,8	-
Hg3 новый выход «Питьевой источник»	Тонкая зеленая биопленка толщиной 2 мм	33,5	7,32	0,52	31,8	0,41

Примечание: здесь и далее: [x] – содержание вещества; «-» – нет данных; «н.о.» – не обнаружено.

Сероводород, поступающий с вулканическими эксгаляциями, является характерной особенностью минеральных источников Хойто-Гол, в которых активно развивались зеленые и серные микробные маты. Основу матов на выходах источников составляли цианобактерии *Phormidium* sp., *Anabaena* sp., *Microcystis* sp. Спектры поглощения пигментов из микробных матов подтверждают преобладание цианобактерий, для которых характерно наличие хлорофилла α (Хл α) с максимумом при 675 нм. По изливу минерального ручья на станциях Нг2-1, Нг2-2, Нг2-3 и Нг2-4 наблюдались микробные маты толщиной до 2 см, состоящие в основном из цианобактерий и бесцветных серобактерий *Thiothrix* sp. Видовой состав цианобактерий расширяется с появлением *Oscillatoria* sp., *Gloeocapsa magma* и *Synechococcus* sp. Спектры поглощения пигментов из микробных матов показывают наличие цианобактерий, содержащих Хл α , и АФБ, содержащих бактериохлорофиллы (БХл). Максимум инфракрасного поглощения в клетке при 745 нм характерен для БХл c , имеющегося у всех зеленых серобактерий (ЗСБ) класса *Chlorobi* и у некоторых зеленых нитчатых бактерий (ЗНБ) класса *Chloroflexia* (рисунок 1а). Пики 805 нм и 875 нм на спектрах поглощения пигментов в клетке указывают на присутствие БХл a , характерного для большинства пурпурных фототрофных бактерий, для всех зеленых серобактерий и нитчатых АФБ.

Появлению в составе микробного мата бесцветных серобактерий *Thiothrix* sp. способствовало развитие мата в условиях проточной воды, что необходимо для создания градиента H_2S и O_2 (Заварзин, 1972). На поверхности мата формировались белые минеральные отложения, состоящие из элементной серы, содержание которой достигает 99%, что доказывает участие бесцветных серобактерий в аккумуляции и кристаллизации серы и важную роль их в поведении системы в целом (рисунок 1б,в). В ночное время окисление соединений серы оказывается основной статьей расхода O_2 (Лазарева и др., 2012).

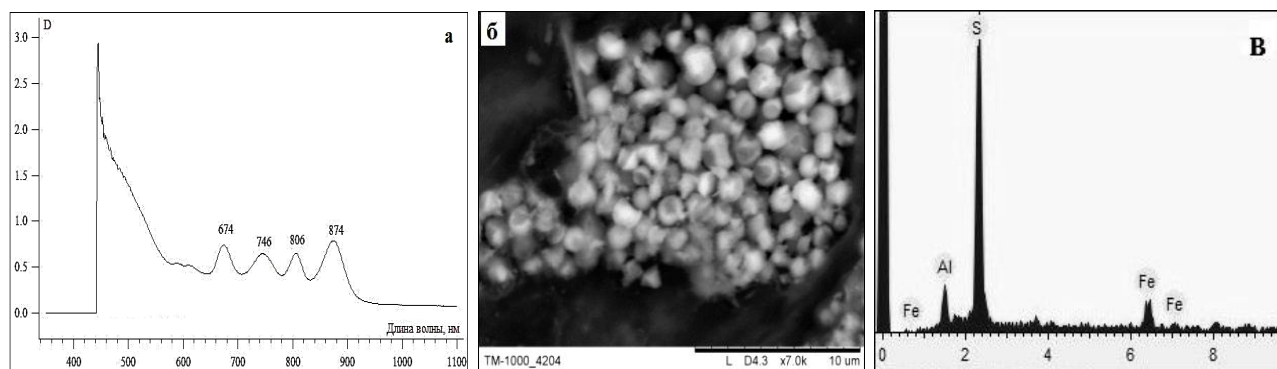


Рисунок 1. Микробные сообщества источника Хойто-Гол (станция Нг2-1): а - спектр поглощения мата; б – минеральные отложения, формирующиеся на поверхности мата; в – элементный состав отложений

Минеральные источники Жойган – это более 30 выходов углекислых вод с максимальной температурой воды до 42°C. Основным их отличием от источников Хойто-Гол было низкое содержание сульфида. Для исследования были выбраны 7 выходов, в которых образовывался сульфид или наблюдалось отложение окисного железа (таблица 3). Концентрация железа в воде источников была значительно выше (до 5,6 мг/дм³), чем в источниках Хойто-Гол (до 0,6 мг/дм³). Количество железа в водах источников (Jg7, Jg8, Jg9), содержащих сульфид, было незначительным (до 0,5 мг/дм³) из-за образования нерастворимого сульфида железа. По химическому составу минеральные источники Жойган относились к гидрокарбонатным кальциево-натриевым.

Таблица 3. Физико-химические параметры минерального источника Жойган

Станции	Описание проб	t, °C	pH	[H ₂ S], мг/л	[CO ₂] ₃ , мг/дм ³	[Fe _{общ}] ₃ , мг/дм ³	[Si], мг/дм ³
Jg1 Выход с бурым илом	тонкий зеленый мат	25,5	6,56	н.о.	312,7	2,6	24,8
Jg7 Выход с запахом H ₂ S	ил серого цвета	22,6	6,68	0,76	302,5	0,2	17,7
Jg8 Выход с запахом H ₂ S	ил серого цвета	23,5	6,77	0,93	303,5	0,18	19,1
Jg9 Грязевая ванна с запахом H ₂ S	ил темно-серого цвета	30,0	7,23	0,98	352,0	0,5	19,9
Jg10 Выход с бурым илом	светло-зеленый мат	31,6	6,58	н.о.	297,0	5,6	23,2
Jg12 Ручей из горячих ванн	желто-зеленый мат	35,7	7,13	н.о.	352,0	4,2	25,2
Jg19 Неглубокая воронка с мутной водой	ил серо-голубого цвета	29,4	7,13	н.о.	387,0	2,8	17,5

В источниках Жойган тонкие и рыхлые маты светло-зеленого и зеленого цветов толщиной до 0,5 см наблюдались в выходах Jg1, Jg9, Jg10, Jg12. В составе матов доминировали цианобактерии родов *Phormidium* и *Oscillatoria*. В нижних микроразделах микробных матов в непосредственной близости к зоне активных деструкционных процессов, ведущих к образованию H₂S и подкислению среды, развивались АФБ. Спектры поглощения пигментов из микробных матов показывают наличие цианобактерий с Хл *a* и АФБ (рисунок 2а). На поверхности микробных матов развивались диатомовые водоросли *Pinnularia* sp. (рисунок 2б). В местах интенсивного окисления железа в донных отложениях гидротерм Жойган были обнаружены ожелезненные нити железобактерий *Gallionella* sp., указывающие на присутствие микроорганизмов цикла железа (рисунок 2в).

Таким образом, физико-химические условия в источниках Хойто-Гол и Жойган различались по содержанию сульфида и железа, что отражалось на

видовом составе формирующихся микробных матов. В микробных матах источника Хойто-Гол основными формообразующими бактериями являются цианобактерии *Phormidium* sp. и бесцветные серобактерии *Thiothrix* sp., а в микробных матах источника Жойган – цианобактерии родов *Phormidium* и *Oscillatoria*, диатомовые водоросли *Pinnularia* sp., железобактерии *Gallionella* sp.

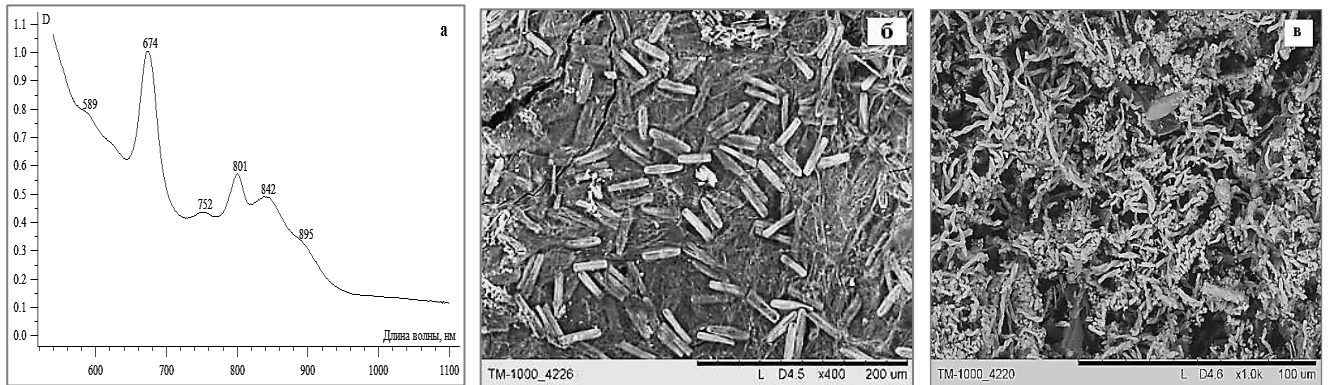


Рисунок 2. Микробные сообщества источника Жойган (станция Jg12): а – спектр поглощения мата; б – поверхность мата с клетками диатомовых водорослей *Pinnularia* sp. и нитчатых цианобактерий; в – перекрученные ожезненные нити железобактерий *Gallionella* sp. на поверхности микробного мата

2. Состав микробных сообществ на основании анализа последовательностей нуклеотидов гена 16S рНК

В результате определения таксономического разнообразия прокариот в образцах воды, микробных матов и ила из минеральных источников Хойто-Гол и Жойган были выявлены флотипы, принадлежащие домену *Bacteria* и *Archaea*. Видовое разнообразие сообщества образцов источника Жойган по индексу Шеннона и Chao1 было больше, чем в образцах источника Хойто-Гол (таблица 4). Число выявленных флотипов увеличивалось линейно (рисунок 3). Кривые накопления флотипов в сообществах мата источника Хойто-Гол не выходили на плато на уровне родов, в сообществах источника Жойган не выходили на плато ни на уровне рода, ни на уровне семейства, их количество увеличивалось линейно.

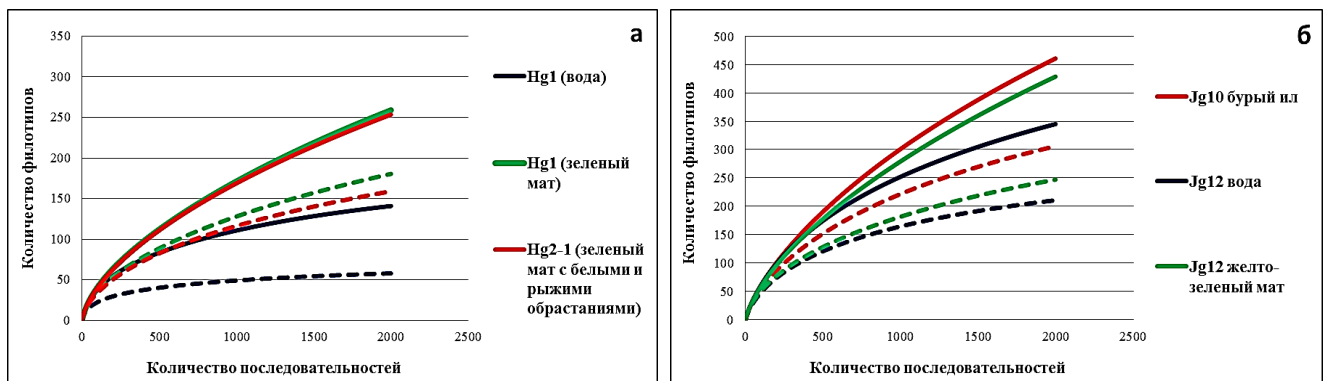


Рисунок 3. Rarefaction анализ микробных сообществ минеральных источников Хойто-Гол (а) и Жойган (б). Показана зависимость количества флотипов на уровне семейств (пунктирные линии) и родов (сплошные линии) кластерного расстояния от количества проанализированных последовательностей 16S рНК

Таблица 4. Разнообразие микробных сообществ и индексы видового богатства на разных уровнях кластерного расстояния

Источник	Образец	Дистанция	Количество последовательностей	Количество филоотипов (ОТЕ)	Индекс разнообразия	
					Chao1	Shannon
Хойто-Гол	Hg1 (вода)	0,03	47840	241	347	4,06
		0,05		141	179	3,57
		0,1		58	64	2,75
	Hg1 (зеленый мат)	0,03	48525	374	943	4,00
		0,05		296	579	3,76
		0,1		201	306	3,47
	Hg2-1 (зеленый мат с белыми и рыжими обрастаниями)	0,03	46989	422	1143	4,09
		0,05		318	639	3,81
		0,1		188	290	3,43
Жойган	Jg12 (вода)	0,03	86113	462	738	5,23
		0,05		353	509	4,69
		0,1		214	266	4,04
	Jg12 (желто-зеленый мат)	0,03	33060	539	1254	5,07
		0,05		429	986	4,76
		0,1		247	357	4,29
	Jg10 (бурый ил)	0,03	37881	546	1221	5,03
		0,05		461	966	4,80
		0,1		306	458	4,41

Микробные сообщества источника Хойто-Гол. Микробные сообщества воды и матов сходны по наличию основных филумов бактерий. В образцах доминировали *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* и *Firmicutes*, однако количество филумов в воде было в 2 раза меньше (рисунок 4а). Археи составляли менее 0,1% микроорганизмов сообщества матов и были представлены мезофильными видами.

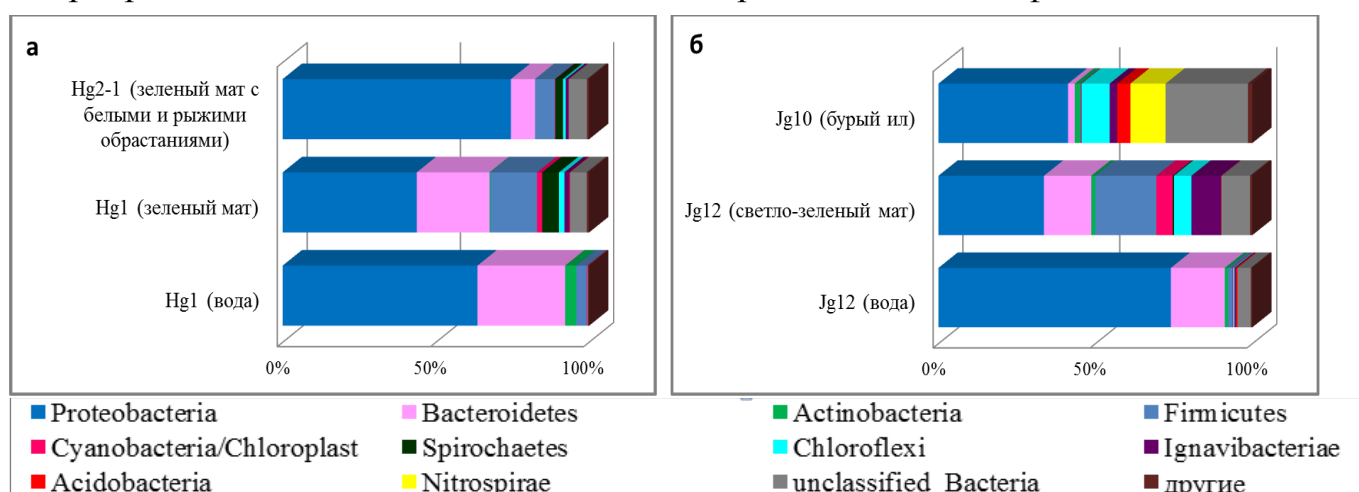


Рисунок 4. Таксономическое разнообразие прокариот по результатам метагеномного анализа ампликона гена 16S рРНК: а – источник Хойто-Гол, б – источник Жойган

В воде наиболее распространенными являлись хемоорганотрофные бактерии *Acinetobacter* sp. (23,6%, класс *Gamma*proteobacteria). В сообществах зеленого мата (Hg1) и зеленого мата с белыми и рыжими обрастаниями (Hg2-1) преобладали сероредуцирующие бактерии *Sulfurospirillum* sp. (38,7%, класс

Epsilonproteobacteria) и сероокисляющие бактерии *Thiothrix* sp. (50,2%, класс *Gamma*proteobacteria), соответственно.

Сравнительный анализ микробного разнообразия был проведен с использованием диаграмм Венна на кластерных расстояниях 0,1 (семейства) и 0,05 (рода). На разных кластерных расстояниях были получены сходные результаты. В источнике Хойто-Гол диаграммы Венна показали, что 51 семейство и 50 родов были обнаружены и в матах, и в воде источника (рисунок 5). Количество уникальных для каждого сообщества родов варьировало от 34 в зеленом мате с белыми и рыжими обрастаниями, до 90 в воде. Наибольшее сходство наблюдалось в сообществах зеленого мата (Hg1) и зеленого мата с белыми и рыжими обрастаниями (Hg2-1), в них отмечены 65 общих семейств и 91 общий род.

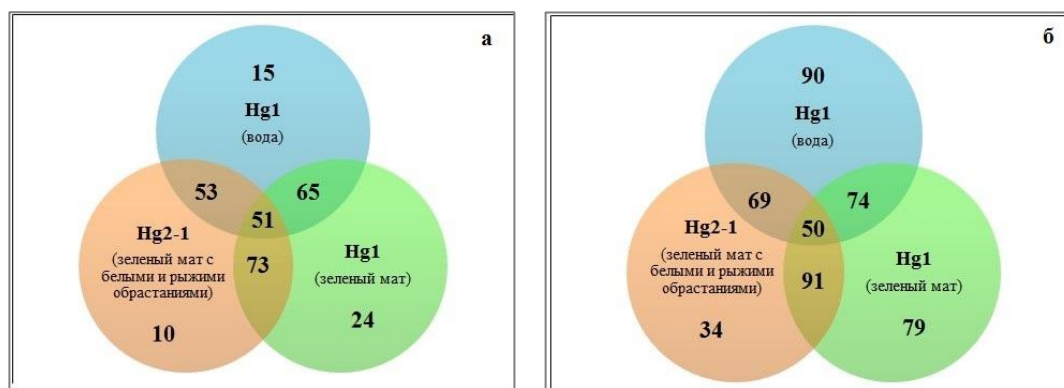


Рисунок 5. Диаграммы Венна, показывающие анализ биоразнообразия микробных сообществ источника Хойто-Гол: а – на уровне семейств; б – на уровне родов

В воде источника Хойто-Гол преобладают широко распространенные в водных экосистемах флотипы бактерий аэробных хемоорганотрофов. В микробном мате доминируют бактерии, участвующие в круговороте серы. Доминирование и разнообразие бактерий цикла серы являлось отличительной особенностью микробных матов источника Хойто-Гол, что обусловлено значительным содержанием в воде источника соединений серы, в том числе сульфидов.

Микробные сообщества источника Жойган. В микробных сообществах воды, желто-зеленого мата и ила преобладал филум *Proteobacteria* – 73,4%, 36,5%, 37,5%, соответственно (рисунок 4б). Состав субдоминантов был различным. В воде это были *Bacteroidetes* (16,4%), в микробном мате – *Firmicutes* (21,0%) и *Bacteroidetes* (16,4%). В иле, кроме представителей филума *Proteobacteria*, доминировали *Nitrospirae* (10,2%) и *Ignavibacteriae* (10,3%). Археи составили менее 0,1% водного микробного сообщества и 1,3% микробного сообщества ила и были отнесены к метанобразующим бактериям *Methanospirillum* (филум

Euryarchaeota) и аммоний-окисляющим бактериям *Nitrososphaera* и *Nitrosopumilus* (филум *Thaumarchaeota*), соответственно.

Водное микробное сообщество по составу было более разнообразным, наряду с доминирующими родами *Hydrogenophaga* (19,2%, класс *Betaproteobacteria*), *Acidovorax* (5,5%, класс *Betaproteobacteria*), *Sediminibacterium* (5,4%, класс *Sphingobacteria*) и *Gemmobacter* (5,0%, класс *Alphaproteobacteria*), свой вклад в него вносят и представители других родов. В сообществе мата доминировали органотрофные бактерии *Ignavibacterium* sp. (10,7%, класс *Ignavibacteria*), водородокисляющие бактерии *Hydrogenophaga* sp. (9,7%, класс *Betaproteobacteria*) и ацетатобразующие бактерии *Acetoanaerobium* sp. (9,4%, класс *Bacilli*). В сообществе ила преобладали хемоорганотрофные бактерии *Ignavibacterium* sp. (21,3%, класс *Ignavibacteria*) и хемолитотрофные нитрит-окисляющие бактерии *Nitrospira* sp. (21,1%, класс *Nitrospira*).

Сравнительный анализ исследуемых сообществ показал, что количество общих семейств и родов составило 60 и 65, соответственно (рисунок 6). При этом основная часть принадлежала хемоорганотрофным бактериям рода *Ignavibacterium* и *Sediminibacterium*.

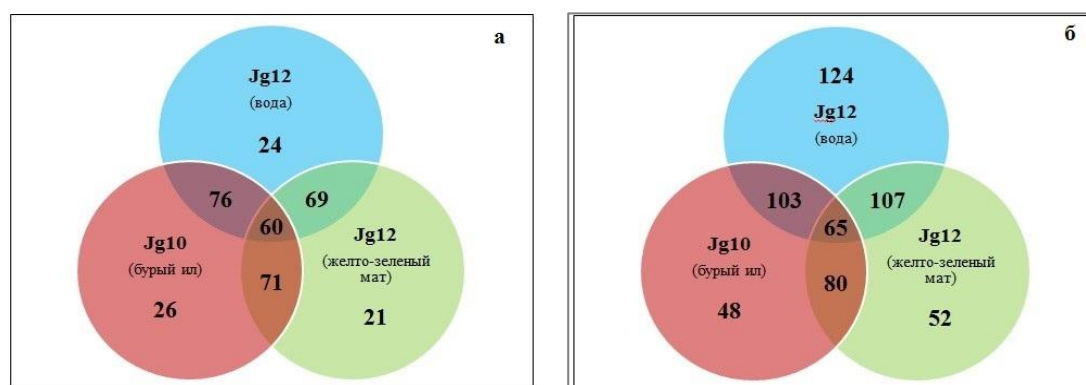


Рисунок 6. Диаграммы Венна, показывающие анализ биоразнообразия микробных сообществ источника Жойган: а – на уровне семейств; б – на уровне родов

Микробные сообщества источника Жойган обладали филогенетически и метаболически разнообразным сложным сообществом. Большое количество филогенетически разнообразных групп, из которых ни одна не доминирует, говорит о том, что это хорошо сбалансированное сложное сообщество, где каждая группа занимает свою экологическую нишу (Гумеров и др., 2011). Особенностью филогенетического разнообразия микробного сообщества источника Жойган является присутствие водород-использующих бактерий *Hydrogenophaga* sp., как возможный индикатор значительного вулканогенного влияния. Подобное предположение подтверждается сходством данных с ранее исследованными сообществами просачивающихся сильнощелочных слабоминерализованных

источников (Brazelton et al., 2012; Brazelton et al., 2013; Suzuki et al., 2013), так называемых «окон» в подземную гидросферу.

3. Выделение и характеристика бактерий минеральных источников

3.1. Характеристика аноксигенных фототрофных бактерий

Из микробных матов источников Хойто-Гол и Жойган были получены накопительные культуры и монокультуры зеленых нитчатых бактерий (ЗНБ), а также зеленых серобактерий (ЗСБ) и пурпурных несерных бактерий (ПНБ).

Зеленые нитчатые бактерии. Из матов Hg2, Hg2-3 и Jg12 было выделено 3 монокультуры нитчатых АФБ. На среде, содержащей сульфид, они образовывали колонии светло-зеленого цвета. Полученные культуры представляли собой тонкие нити с газовыми вакуолями толщиной до 5 мкм. В качестве основного пигмента бактерии содержали БХл *c*. Филогенетический анализ, основанный на сравнении нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК, показал, что штаммы Hg2-13, Hg5-13, Jg12-13 относятся к виду *Oscillochloris trichoides* (99% сходства).

Зеленые серобактерии. Полученные 3 культуры ЗСБ образовывали колонии темно-зеленого цвета, диаметром 1-2 мм и морфологически были представлены палочковидными клетками, формирующими короткие цепочки. Был обнаружен пигмент БХл *c*. При сравнении аминокислотной последовательности ФМО-протеина (*fmoA*), полученной при трансляции *in silico* фрагмента гена *fmoA*, амплифицированного из выделенной нами культуры, с референтными последовательностями, определено, что она близка к виду *Chlorobium limicola* (99% сходства).

Пурпурные несерные бактерии присутствовали в матах повсеместно, было выделено 10 чистых культур. ПНБ рода *Rhodobacter* sp. были представлены короткими овальными палочками. В анаэробной среде образовывали колонии темно-коричневого цвета, а в аэробной среде – бордового цвета. Филогенетически штаммы относятся к виду *Rhodobacter capsulatus* (100% сходства). Бактерии *Rhodomicrobium* sp. представляют собой короткие овальные палочки, размножающиеся почкованием с образованием гифоподобных тонких нитей и относятся к виду *Rhodomicrobium vannielii* (99% сходства). Два морфотипа выделенных ПНБ филогенетически были близки к видам *Rhodopseudomonas palustris* (100% сходства) и *Rps. faecalis* (99% сходства). Из проб источника Жойган также были выделены бактерии *Rubrivivax gelatinosus* (100% сходства), а из источника Хойто-Гол – *Rhodoplanes elegans* (100% сходства).

Известно, что некоторые пурпурные бактерии (*Rmi. vannielii*, *Rps. palustris*, *Chlorobium ferrooxidans* и др.) могут переключаться на «железный» фотосинтез (Widdel et al., 1993; Ehrenreich, Widdel, 1994; Heising, Schink, 1998; Heising et al., 1999; Straub et al., 1999). Способность культур к данному процессу проверяли на выделенных культурах *Rmi. vannielii* и *Rps. palustris*, при этом наблюдали образование окисных форм железа, что свидетельствует об участии АФБ в окислении железа.

3.2. Характеристика сероокисляющих бактерий

В продукции органического вещества в матах исследованных источников участвуют также сероокисляющие бактерии. Из микробных матов и илов исследуемых источников были получены 4 чистые культуры аэробных СОБ. На основании данных нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК они соответствовали виду *Thiobacillus thioparus* (99-100%). При культивировании их среда мутнела на 3-5 сутки с появлением белой пленки элементарной серы. Значение рН среды при этом снижалось до 4.

3.3. Характеристика сульфатредуцирующих бактерий

Активная роль на конечных этапах деструкции органического вещества принадлежит СРБ (Намсараев и др., 2011). Из микробных матов было выделено 2 чистые культуры и 12 активных накопительных культур СРБ. Выделенные штаммы бактерий были представлены грамотрицательными вибрионами размером 0,4-0,6×1,0-1,5 мкм (рисунок 7). Филогенетически штаммы Hg7-11 и Jg1-12 близки между собой и относятся к *Desulfovibrio alcoholivorans* (99% сходства). Данный вид впервые изолирован из природных экосистем, ранее эти бактерии были выделены из антропогенных местообитаний (Qatibi et al., 1991).

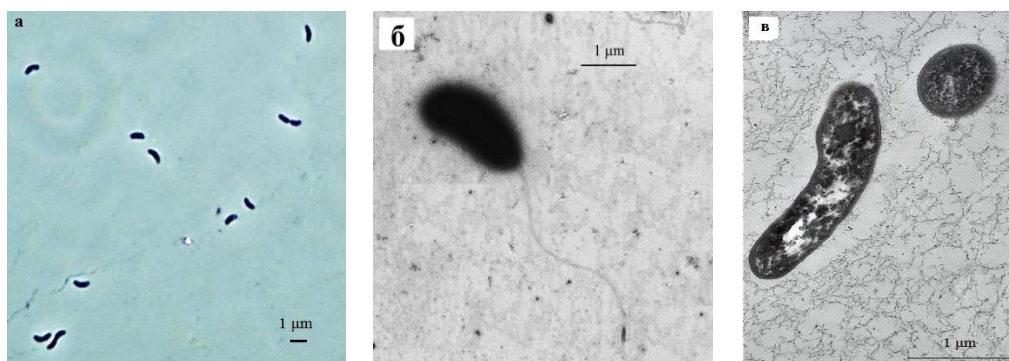


Рисунок 7.
Морфология и ультраструктура клеток штамма *Desulfovibrio alcoholivorans* (штамм Jg1-12)

3.4. Характеристика железоредуцирующих бактерий

Накопительные культуры Fe-РБ представлены подвижными палочками, три из которых были проанализированы методом ДГГЭ. Филогенетический анализ выявил доминирование грамположительных бактерий класса *Clostridia* филума *Firmicutes*. В исследованных культурах определены последовательности близкие

к последовательностям известных видов *Thermoincola ferriacetica* и *Calderihabitans maritimus*, которые обладают способностью к железоредукции (Zavarzina et al., 2007; Yoneda et al., 2013).

ВЫВОДЫ

1. Источники Хойто-Гол и Жойган относятся к субтермальным нейтральным слабоминерализованным водам, химический состав которых влиял на формирование микробных матов. В сульфидсодержащем источнике Хойто-Гол основными формообразующими бактериями микробных матов помимо цианобактерий являлись бесцветные серобактерии *Thiothrix* sp., а в железосодержащем источнике Жойган – железобактерии *Gallionella* sp.

2. Методом высокопроизводительного секвенирования впервые исследовано разнообразие микробных сообществ источников Хойто-Гол и Жойган. Основу сообщества воды и микробных матов составляли представители филумов *Proteobacteria* (до 75%), *Bacteroidetes* (до 29%) и *Firmicutes* (до 21%), внутри филумов таксономический состав варьировал.

3. В культивируемом сообществе источников Хойто-Гол и Жойган были обнаружены сульфатредуцирующие бактерии *Desulfovibrio alcoholovorans* (99% сходства), сероокисляющие бактерии *Thiobacillus thioparus* (99-100% сходства). Среди группы аноксигенных фототрофов идентифицированы зеленые нитчатые бактерии *Oscillochloris trichoides*, зеленые серобактерии *Chlorobium limicola*, пурпурные несерные бактерии *Rhodopseudomonas polustris*, *Rps. faecalis*, *Rhodobacter capsulatus*, *Rhodomicrobium vannielii*, *Rubrivivax gelatinosus*, *Rhodoplanes elegans*. Из источника Жойган получены накопительные культуры, способные к железоредукции, в которых обнаружены виды *Thermoincola ferriacetica* и *Calderihabitans maritimus*.

4. Микробное сообщество исследованных гидротерм играет значительную роль в цикле биогенных элементов. В источнике Хойто-Гол формируется сообщество с выраженным серным циклом, в источнике Жойган – филогенетически более разнообразное сообщество, чему способствуют экологические условия среды обитания. Отличительной особенностью структуры микробных сообществ источника Жойган является присутствие водород-использующих бактерий рода *Hydrogenophaga* в сообществе воды (19%) и микробного мата (10%), что может рассматриваться как индикатор глубинных геохимических процессов и свидетельствовать о влиянии подземной гидросферы.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО МАТЕРИАЛАМ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых научных изданиях из перечня ВАК при Минобрнауки России

1. **Кашкак Е.С.**, Белькова Н.Л., Данилова Э.В. Идентификация доминирующих генотипов в микробных сообществах углекислых минеральных источников Жойган (Восточный Саян) // Известия Иркутского государственного университета. Серия: Биология. Экология. – 2014. – С. 37-44.
2. **Кашкак Е.С.**, Белькова Н.Л., Данилова Э.В., Дагурова О.П., Намсараев Б.Б., Горленко В.М. Филогенетическое и функциональное разнообразие прокариот мезотермального источника Хойто-Гол (Восточный Саян, Бурятия) // Микробиология.– 2016. – Т.85. №5. – С. 555-567.
3. **Кашкак Е.С.**, Гайсин В.А., Дагурова О.П., Брянцева И.А., Данилова Э.В. Формирование и функционирование микробных матов минерального источника Хойто-Гол (Восточный Саян) // Известия Самарского научного центра РАН.– 2016. – Т.18. №2(2). – С. 397-402.
4. Татаринов А.В., Яловик Л.И., **Кашкак Е.С.**, Данилова Э.В., Намсараев Б.Б., Хромова Е.А., Хахинов В.В. Минералого-геохимические особенности бактериальных матов и травертинов термального источника Хойто-Гол (Восточный Саян) // Геология и геофизика. – 2017. – №1.

Публикации в других рецензируемых научных изданиях

1. **Кашкак Е.С.**, Осипова И.П., Данилова Э.В. Бактерии-деструкторы минеральных источников Хойто-Гол // Вестник Бурятского государственного университета. Выпуск 3. Серия: Химия, физика. – 2011. – С. 97-99.
2. **Кашкак Е.С.**, Данилова Э.В. Биохимическая характеристика целлюлозоразлагающих бактерий гидротерм Хойто-Гол // Вестник Бурятского государственного университета. Выпуск 4. Химия, физика. – 2012. – С. 73-76.
3. **Кашкак Е.С.** Сульфатредуцирующие бактерии минеральных источников Хойто-Гол // Вестник Бурятского государственного университета. Выпуск 4. Биология, география. – 2013. – С. 152-155.

Публикации в сборниках конференций

1. **Кашкак Е.С.**, Данилова Э.В., Осипова И.П. Тионовые бактерии в гидротермах Бурятии // Материалы Международной конференции «Экология и геохимическая деятельность микроорганизмов экстремальных местообитаний» (Улан-Удэ–Улаанбаатар, 5-16 сентября 2011 г). – Улан-Удэ, 2011. – С. 97-98.
2. **Кашкак Е.С.**, Данилова Э.В., Зарубина О.В. Микроэлементный состав травертинов минеральных источников Жойган // Материалы Международной конференции «Central Asian environmental problems and potential solutions» (Дархан, Монголия, 22-23 апреля 2013) – Дархан, Монголия, 2013. – С. 110-111.
3. **Кашкак Е.С.**, Данилова Э.В., Аракчаа К.Д., Хахинов В.В. Разнообразие микроорганизмов и их функциональная роль в минеральных источниках Жойган // Материалы Международной научно-практической конференции «Курортная база и природные лечебно-оздоровительные местности Тувы и сопредельных регионов» (ГУП РТ Курорт «Чедер», 17-20 июня 2013 г). – Кызыл, 2013. – С. 122-127.
4. **Kashkak E.S.**, Belkova N.L. Microbial diversity in Zhoigan hot spring (Eastern Sayan, Russia) // abstracts of the 7th International Young Scientists School «Systems biology and Bioinformatics, SBB'2015» (Novosibirsk, Russia, June 22-25, 2015). – Novosibirsk, 2015. – P. 23.