

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «БУРЯТСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ОБЩЕЙ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ БИОЛОГИИ СО РАН

На правах рукописи

КАШКАК Елена Сергеевна

**РАЗНООБРАЗИЕ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ ТЕРМАЛЬНЫХ
ИСТОЧНИКОВ ВОСТОЧНОГО САЯНА**

03.02.08 – экология (биологические науки)

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук
Данилова Э.В.

Научный консультант:
доктор биологических наук, профессор
Намсараев Б.Б.

Иркутск, 2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. МИКРОБНЫЕ СООБЩЕСТВА ЭКОСИСТЕМ МИНЕРАЛЬНЫХ ИСТОЧНИКОВ	9
1.1. Микроорганизмы и их роль в природе	9
1.2. Характеристика минеральных источников как местообитания микроорганизмов	9
1.3. Разнообразие микробных сообществ термальных минеральных источников	12
1.3.1. Микробные сообщества термальных минеральных источников	13
1.3.2. Использование методов молекулярной экологии для изучения разнообразия микроорганизмов в микробных сообществах минеральных источников	14
1.3.3. Изучение микробного разнообразия минеральных источников методами молекулярной экологии	21
1.3.4. Влияние экологических условий на формирование и развитие микробных сообществ минеральных источников	24
1.3.5. Функциональная активность микробного сообщества минеральных источников	29
1.3.6. Участие микробных сообществ минеральных источников в круговороте серы	32
1.4. Заключение к обзору литературы	43
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	45
2.1. Описание экосистем минеральных источников Восточного Саяна	45
2.2. Методы исследования	48
2.2.1. Методы отбора проб	48
2.2.2. Физико-химические методы исследования	48
2.2.3. Методы определения скорости микробных процессов	49
2.2.4. Методы учета численности и выделения основных групп микроорганизмов	50

2.2.5. Методы изучения культуральных и физиолого-биохимических свойств бактерий	54
2.2.6. Электронно-микроскопические методы	54
2.2.7. Методы изучения пигментного состава	55
2.2.8. Молекулярно-биологические методы	55
2.2.9. Методы статистической обработки результатов	57
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	58
3.1. Экологические условия среды обитания микробных сообществ минеральных источников Хойто-Гол и Жойган	58
3.2. Микробные маты минеральных источников Хойто-Гол и Жойган	61
3.3. Продукция и деструкция органического вещества в минеральных источниках Хойто-Гол и Жойган	67
3.4. Состав микробных сообществ на основании анализа последовательностей нуклеотидов гена 16S рРНК	71
3.5. Сравнительный анализ биоразнообразия микробных сообществ минеральных источников Хойто-Гол и Жойган	80
3.6. Количественный учет различных физиологических групп микроорганизмов минеральных источников Хойто-Гол и Жойган	82
3.7. Выделение и характеристика бактерий минеральных источников Хойто-Гол и Жойган	84
3.7.1. Характеристика аноксигенных фототрофных бактерий	84
3.7.2. Характеристика сероокисляющих бактерий	89
3.7.3. Характеристика целлюлозоразлагающих бактерий	91
3.7.4. Характеристика сульфатредуцирующих бактерий	94
3.7.5. Характеристика железоредуцирующих бактерий	98
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	101
ВЫВОДЫ	103
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	105
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	106
СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА	130

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности. Термальные минеральные источники являются местами обитания уникальных популяций микроорганизмов, которые развиваются под влиянием подземных вод. Исследование разнообразия микробных сообществ гидротермальных местообитаний с применением молекулярно-генетических методов расширяет представления о физико-химических границах существования и функционирования живых систем, дает возможность определить предполагаемые физиологические и метаболические стратегии микроорганизмов и их экологическую роль, и представляет особый интерес для поиска микроорганизмов, имеющих высокий биотехнологический и биомедицинский 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 современного и молодого четвертичного 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 минеральных источников с температурой воды 20–40°C, выходы которых приурочены к областям молодого вулканизма. Исследования микробных сообществ минеральных источников в данном регионе немногочисленны и основаны на использовании классических микробиологических методов. В микробных матах и осадках были охарактеризованы продукционные и деструкционные процессы (Данилова и др., 2001; Данилова и др., 2009), выделена и описана новая сероокисляющая бактерия *Thiobacillus sajanensis* sp. nov. (Дульцева и др., 2006), показано участие бактерий в минералообразовании (Татаринов и др., 2006; 2010). Разнообразие микробных

сообществ молекулярно-генетическими методами до настоящего времени не изучено.

Целью настоящей работы было изучение филогенетического и функционального разнообразия микробных сообществ 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 методом высокопроизводительного секвенирования.

3. Выделить культуры бактерий различных функциональных групп: аноксигенных фототрофных бактерий, аэробных сероокисляющих бактерий, сульфат- и железоредуцирующих бактерий, и идентифицировать их на основе полифазной таксономии.

4. Дать характеристику структуры микробных сообществ и оценить роль микроорганизмов в круговороте биогенных элементов.

Научная новизна работы. Впервые с использованием молекулярно-генетических методов охарактеризовано видовое разнообразие культивируемого и некультивируемого микробного сообщества гидротерм Восточного Саяна. Впервые из исследуемых гидротерм выделены чистые культуры сульфатредуцирующих, сероокисляющих и аноксигенных фототрофных бактерий. Сульфатредуцирующие и сероокисляющие бактерии отнесены к ранее описанным видам *Desulfovibrio alcoholivorans* (99% сходства) и *Thiobacillus thioparus* (99-100% сходства), соответственно. Штаммы *D. alcoholivorans* впервые выделены из природных экосистем. Аноксигенные фототрофные бактерии (АФБ) идентифицированы как представители родов *Oscillochloris*, *Chlorobium*, *Rhodopseudomonas*, *Rhodobacter*, *Rhodomicrobium*, *Rhodoplanes* и *Rubrivivax*. Впервые из гидротерм Байкальской рифтовой зоны получены активные

накопительные культуры, состоящие из бактерий *Thermincola ferriacetica* и *Calderihabitans maritimus*, которые обладают способностью к железоредукции.

Теоретическая и практическая значимость работы. Выделенные штаммы бактерий могут быть использованы в биотехнологии, в частности в процессах биоремедиации загрязненных территорий. Свыше 300 тыс. последовательностей 16S рРНК бактерий были получены в результате пиросеквенирования и внесены в мировую базу данных NCBI, что имеет практическое значение для сравнительного анализа микроорганизмов из различных водных экосистем. Полученные результаты также могут быть использованы в соответствующих разделах учебных пособий по экологии и микробиологии в высших учебных заведениях.

Работа выполнена при финансовой поддержке Интеграционных проектов СО РАН №5; №95; грантов Минобрнауки России (№ 6.1990.2014/К; № 14.575.21.0067), РФФИ (гранты №№ 12-04-90853-мол_рф_нр, 14-34-50176-мол_нр), Председателя Правительства Республики Тыва; Бурятского госуниверситета для поддержки молодых ученых и 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 значимая роль принадлежит филумам *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* и *Firmicutes*. В источниках Хойто-Гол и Жойган состав доминирующих фило типов на уровне семейства и рода отличается.

2. Видовой состав культивируемых микроорганизмов круговорота серы (аэробных сероокисляющих, сульфатредуцирующих бактерий, а также аноксигенных фототрофных бактерий) в микробных матах минеральных источников сходен.

3. В сульфидсодержащих гидротермах Хойто-Гол цикл серы активно 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, в том числе 4 работы в периодических изданиях из Перечня ВАК при Минобрнауки России.

Результаты исследований были доложены и обсуждены на следующих 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. Диссертационная работа изложена на _____ страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, заключения, выводов, списка цитируемой литературы, включающего _____ наименований и приложения. Диссертация содержит _____ таблиц и _____ рисунков.

Список сокращений, используемых в работе: 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, ОТЕ – операционная таксономическая единица.

Благодарности. Работа посвящена светлой памяти учителя и руководителя Намсараева Б.Б. Автор выражает глубокую благодарность научному руководителю к.б.н. Даниловой Э.В., д.б.н., проф. Горленко В.М., д.б.н. Т.В. Хижняк, к.б.н. О.П. Дагуровой, к.б.н. Н.Л. Бельковой, к.б.н. С.В. Зайцевой, д.х.н. В.В. Хахинову, к.б.н. Д.Д. Бархутовой, к.б.н. С.Н. Гаврилову, к.б.н. К.Д. Аракчаа, В.А. Гайсину и всем сотрудникам и аспирантам лаборатории микробиологии ИОЭБ СО РАН и лаборатории экологии и геохимической деятельности микроорганизмов ИНМИ РАН за помощь и поддержку.

ГЛАВА 1. МИКРОБНЫЕ СООБЩЕСТВА ЭКОСИСТЕМ МИНЕРАЛЬНЫХ ИСТОЧНИКОВ

1.1. Микроорганизмы и их роль в природе

Микроорганизмы являются многочисленными обитателями биосферы, занимающими все доступные для жизни уголки планеты. Повсеместное распространение микроорганизмов обусловлено их малыми размерами, позволяющими легко переноситься с потоками воды и воздуха, разнообразием и гибкостью метаболизма, устойчивостью к неблагоприятным факторам среды (Экология микроорганизмов, 2013).

Микроорганизмам принадлежит ключевая роль в поддержании жизни на Земле. В совокупности они составляют основную часть биомассы на Земле, и им принадлежит активная роль в превращениях органических и неорганических соединений в окружающей среде. Способность микроорганизмов использовать и разлагать всевозможные природные материалы и промышленные отходы предопределяет их чрезвычайно важную роль в экологических процессах. Бактерии участвуют в круговороте питательных веществ, в связывании атмосферного азота, который обеспечивает азотное питание растений, расщеплении макромолекул в пищеварительном тракте человека и животных, очистке сточных вод, в биотехнологии и медицине (Moriarty, 1997; Gray, 2004; Современная биология, 2005; Lopez-Lopez et al., 2013; Zhivetev et al., 2015).

1.2. Характеристика минеральных источников как местообитания микроорганизмов

Минеральные источники, в частности гидротермы, как экстремальные местообитания микроорганизмов, в настоящее время являются одними из интереснейших объектов исследования. Термальные источники представляют собой уникальные ниши для формирования специфического биоценоза термофильных микроорганизмов и могут служить в качестве источников выделения новых термофильных микроорганизмов с биотехнологическим

потенциалом. Структура и функциональное разнообразие микробного сообщества минеральных источников во многом зависят от физико-химических параметров воды и пород: температуры, освещенности, кислотности среды, окислительно-восстановительного потенциала, концентрации кислорода, количества растворенных газов и питательных веществ, мощности и структуры донных отложений и др. (Заварзин, 1984; Громов, Павленко, 1989 и др.).

Минеральные воды классифицируются по различным признакам: температуре, рН, анионно-катионному и газовому составу, а также по геологическим условиям формирования (Перельман, 1972; Посохов, 1975; Басков, Суриков, 1989). По составу газов и мощности температурного потока минеральные источники подразделяются на углекислые, азотные, метановые, азотно-углекислые, сероводородно-углекислые, водородные.

Углекислые воды – природные минеральные воды, имеющие различный ионный состав, минерализацию и температуру, и содержащие более 0,5 г/дм³ растворенного углекислого газа. Углекислые источники с преобладанием (98%) CO₂ в газовой фазе распространены обычно в районах современной или недавно угасшей вулканической деятельности (Посохов, Толстихин, 1977; Заварзин, 1984; Крайнов и др., 2012).

Азотные термальные воды с преобладанием азота в составе спонтанного газа (95-98 об.%) образуются в зонах глубоких тектонических в молодых сейсмических областях и приурочены к массивам изверженных пород любого возраста и состава всегда вне участков проявления активного вулканизма (Посохов, Толстихин, 1977; Заварзин, 2014).

Азотно-углекислые термы распространены в наиболее высокотемпературных гидротермальных районах современного вулканизма. Они отличаются от азотных терм присутствием до 80 об.% CO₂, а от углекислых – большим тепловым потенциалом, и разгружаются на поверхности в виде парогазовых и пароводяных смесей. Они характеризуются сложным анионным составом, преобладанием натрия среди катионов. В формировании этих

гидротерм в Исландии участвуют мантийные эманации (Посохов, Толстихин, 1977; Заварзин, 1984).

Сероводородно-углекислые минеральные воды пространственно и генетически связаны с выходами вулканических газов и наблюдаются в кратерах, кальдерах и подводных вулканах. Эти воды газифицируются углекислым газом и сероводородом. Формирование вод этой группы происходит под непосредственным воздействием современных вулканических процессов (экзгаляций). Именно эти термы дают начало яркому процессу формирования месторождений вулканогенной серы со следующим за ним биогенным серноокислотным выщелачиванием (Посохов, Толстихин, 1977; Заварзин, 2014).

Водородные термы представляют специфическую черту гидротермальной деятельности в Исландии. Содержание свободного водорода достигает 64%. Остальные компоненты представлены сероводородом, углекислотой, а также азотом, инертными газами, метаном. Такой состав газов характерен и для фумарол многих действующих вулканов, причем содержание водорода возрастает в периоды вулканической деятельности. За пределами Исландии такие водородные термы почти отсутствуют (Заварзин, 2014).

В гидротермальных источниках развиваются уникальные сообщества живых существ, которые образованы в основном прокариотами – бактериями и археями. Подавляющее большинство микроорганизмов, входящих в состав микробных сообществ термальных источников, не встречаются в других местах (Грабович, 1999). Микробная жизнь на термальных площадках определяется либо использованием глубинных экзгаляций в прямых трофических цепях, либо сложным циклическим механизмом, который определяется микробным сообществом, включающим фотоавтотрофные микроорганизмы. В местах выхода газов может развиваться микробное сообщество, использующее не продукты разложения органического вещества, синтезированного другими организмами, а поток глубинных экзгаляций. Из глубинных экзгаляций они используют преимущественно углекислоту (Заварзин, 1984).

Аэробные микробные сообщества способны к окислению восстановленных вулканических газов (водорода, соединений серы, аммиака). Исключение составляет метан, для которого пока не найдено соответствующих термофильных бактерий – катализаторов окисления (Заварзин, 2014).

Восстановительная обстановка в термальных источниках способствует развитию анаэробных микроорганизмов, не зависящих от фотосинтетического кислорода и способных использовать как энергетический субстрат газы, образующиеся абиогенным путем в высокотемпературных реакциях. В большинстве случаев они принадлежат к архебактериям. Основными продуктами их обмена являются метан и сероводород, фотохимически неустойчивых в атмосфере. Перечень хемолитотрофных микроорганизмов показывает, что субстраты их обмена хорошо совпадают с основными газообразными продуктами вулканических эксгаляций (H_2 , CO , NH_3 , CH_4 , H_2S , S^0 , N_2), состав которых определяется установлением химического равновесия перегретых вод с изверженными алюмосиликатными породами (Заварзин, 2014).

1.3. Разнообразие микробных сообществ термальных минеральных источников

Термальные источники были исследованы еще в середине XIX века, но изоляцию и изучение их термофильных микроорганизмов не начали до 1950-х годов. После этого были обнаружены многие термофильные микроорганизмы и вирусы, но реальное разнообразие термальных сообществ было изучено, когда возникли исследования, основанные на ПЦР амплификации генов 16S рРНК. Вследствие этого, возможности клонирования и секвенирования общей экологической ДНК, определяемой как метагеном, и изучение генов дало возможность получить более полное представление о микробных сообществах, их разнообразии, структуре, взаимодействиях, существующих между их компонентами и факторами, определяющими характер этих сообществ (Lopez-Lopez et al., 2013). Последнее быстрое развитие событий в области молекулярной экологии, метагеномики и экологического моделирования показывают, что

микроорганизмы представляют собой наиболее важную биологическую группу на Земле с точки зрения филогенетического и функционального разнообразия.

1.3.1. Микробные сообщества термальных минеральных источников

Микробное сообщество представляет совокупность взаимодействующих между собой функционально различных микроорганизмов. Основу связей в сообществе, объединяющих его в единое целое, представляют трофические связи, обусловленные образованием и использованием веществ микроорганизмами. Сообщество микроорганизмов функционирует как единое целое с кооперативными трофическими связями, определяющими план химических взаимодействий (Заварзин, 2003). Из имеющегося набора функционально сходных организмов доминируют те из них, чьи кинетические характеристики более всего соответствуют условиям, складывающимся в сообществе. Формирование различных типов микробных сообществ в минеральных источниках определяются физико-химическими параметрами окружающей среды, такими, как температура, pH, освещение, содержание сероводорода и сульфидных ионов и другие (Намсараев и др., 2011).

Микробные сообщества термальных источников представляют значительный интерес с точки зрения эволюции биосферы как аналоги сообществ, доминировавших на ранних этапах развития жизни на Земле (Заварзин, 2001, 2011; Walter et. al., 1998; Nisbet, Sleep, 2001). Микробные сообщества минеральных источников могут обладать значительной биомассой и образовывать так называемые микробные маты (Franks, Stolz, 2009).

Микробные маты представляют собой автономные сообщества с тесным взаимодействием трофических групп, где присутствуют и продукционная ветвь углеродного цикла, осуществляемая фототрофными бактериями, и деструкционная ветвь, осуществляемая различными группами бактерий. Эдификатором, или формообразующим компонентом, этих сообществ обычно служат цианобактерии (Заварзин, 2003). Основными первичными продуцентами в микробных матах могут быть фотоавтотрофы (например, цианобактерии,

пурпурные фототрофы, зеленые фототрофы) или хемолитоавтотрофы (например, бесцветные сероокисляющие бактерии). Анаэробные фототрофы могут преобладать в органических богатых средах, которые поддерживают высокий уровень дыхания. Эти сообщества являются динамическими системами, проявляющими пространственную и временную неоднородность (Franks, Stolz, 2009).

Микробные маты стали излюбленным объектом изучения взаимодействия разных трофических групп микроорганизмов. Минеральные источники были предложены в качестве модельных местообитаний для изучения закономерностей формирования и функционирования микробных матов (Miller et al., 2009). Формирование микробных матов определяется многими факторами, такими, как температура, pH, освещение, содержание сероводорода, химический состав воды; расстояние от выхода источника также может влиять на сукцессию микроорганизмов (Skirnisdottir et al., 2000; Everroad et al., 2012).

1.3.2. Использование методов молекулярной экологии для изучения разнообразия микроорганизмов в микробных сообществах минеральных источников

Идентификация и характеристика микробных сообществ в различных экосистемах ранее были ограничены культивируемыми видами. Общеизвестно, что до 99,9% микроорганизмов, присутствующих во многих природных средах обитания, относятся к некультивируемым, и поэтому не доступны для использования в биотехнологии или фундаментальных исследований (Amann et al., 1995). Классическими методами культивирования и получения чистых культур микроорганизмов выделяются преимущественно хорошо адаптированные к условиям культивирования или хорошо растущие организмы, а некультивируемые организмы остаются неизвестными (Rappe, Giovannoni, 2003; Gilbride et al., 2006). Получение чистых культур, их поддержание, изучение физиолого-биохимических свойств, идентификация с использованием

традиционных методов и подходов занимают много времени и материальных затрат.

В последнее время благодаря применению современных молекулярно-биологических методов, стало возможно провести подробные оценки биоразнообразия прокариот в природных образцах, структуры и динамики культивируемых и некультивируемых микробных сообществ, намного шире узнать их качественный и количественный состав, экологию и физиологию, анализировать сложные геномы микробных ниш, развитие новых форм биологических систем и открытие новых функций, которые могли бы эксплуатироваться в биотехнологических и биомедицинских целях (Современная микробиология, 1999; Streit, Schmitz, 2004; Alsop et al., 2014).

В настоящее время существуют различные молекулярно-биологические методы изучения микробного разнообразия и функциональности в окружающей среде. Эти методы основаны на характеристике клеточных компонентов, таких как нуклеиновые кислоты, белки, жирные кислоты и других таксонов специфических соединений (Rossello-Mora, Amann, 2001). Краткая характеристика основных методов, применяемых для исследования и описания микробного разнообразия, приведена в таблице 1. В настоящее время нет ни одного метода, который может адекватно описать все микробное разнообразие. Каждый метод имеет свои недостатки в связи с внесением смещений для исследования микробного разнообразия.

Молекулярно-биологические методы исследования часто требуют знания последовательности нуклеотидов в молекуле ДНК. Для определения нуклеотидной или аминокислотной последовательности биополимеров проводится их секвенирование. Все известные методы секвенирования делят на классические и нового поколения. К классическим методам секвенирования относят методы Сэнгера-Коулсона («плюс-минус» метод), Максама-Гилберта (метод химической дегградации), Сэнгера (метод дидезоксинуклеотидов) и другие.

Химический метод Максама-Гилберта наиболее подходит для секвенирования коротких олигонуклеотидов.

Таблица 1

Краткая характеристика молекулярно-биологических методов, основанных на характеристике клеточных компонентов
(по Keer, Birch, 2003; Dorigo et al., 2005; Malik et al., 2008)

Метод	Сущность метода	Применение	Недостатки
БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ			
Определение фосфолипидов жирных кислот (Phospholipids fatty acids, PLFA)	Фосфолипидные производные жирных кислот (PLFA) широко используются в микробной экологии в качестве хемотаксономических маркеров бактерий и других организмов	описание структуры сообщества и физиологического состояния определенных микробных популяций	Изменение жирно-кислотного состава клетки в зависимости от температуры и количества питательных веществ; большое количество общих жирных кислот у различных микроорганизмов
МЕТОДЫ, СВЯЗЫВАЮЩИЕ МИКРОБНУЮ ИДЕНТИЧНОСТЬ ЭКОЛОГИЧЕСКОЙ ФУНКЦИИ			
Зондирование стабильными изотопами (Stable isotope probing, SIP)	Определение на основе усвоения микроорганизмами субстрата, включающего в себя стабильные изотопомеченные биомаркеры, рРНК и ДНК	Характеристика и идентификация микробных популяций, участвующих в метаболических процессах окружающей среды, с целью выяснения непосредственного связывания микробной филогении с функцией	отсутствие чувствительности; уклон обогащения не может отражать метаболизм субстрата в среде
Зондирование обратного генома (Reverse sample genome probing, RSGP)	выделение хромосомной ДНК в чистой культуре из стандартных видов микроорганизмов с последующей перекрестной гибридизацией	Идентификация и характеристика бактерий	Не подходит для среды, где предварительное выделение чистой культуры так и не произошло
Технология микрочипов (Microarray technologies)	Определение взаимодействий тех или иных лигандов с множеством различных зондов одновременно	Идентификация организма и определение его экологической роли	Неспецифическая гибридизация может дать ложные сигналы; отсутствие специфичности, чувствительности и количественного определения
МЕТОДЫ, ОСНОВАННЫЕ НА ГИБРИДИЗАЦИИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ			
Обычная, мультиплексная и количественная ПЦР (Simple, multiplex and real-time PCR)	Множественное увеличение (амплификация) малых концентраций определённых фрагментов нуклеиновой кислоты (ДНК) в образце	Амплификация и количественное определение интересующего гена, специфической последовательности ДНК в образце	Наличие ингибиторов ПЦР-реакции, неспецифический отжиг праймера, артефактный праймер и загрязнение ДНК

МЕТОДЫ НА ОСНОВЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ			
Рестрикционный анализ амплифицированной рибосомных ДНК (Amplified ribosomal DNA restriction analysis, ARDRA)	обработка ДНК рестрикционными ферментами (специфическими эндонуклеазами - рестриктазами), разрезающими молекулу ДНК по определенным последовательностям нуклеотидов	Простой метод для идентификации микроорганизмов и экологических исследований	Пептидная карта микробного сообщества находится под сильным влиянием рестриктаз и невозможно определить конкретные филогенетические группы внутри сообщества пептидных карт
Денатурирующий градиентный / температурный гель-электрофорез (ДГГЭ/ ТГГЭ, Denaturing gradient/temperature gradient gel electrophoresis, DGGE/TGGE)	Электрофоретическое разделение фрагментов ДНК, основанное на различиях в их подвижности при возрастании денатурирующих условий, вызываемых линейным градиентом химических денатурантов (формамида и мочевины) или линейным градиентом температуры	Профиль микробных сообществ и выявление популяций путем вырезания и секвенирования полос используется для быстрого скрининга мутаций и анализа микробных популяций.	Ограничение фрагментов в размере до 500 п.о. и разделение на основе различий в составе последовательности, а не по длине; разделение относительно небольших последовательностей (до 500 п.н. фрагментов 16S рРНК); существование неоднородности в 16S рРНК в некоторых организмах и могут образоваться на гелях несколько полос для одного вида
Анализ рибосомных межгенных вставок (Ribosomal intergenic spacer analysis, RISA)	Метод, основанный на ПЦР, который амплифицирует участок между 16S и 23S рРНК оперонами	Область межгенного спейсера, в зависимости от вида, имеет вариабельность последовательности и длины (50-1500 п.н.), что облегчает таксономическую идентификацию организмов	Он имеет относительно небольшую базу данных для полной идентификации некультивируемых организмов
Полиморфизм длин терминальных рестрикционных фрагментов (ПДРФ; Terminal-restriction fragment length polymorphism, T-RFLP)	Способ исследования геномной ДНК, путём расщепления ДНК рестрикционными ферментами и дальнейшего анализа путём гель-электрофореза размеров образующихся фрагментов (рестриктов)	Возможность высокой пропускной способности и количественной оценки микробного сообщества	Для описания микробной популяции необходимо несколько рестрикционных ферментов (рестриктаз)

Секвенирование по Сэнгеру основано на использовании дидезоксинуклеозидтрифосфатов (2',3'-dideoxy and arabinonucleoside analogues of the normal deoxynucleoside triphosphates) (Sanger et al., 1977). Одним из условий для определения последовательности ДНК по Сэнгеру является то, что секвенируемая ДНК должна быть в одноцепочечной форме. Метод Сэнгера является простым и элегантным и имитирует во многом природную способность ДНК-полимеразы удлинять растущую нуклеотидную цепь, используя исходную матрицу (Принципы и методы биохимии и молекулярной биологии, 2013). Секвенирование по Сэнгеру до сих пор является основным методом секвенирования и используется в несколько модифицированном виде, но его в настоящее время вытесняют другие методы секвенирования нового поколения.

Большой спрос на дешевый и быстрый метод секвенирования приводит к развитию многочисленных новых методов секвенирования. Методы секвенирования нового поколения (next generation sequencing, NGS) произвели революцию в геномных и генетических исследованиях. Секвенирование нового поколения позволяет одновременно прочесть сразу несколько участков генома, что является важным отличием от более ранних методов секвенирования. К методам секвенирования нового поколения относятся: Roche 454 (Roche 454 Секвенирование), Illumina (Illumina Inc.), SOLiD (Applied Biosystems), Polonator (Applied Biosystems), Helicos (Helicos BioScience Corporation), Pacific Biosciences (Pacific Biosciences) и Intelligent Bio Systems (Intelligent Bio Systems) и другие (таблица 2) (Shendure, Ji, 2008; Ledergerber, Dessimoz, 2010; Quail et al., 2012, Liu et al., 2012; Курильщикова и др., 2012). Существенное снижение затрат и существенное увеличение пропускной способности и точности методов привели к быстрому прогрессу технологий секвенирования ДНК. Все больше и больше организмов были просеквенированы, с каждым днем увеличивая поток генетических данных. Прогресс в области геномики неуклонно движется вперед благодаря революции в технологиях секвенирования, масштабные исследования которых имеют большое значение, как для фундаментальных исследований, так и прикладных разработок.

Метагеномика. С развитием методов секвенирования нового поколения получил в последнее время широкое развитие метагеномный анализ, который позволил всесторонне анализировать микробные сообщества в различных экосистемах, начиная от океанов до микробиома человека. Термин «метагеномика» (“Metagenomics”) был впервые введен Хандельсманом и его коллегами в их исследовании природных продуктов из почвенных микроорганизмов (Handelsman, 2004). Метагеномные исследования могут быть сгруппированы в четыре категории, основанные на различных методах скрининга. К ним относятся метод дробовика (shotgun analysis) с использованием массового секвенирования геномов; исследования геномных активностей, направленных на поиск конкретных микробных функций; исследования геномной последовательности с использованием филогенетического или функционального анализа экспрессии генов; методы секвенирования следующего поколения для определения всего содержания генов в образцах окружающей среды (Riesenfeld et al., 2005; Edwards et al., 2006; Turnbaugh et al., 2006; Cox-Foster et al., 2007; Biddle et al., 2008; Shendure, 2008; Narismendy et al., 2009; Palenik et al., 2009).

Метагеномный анализ включает несколько стадий (рисунок 1). Образцы из различных источников (океана, почвы, горячих источников, ледников, кислых сред, клещей и образцов кожи и кала человека) обрабатываются для экстракции полной ДНК и для амплификации микробных последовательностей. Извлеченное ДНК затем обрабатывается для метагеномного анализа, который состоит из следующих этапов: секвенирование; биннинг последовательностей; аннотация последовательностей; таксономическая классификация микробных видов; статистический анализ метагеномных данных; хранение данных в центральных метагеномных базах данных (Neelakanta, Sultana, 2013). Метагеномика преследует две основные цели: выявление новых биокаталитических генов и расширяет наши познания в области микробного разнообразия, микробной экологии и эволюции (Streit, Schmitz, 2004).

Таблица 2

Методы секвенирования нового поколения (по Quail et al., 2012, Liu et al., 2012, Курильщикова и др., 2012)

Название метода	Принцип работы	Преимущества	Недостатки	Применение
Roche/454 Life Sciences (пиросеквенирование)	последовательный синтез методов эмульсионного ПЦР и пиросеквенирования	длина прочтённых геномных участков; скорость	стоимость; погрешность	для повторного секвенирования или секвенирования геномов, для которых известна последовательность нуклеотидов родственного вида
Illumina-SOLEXA (секвенирование путем синтеза)	использует прикрепленные к микросферам единичные молекулы ДНК	эффективность и стоимость	скорость; дорогие реагенты; длительность прогона	определение последовательности мРНК и анализирование полного транскриптома клетки
Helicos (одномолекулярное секвенирование единичных молекул)	после клональной амплификации образца происходит фрагментация ДНК с последующим полиаденированием на 3'-конце с дальнейшим секвенированием, чередующимся с промыванием образцов нуклеотидами с флуоресцентной меткой	длина прочтённых геномных участков; скорость	низкая производительность при желаемой малой погрешности; стоимость	секвенирование фрагментов генома, всего генома различных организмов, ДНК из костей древних животных; прямое РНК-секвенирование; секвенирование индивидуальных геномов при исследовании различных генетических заболеваний
IonTorrent (ионное полупроводниковое или pH-индуцированное секвенирование)	детекция протонов, которые получаются при синтезе цепи ДНК как побочный продукт, с изменением pH раствора	стоимость; скорость	погрешность; низкая производительность	целевое секвенирование, секвенирование микробных геномов, микробного транскриптома, ампликонов или для проверки качества секвенирования библиотек
SOLiD (секвенирование коротких чтений на основе лигирования)	фрагменты ДНК лигируются на олигонуклеотидные адаптеры, прикрепленные к шарикам, далее они амплифицируются с помощью эмульсионной ПЦР	стоимость; возможность использовать часть дорожек	скорость; короткие чтения	нуклеосомное позиционирование, транскрипционный профайлинг или цепь-специфичном RNA-Seq, транскрипционный профайлинг в единичной клетке и пиросеквенирование человеческого генома
Pacific Biosciences (одномолекулярное секвенирование в реальном времени)	определение последовательности ДНК за счет наблюдения за работой единичной молекулы ДНК-полимеразы в реальном времени	длина прочтенных геномных участков; секвенирование без предварительной ПЦР амплификации	стоимость; погрешности	идентификация организмов в смешанных популяциях, например в микробиоме; автоматическая расшифровка бактериальных геномов

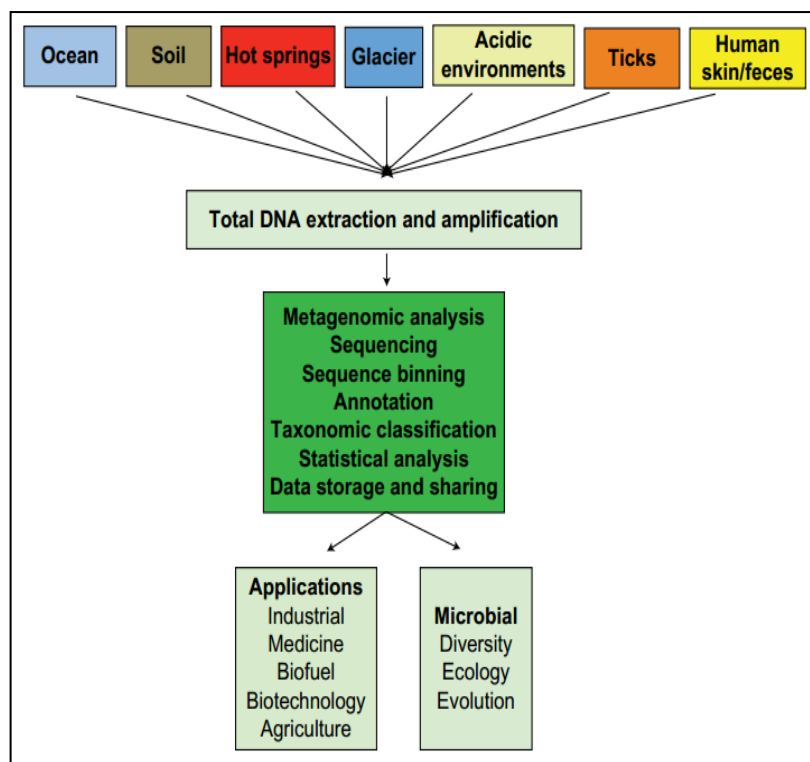


Рисунок 1. Схематическое представление метагеномного анализа (Neelakanta, Sultana, 2013)

1.3.3. Изучение микробного разнообразия минеральных источников методами молекулярной экологии

Микроорганизмы являются самыми распространенными биологическими организмами, встречающимися в биосфере. Полное представление микробного разнообразия в биосфере до недавнего времени не возможно было из-за ограничений в методах культивирования. Молекулярно-генетические методы, основанные на сравнении последовательностей генов 16S рРНК с использованием метагеномного подхода, выявили культивируемое и некультивируемое разнообразие прокариот природных экосистем. Молекулярно-генетические методы широко используются для описания микробных сообществ в термальных источниках и идентификации новых термофильных микроорганизмов, начиная с середины 1990-х годов (Lopez-Lopez et al., 2013).

Каждый минеральный источник отличается от других температурой, химическим составом и градиентами температуры или света. Термальные источники состоят из нескольких местообитаний, таких как вода, микробные

маты, донные осадки и термальные флюиды. Такое разнообразие мест обитания предоставляет большое количество мест для отбора проб с потенциальным интересом для метагеномного анализа. Увеличение числа сообщений об изучении микробного разнообразия минеральных источников упрощает понимание того, какие физико-химические условия и биологические взаимодействия формировали эти микробные сообщества в их конкретных условиях (Lopez-Lopez et al., 2013).

В воде источника Заварзина, расположенного в кальдере вулкана Узон, Камчатка (с температурой около 60°C, нейтральным pH и высоким содержанием серы) с помощью пиросеквенирования фрагментов гена 16S рНК было выявлено около 95% микроорганизмов домена *Bacteria* и менее 5% микроорганизмов домена *Archaea* (Гумеров и др., 2011). Среди бактерий преобладали представители филумов *Aquificae* (32,3% всех последовательностей 16S рНК), *Proteobacteria* (20,6%), *Deferribacteres* (12,2%), *Thermodesulfobacteria* (7,3%), *Thermotogae* (6,3%), *Deinococcus-Thermus* (4,4%) и другие, ближайшие культивируемые виды которых относились в основном к термофильным организмам. Среди архей были обнаружены представители четырех филумов *Crenarchaeota* (50% от всех архейных последовательностей), *Euryarchaeota* (42%), *Korarchaeota* (7,5%) *Nanoarchaeota* (0,5%). В целом, источник Заварзина характеризуется очень высоким разнообразием обитающих в нем термофильных прокариот, участвующих в хемолитотрофной продукции органического вещества. Хемолитотрофная продукция может осуществляться в аэробных или микроаэрофильных условиях за счет окисления серы и ее восстановленных соединений (*Sulfurihydrogenibium*, *Thiofaba*), а в анаэробной зоне – за счет окисления водорода с использованием в качестве акцептора электронов серы (*Thermosulfidibacter*, *Caldimicrobium*, *Thiomonas*). Доля хемолитоавтотрофных бактерий составляет около половины всех микроорганизмов. Образующая автотрофами органика может использоваться разнообразными органотрофными микроорганизмами, в число которых входят как бактерии-броидильщики (*Fervidobacterium*, *Dictyoglomus*, *Caldisericum*), так и организмы, осуществляющие анаэробное дыхание с использованием серы или нитрата в качестве акцептора

электронов (*Desulfurella*, *Thermus*, *Calditerrivibrio*). В микробном сообществе источника не наблюдается абсолютное доминирование какой-либо одной группы микроорганизмов, что обусловлено как сравнительно умеренными значениями температуры и pH, так и разнообразием процессов первичной продукции органических веществ. 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. Такое сообщество может рассматриваться как модель первичных экосистем древней Земли и служить объектом дальнейших более детальных исследований (Гумеров и др., 2011).

В микробном сообществе отложений термоацидофильного источника (70°C, pH 3,5-4,0) возле вулкана Мутновский и термального источника (81°C, pH 7,2-7,4) возле кальдеры Узон (Камчатка) также были обнаружены представители доменов *Bacteria* и *Archaea*. Наиболее распространенными среди них были представители *Thaumarchaeota*, *Thermotogae* и *Proteobacteria*. В отложениях термального источника Мутновский доминировали представители родов *Kosmotoga* и *Acidithiobacillus*, а в отложениях источника Кальдера Узон преобладали некультивируемые представители семейства *Enterobacteriaceae*. Остальные последовательности генов 16S рРНК принадлежали к *Aquificae*, *Dictyoglomi*, *Euryarchaeota*, *Korarchaeota*, *Thermodesulfobacteria*, *Firmicutes* и некоторым потенциально новым филумам. Таким образом, в отложениях термальных источников Камчатки функционирует термофильное микробное сообщество, играющее важную роль в круговороте биогенных элементов, в частности азота (Wemheuer et al., 2013).

Методом пиросеквенирования в составе микробного мата гидротермы Алла (Байкальская рифтовая зона, Бурятия) (65°C, pH 9,7) было обнаружено 16 филумов с доминирующими таксонами *Deinococcus-Thermus* (45,2% всех последовательностей 16S рРНК), *Nitrospirae* (36,2%), *Atribacteria* (OP9, 9,8%), *Proteobacteria* (2,5%), *Chloroflexi* (2,5%) и *Firmicutes* (1,8%). Вклад остальных групп не превышал 2%. Анализ функциональной активности выявленных

таксономических групп микроорганизмов показал, что в микробном мате источника Алла функционирует термофильное хемоорганотрофное сообщество (Раднагуруева и др., 2016).

В щелочных гидротермах Байкальской рифтовой зоны Сея (Бурятия) и Цэнхэр (Монголия) с помощью метода пиросеквенирования было изучено бактериальное разнообразие микробных матов (Lavrentieva et al., 2014). В микробном сообществе аноксигенного фототрофного мата источника Сея (50°C, pH 9,7, H₂S 2,7 мг/л) были обнаружены представители 16 филумов, среди которых доминировали *Chloroflexi* (76,5%), *Proteobacteria* (8,7%), *Deinococcus-Thermus* (4,5%). Таксономический состав цианобактериального мата гидротермы Цэнхэр был более разнообразен и включал в себя 29 филумов с доминированием *Cyanobacteria* (33%), *Proteobacteria* (23%), *Chloroflexi* (16%), *Bacteroidetes* (6,9%), *Clorobi* (4,3%) и *Armatimonadetes* (4,3%). Метагеномной анализ бактериальных сообществ термальных минеральных источников Бурятии показал, что состав и таксономическое разнообразие микробных сообществ различен и, скорее всего, зависит от физико-химических условий окружающей среды. Установлено, что первичная продукция органического вещества в исследуемых микробных сообществах осуществляется преимущественно фототрофными микроорганизмами. Органическое вещество образуется автотрофными микроорганизмами, которое может быть использовано различными органотрофными микроорганизмами, в том числе ферментативными бактериями и хемолитотрофами.

1.3.4. Влияние экологических условий на формирование и развитие микробных сообществ минеральных источников

Состав микробного сообщества сильно зависит от физических свойств и химических параметров окружающей среды. К важным физическим свойствам относят свет, температуру и давление. Основными химическими параметрами являются кислород, pH, окислительно-восстановительный потенциал, анионно-катионный состав, соленость, доступные акцепторы и доноры электронов, а также

наличие или отсутствие специфических химических веществ, таких как железо, сера, хлориды, мышьяк и др. (Sand, 2003; Franks, Stolz, 2009).

Температура. На состав и распространение микробных сообществ в термальных источниках оказывает влияние температура экосистемы. С уменьшением температуры по изливу источников разнообразие микроорганизмов расширяется (Горленко и др., 1985; Намсараев и др., 2003; Everroad et al., 2012).

Большинство известных видов относится к мезофилам, у которых оптимальные условия роста от 30°C до 40°C, при возможном развитии в диапазоне 10-50°C. Существование многих архей и бактерий с образованием микробных матов возможно при экстремально высоких температурах до 110°C. Фотосинтез происходит при температуре ниже 75 °C (Madigan, 2003), метаболизм серы, железа и азота может развиваться при более высоких температурах (Stetter, 1999; Ferrera, Reysenbach, 2007).

Микроорганизмы, развивающиеся в термальных источниках, распределены в зависимости от их температурного диапазона роста (Ward et al., 2006; Bhaya et al., 2007). Например, в слабощелочном сульфидсодержащем термальном источнике Накабуса в Японии (рН 8,3-8,9; концентрация сульфида 0,1 мМ) при различных температурах (от 75°C до 52°C) было выявлено четыре различных сообщества (Everroad et al., 2012). В термальном ручье при температурах 75-67°C наблюдались серые или белые обрастания, при 66-60°C – оливково-зеленые маты толщиной в несколько миллиметров, при температуре ниже 62°C – толстые темно-зеленые маты. Визуально, маты при 55-52°C были очень похожи на те, что развивались при 62-55°C, но они, как правило, отличались наличием желтоватых вкраплений и большей толщиной. В микробных матах, развивающихся при 75-67°C, доминировали сероокисляющие бактерии рода *Sulfurihydrogenibium* и другие представители *Aquificales*, которые присутствовали также и при меньших температурах. При понижении температуры разнообразие сообщества микробных матов увеличивалось за счет появления аноксигенных и оксигенных фототрофов.

Свет. Солнечный свет, используемый в реакциях фотосинтеза, служит основным источником энергии для подавляющего большинства экосистем на

Земле. Важнейшими параметрами, определяющими активность фототрофных организмов, являются интенсивность падающего света, его спектральный состав, длительность светового дня. Свет часто оказывается лимитирующим фактором, поэтому фототрофные микроорганизмы обладают многочисленными механизмами, позволяющими использовать его энергию с максимальной эффективностью (Экология микроорганизмов, 2013).

Фототрофные организмы имеют светособирающие фотосинтетические пигменты, которые используют различные длины волн света. Цианобактерии содержат хлорофилл *a* растительного типа (680 нм) и водорастворимые фикобилиновые пигменты: голубые – фикоцианины и красные – фикоэритрины. Эти пигменты находятся в фикобилисомах (Громов, 1996). Зеленые аноксигенные фототрофные бактерии имеют хлоросомы с бактериохлорофиллами *c* (740 нм), *d* (725 нм) или *e* (714 нм), пурпурные фототрофы – интрацитоплазматические мембраны с бактериохлорофиллом *a* (800-890 нм) или бактериохлорофиллом *b* (1015 нм) (Stolz, 2006).

Спектры поглощения света у разных групп оксигенных и аноксигенных фототрофов сдвинуты друг относительно друга, что дает им возможность, располагаясь в разных слоях микробного мата, в конечном итоге достаточно полно усваивать энергию солнечного света. Фототрофам свойственно накопление на свету разнообразных запасных веществ, которые могут расходоваться в темноте для получения энергии. У многих фототрофов метаболизм гибкий, и они способны не только к переживанию, но и к росту в отсутствии света, в хемолитотрофных условиях (Экология микроорганизмов, 2013).

Кислород. Микробные маты часто являются местами резких градиентов кислорода, концентрация которого может колебаться от перенасыщения до полного его отсутствия (Dupraz, Visscher, 2005). Глубину градиента кислородной/бескислородной переходной зоны в основном определяют диффузия кислорода из вышележащей водной толщи, оксигенный фотосинтез, аэробное дыхание и производство сульфида (сульфатредуцирующими бактериями) (Canfield, Des Marais, 1993). Профилем, как правило, следует суточный шаблон, в

котором производство наибольшего чистого кислорода происходит в середине дня (рисунок 2) (Visscher et al., 1998). Однако существуют случаи, в которых пик приходится на позднее утро, поскольку интенсивность полуденного солнца может ингибировать фотосинтез (Miller et al., 1998, Jonkers et al., 2003). Как правило, концентрация кислорода на поверхности микробного мата находится в равновесии с вышележащей водной толщей, но увеличивается с глубиной в первые несколько миллиметров, а затем резко уменьшается.

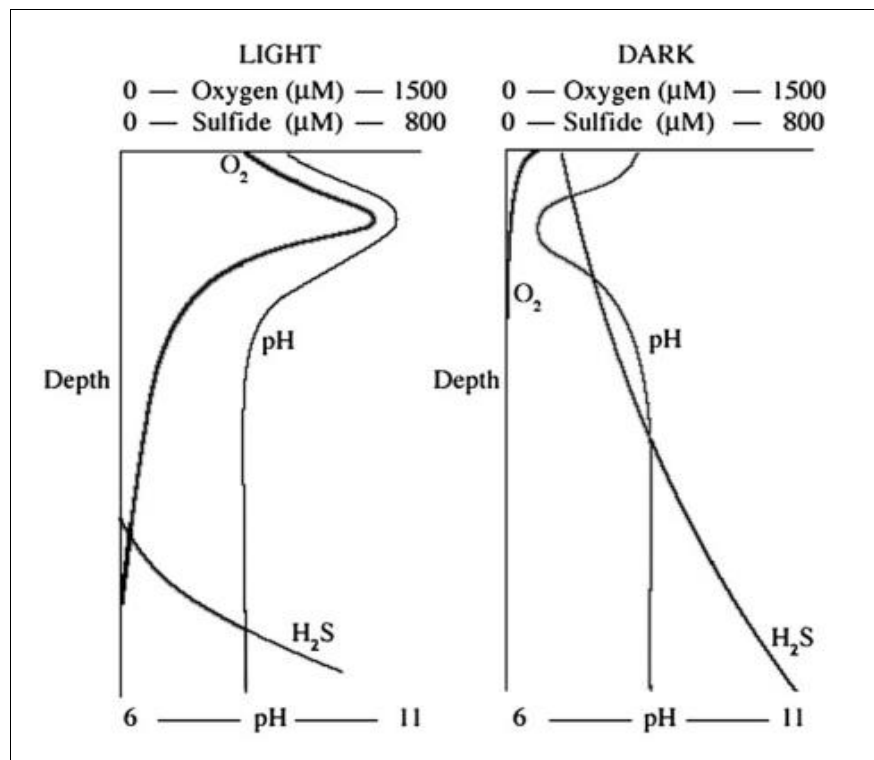


Рисунок 2. Идеализированные профили для кислорода, сероводорода и pH в течение дня (light) и ночи (dark) (Dupraz, Visscher, 2005)

В ночное время, сочетание дыхания и сульфидогенеза объединяются, чтобы переместить кислородную/бескислородную переходную зону ближе к поверхности. Этот суточный сдвиг часто сопровождается перемещением подвижных видов микроорганизмов (например, *Beggiatoa* sp.) в ответ на изменение (Hinck et al., 2007). Активность цианобактерий также может влиять на окислительно-восстановительный потенциал (Eh) осадка, приводя к значениям Eh больше 400 мВ в кислородной зоне (Visscher, Stolz, 2005).

Кислотность среды. Значение pH среды может оказывать влияние на состав микробного сообщества, влияя на целостность клеточной стенки организма

и его способность производить энергию, а также на способность к потреблению определенных питательных веществ (Franks, Stolz, 2009). Значения реакции среды минеральных источников, где развиваются микробные маты, покрывают весь теоретически возможный диапазон значений pH (0–14). Например, микробные маты были найдены при низких значениях pH в кислых серных источниках (Meisinger et al., 2007) и при высоких значениях pH в щелочных термальных источниках (Nakagawa, Manabu, 2002; van der Meer et al., 2005; Калашников и др., 2014).

Жизнедеятельность микроорганизмов часто может приводить к изменению pH среды. Например, среда может подкисляться при окислении сульфидов до сульфатов с образованием серной кислоты сероокисляющими бактериями, в результате процессов нитрификации и брожения. К подщелачиванию среды приводят дезаминирование белков и аминокислот аммонификаторами, разложение мочевины уробактериями, а также фотоассимиляция углекислого газа. Стабильное значение pH среды в некоторых местообитаниях связано с ее буферностью (Экология микроорганизмов, 2013). Даже в средах, где значение pH воды близкое к нейтральному, метаболическая активность сообщества может привести к градиенту pH. Оксигенный фотосинтез может повысить pH более 9, в то время как брожение и анаэробное дыхание могут снизить pH ниже 6,8 (Revsbech et al., 1983).

Концентрация питательных веществ. Доступность питательных веществ имеет определяющее значение для существования микроорганизмов и часто лимитирует их рост. Поступление в экосистему питательных веществ часто имеет случайный характер. Основными поставщиками питательных веществ в минеральных источниках можно считать микробные маты. Они могут обеспечить углеродом и азотом, производить значительное количество водорода и углекислоты, а также метана (Paerl et al., 2000; Hoehler et al., 2001). Углерод обеспечивается автотрофными членами сообщества микробного мата. К ним относятся оксигенные фотолитоавтотрофы (цианобактерии, диатомовые), аноксигенные фотолитоавтотрофы (пурпурные серобактерии, зеленые

серобактерии), аноксигенных фотоорганотрофы (пурпурные бактерии, зеленые нитчатые бактерии), и хемолитоавтотрофы (железоокисляющие бактерии, сероокисляющие бактерии, нитрифицирующие бактерии, метилотрофы).

Таким образом, в минеральных источниках и в других местообитаниях микробные сообщества подвергаются комбинированному воздействию физико-химических факторов. Физические свойства обычно являются абиотическими факторами среды, и не зависят от биологических характеристик, в то время как химические характеристики могут зависеть от активности микроорганизмов. Распространение фототрофных бактерий определяется, прежде всего, воздействием света, кислорода и сероводорода (Franks, Stolz, 2009). Концентрация кислорода зависит от диффузии и перемешивания, а также деятельности оксигенных фототрофов. Концентрация сульфида зависит от источника сульфата, активности сульфатвосстанавливающих бактерий, диффузии и потребления сульфида. Эти взаимодействия формируют динамическую систему, которая может проявлять пространственную и временную неоднородность. Они обеспечивают широкий спектр местообитаний, поддерживающих богатое разнообразие видов (Sand, 2003; Franks, Stolz, 2009).

1.3.5. Функциональная активность микробного сообщества минеральных источников

Микробные сообщества термальных источников представляют собой полноценные функциональные системы, эффективно осуществляющие круговорот биогенных элементов в процессах продукции и деструкции органического вещества (Заварзин и др., 1999). В микробном сообществе между продуцентами и деструкторами происходит перенос вещества через трофическую цепь, представленную ветвями продуцентов и деструкторов. Продукцию в микробном сообществе осуществляют первичные продуценты. Продукция органического вещества в минеральных источниках обусловлена деятельностью аэробных и анаэробных фото- и хемоавтотрофных организмов, образующих микробные маты (Pfennig, 1967; 1977; Madigan, 2003).

Фототрофные микробные сообщества минеральных источников обладают высокой продуктивностью. Так, например, интенсивности процессов оксигенного и аноксигенного фотосинтеза в микробных матах щелочного Уринского источника (Байкальская рифтовая зона) достигали 2,1 г С/(м²·сут) и 0,42 г С/(м²·сут), соответственно (Брянская и др., 2006). В источниках Термофильный (Камчатка) максимальная первичная продукция в зеленом мате при температуре воды 40-50°С составила 2,3 г С/(м²·сут). При этом доля аноксигенного фотосинтеза в монолите зеленого мата составила 45%. В белом мате преобладала продукция за счет хемосинтеза бесцветными серобактериями *Thermothrix thiopara*, которая составила 0,018 г С/ (м²·сут). Общая продуктивность микробных матов источника Термофильный увеличивалась вниз по течению ручья вместе с падением температуры и снижением концентрации сероводорода, достигая максимальных величин в многокомпонентном зеленом мате, в котором функционирует главным образом оксигенный фотосинтез (Горленко, Бонч-Осмоловская, 1989). В источнике Октопус Спринг (Йеллоустоун) скорость оксигенного фотосинтеза составляла 5,4 г С/(м²·сут) (Revsbech, Ward, 1984; Ferris et al. 1997). Суммарная скорость фотосинтеза в матах щелочного сульфидного Большереченского источника (Байкальская рифтовая зона) достигала 1,3 г С/(м²·сут) (Намсараев и др., 2003).

Органическое вещество, продуцируемое фототрофами, подвергается деструкции. Бактериальная деструкция обусловлена не только разложением биомассы или тел погибших организмов, а целой цепью превращений, вызываемых различными физиологическими группами бактерий. Разложение биомассы дает возможность существования нескольких специализированных групп организмов: гидролитиков, диссипотрофов, использующих низкомолекулярные соединения, вторичных окислителей, использующих конечные продукты обмена. Гидролиз полимеров и последующее сбраживание продуктов гидролиза завершаются полным окислением продуктов брожения в терминальных процессах метаногенеза, сульфатредукции и сероредукции.

Происходит полная минерализация органического вещества до конечных продуктов: CH_4 , CO_2 , H_2S (Горленко, Бонч-Осмоловская, 1989).

Процесс сульфатредукции осуществляется сульфатредуцирующими бактериями и зависит от концентрации сульфатов. В источнике Термофильный, в котором концентрация сульфатов была чуть выше 30 мг/л, максимальная скорость сульфатредукции (в зеленом мате) составила $0,02 \text{ г S}/(\text{м}^2 \cdot \text{сут})$, а в оливковом мате – $0,07 \text{ г S}/(\text{м}^2 \cdot \text{сут})$. Наименьшая интенсивность сульфатредукции обнаружена в белом мате, что, скорее всего, связано с конкуренцией с процессом сероредукции. Скорость сероредукции в белом мате составила $0,096 \text{ г S}/(\text{м}^2 \cdot \text{сут})$, что в 2,3 раза больше, чем скорость сульфатредукции (Горленко, Бонч-Осмоловская, 1989). В микробных матах Большереченского источника (Байкальская рифтовая зона) максимальная скорость сульфатредукции достигала $0,88 \text{ г S}/(\text{м}^2 \cdot \text{сут})$ (Намсараев и др., 2003). Максимальная скорость сульфатредукции ($1,97 \text{ г S}/(\text{м}^2 \cdot \text{сут})$) в микробных матах Уринского источника превышает скорости сульфатредукции в матах источника Термофильный и Большереченский (Брянская и др., 2006).

Одновременно с сульфатредукцией в минеральных источниках происходит конкурентный ей процесс метаногенеза, основными субстратами которого являются водород или ацетат (Бонч-Осмоловская и др., 1987). Максимальная интенсивность водородного метаногенеза в источнике Термофильный обнаружена в зеленом мате и составила $0,42 \text{ г C}/(\text{м}^2 \cdot \text{сут})$ (Горленко, Бонч-Осмоловская, 1989). Скорость метаногенеза в микробных матах Уринского и Большереченского источников была незначительна и достигала $562,2 \text{ мкг C}/(\text{м}^2 \cdot \text{сут})$ и $1,2 \text{ мкг C}/(\text{м}^2 \cdot \text{сут})$, соответственно. Метаногенез в микробных матах источников Байкальской рифтовой зоны не играет значительной роли в терминальной деструкции органического вещества. На терминальных этапах деструкции органического вещества в микробных матах исследуемых источников преобладающим процессом является сульфатредукция (Намсараев и др., 2003; Брянская и др., 2006).

Таким образом, можно заключить, что в микробных матах термальных минеральных источников активно протекают биогеохимические процессы,

интенсивность которых зависит от физико-химических условий окружающей среды, в частности, от температуры и концентрации соединений серы – сульфатов и сероводорода.

1.3.6. Участие микробных сообществ минеральных источников в круговороте серы

Серя является одним из распространенных элементов в природе, которой характерны соединения с различными степенями окисления от -2 до +6. В виде неорганических соединений сера бывает в окисленной форме (сульфаты, полиотионаты), восстановленной форме (сульфиды) и молекулярной, осуществляя активный окислительно-восстановительный цикл. Круговорот серы состоит из непрерывных химических и биологических процессов окисления и восстановления соединений серы, способствующих превращению от одного состояния к другому (рисунок 3; таблица 3) (Грабович, 1999; Sievert et al., 2007).

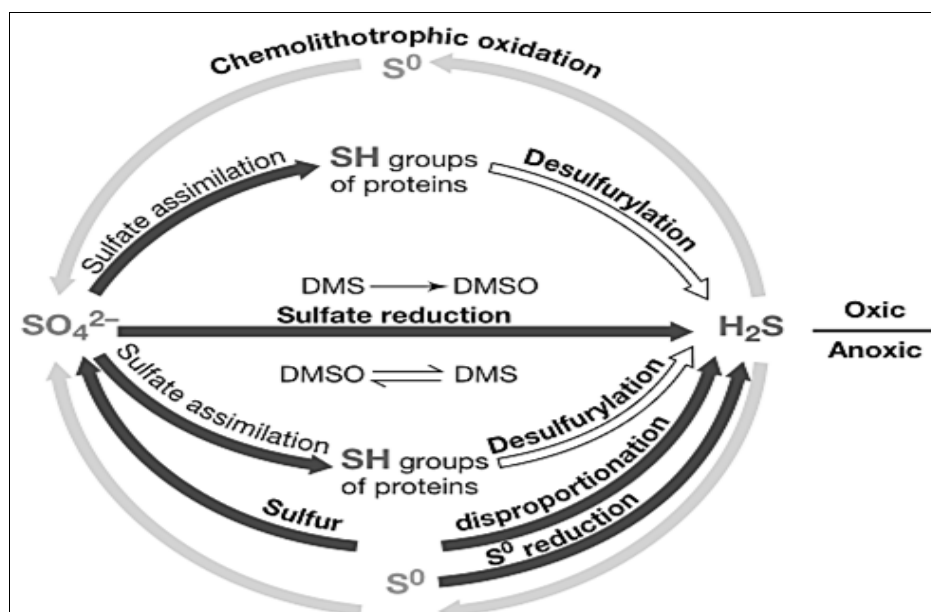


Рисунок 3. Круговорот серы (Madigan et al., 2014). Процессы окисления обозначены серыми стрелками, процессы восстановления черными стрелками. Реакции, протекающие без изменения окислительно-восстановительного потенциала, обозначены белыми стрелками. (DMS – диметилсульфид; DMSO – диметилсульфоксид)

Основные процессы круговорота серы

Процессы	Схема	Организмы
Окисление сульфида и серы		
Аэробно	$\text{H}_2\text{S} \rightarrow \text{S}^0 \rightarrow \text{SO}_4^{2-}$	Серные хемолитотрофы (<i>Thiobacillus</i> , <i>Beggiatoa</i> , многие другие)
Анаэробно		Пурпурные и зеленые фототрофные бактерии, некоторые хемолитотрофы
Сульфатредукция анаэробно	$\text{SO}_4^{2-} \rightarrow \text{H}_2\text{S}$	<i>Desulfovibrio</i> , <i>Desulfobacter</i> , <i>Archaeoglobus</i> (Archaea) и др.
Сероредукция анаэробно	$\text{S}^0 \rightarrow \text{H}_2\text{S}$	<i>Desulfotomomas</i> , многие гипертермофильные Archaea
Диспропорциони- рование серы	$\text{S}_2\text{O}_3^{2-} \rightarrow \text{H}_2\text{S} + \text{SO}_4^{2-}$	<i>Desulfovibrio</i> и другие
Окисление или восстановление органических соединений серы	$\text{CH}_3\text{SH} \rightarrow \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{S}$ DMSO (диметилсульфоксид) \rightarrow DMS (диметилсульфид)	Многие организмы
Десульфурификация	органическая S $\rightarrow \text{H}_2\text{S}$	Многие организмы

Окислительная часть круговорота серы включает стадии от S^{2-} до SO_4^{2-} (состоит целиком из реакций неорганических соединений $\text{S}^{2-} \rightarrow \text{nS}^{2-} \rightarrow \text{S}^0 \rightarrow \text{S}_2\text{O}_3^{2-} \rightarrow \text{SO}_3^{2-} \rightarrow \text{SO}_4^{2-}$ или включает реакции органических форм серы), которые могут протекать в зависимости от условий как чисто химически, так и с участием микроорганизмов (Грабович, 1999).

Процессы окисления соединений серы могут протекать как аэробно при использовании кислорода или нитратов в качестве акцептора электронов, так и анаэробно в результате аноксигенного фотосинтеза (рисунок 3). При окислительных процессах восстановленные соединения серы, например, такие как сульфиды, служат донорами электронов для фототрофных или хемолитотрофных микроорганизмов, которые преобразуют эти соединения до сульфатов (Robertson, Kuenen, 2006). Процессы химического и биологического окисления сульфида не всегда ведут непосредственно к сульфату, но часто приводят к промежуточным соединениям, таким как элементная сера или тиосульфат. Они могут служить акцепторами электронов для анаэробных микроорганизмов, которые не могут восстановить сульфат (Rabus et al., 2006).

Среди микроорганизмов, способных к окислению серных соединений, выделяются три основные физиологические группы: анаэробные фототрофные бактерии, аэробные и факультативно анаэробные литотрофные бактерии, археи и различные гетеротрофные микроорганизмы (Грабович, 1999).

Восстановительная часть круговорота серы, включает процессы восстановления сульфатов и серы, которые являются строго анаэробными процессами (рисунок 3). Восстановительная часть круговорота серы осуществляется преимущественно биологическим путем с доминирующей ролью прокариот в этом процессе, при этом осуществляется восстановление атома серы из состояния максимального окисления (+6) до максимального восстановления (-2). Однако не всегда этот процесс происходит до конца, и в среде нередко обнаруживаются не полностью окисленные продукты: элементная сера, полиотионаты, сульфит (Грабович, 1999).

Ассимиляционное восстановление сульфатов приводит к включению серы во множество органических соединений, таких как аминокислоты, полипептиды, ферментные кофакторы, антибиотики, липиды или углеводы. Ассимиляционное восстановление сульфатов распространено у прокариотов, растений и грибов (Brüser et al., 2000).

Диссимиляционную сульфатредукцию, представляющую собой анаэробное дыхание, при котором сульфат служит конечным акцептором электронов (вместо кислорода) при окислении органических веществ или молекулярного водорода, осуществляют сульфатредуцирующие бактерии (Грабович, 1999).

Диссимиляционная сероредукция – это ферментативный процесс, при котором молекулярная сера восстанавливается до сульфида. Диссимиляционную сероредукцию осуществляют как мезофильные, так и термофильные прокариоты. Восстановление молекулярной серы до сероводорода имеет большое значение для термофильных микроорганизмов, обитающих в термальных источниках, где элементная сера является одной из наиболее значимых форм серы и где соединения серы имеют исходно вулканическое происхождение (Грабович, 1999).

Диспропорционирование серы приводит к одновременному формированию сульфата и сульфида (Bak, Pfennig, 1987). В дополнение к неорганическим соединениям серы, обширное множество органических соединений серы (то есть серосодержащие белки), синтезируются микроорганизмами и большей частью микробного цикла серы. Другие органические соединения серы, такие как диметилсульфид, дисульфид этана, диметилсульфоксид, метилмеркаптан, и сероуглерод также включаются и воздействуют на микробный цикл серы (Tang et al., 2009).

В процессах круговорота серы в минеральных источниках в основном участвуют хемолитотрофные и фотоавтотрофные сероокисляющие бактерии и сульфатредуцирующие бактерии.

Сероокисляющие бактерии используют энергию восстановленных неорганических соединений серы (сероводород, тиосульфаты, сульфиты, элементная сера), но в некоторых случаях также органических соединений серы (например, метилмеркаптан, диметилсульфид, диметилдисульфид). Сероокисляющие бактерии найдены в трех филумах домена *Bacteria* (*Proteobacteria*, *Aquificae*, *Deinococcus-Thermus*) и одном филуме домена *Archaea* (*Crenarchaeota*) (рисунок 4). Большинство сероокисляющих бактерий относятся к β - (*Thiobacillus*), γ - (*Achromatium*, *Beggiatoa*) и ϵ -*Proteobacteria* (*Thiovulum*, *Thiomicrospira*) (Madigan et al., 2014).

Виды сероокисляющих бактерий, ранее относимые к роду *Thiobacillus*, согласно результатам сравнительного анализа генов 16S рРНК, признаны представителями различных подгрупп α -, β - и γ -*Proteobacteria*. Вследствие этого была проведена реклассификация этой группы сероокисляющих бактерий (Kelly, Wood, 2000). Помимо известных сероокисляющих бактерий группы γ -*Proteobacteria*, как *Beggiatoa sp.*, *Thiomicrospira sp.*, и эндосимбионтов беспозвоночных (например, *Riftia pachyptila*), в нее вошли бактерии, принадлежащие ϵ -*Proteobacteria*. Они были только недавно признаны важными членами микробных сообществ в глубоководных гидротермах (Campbell et al., 2006).

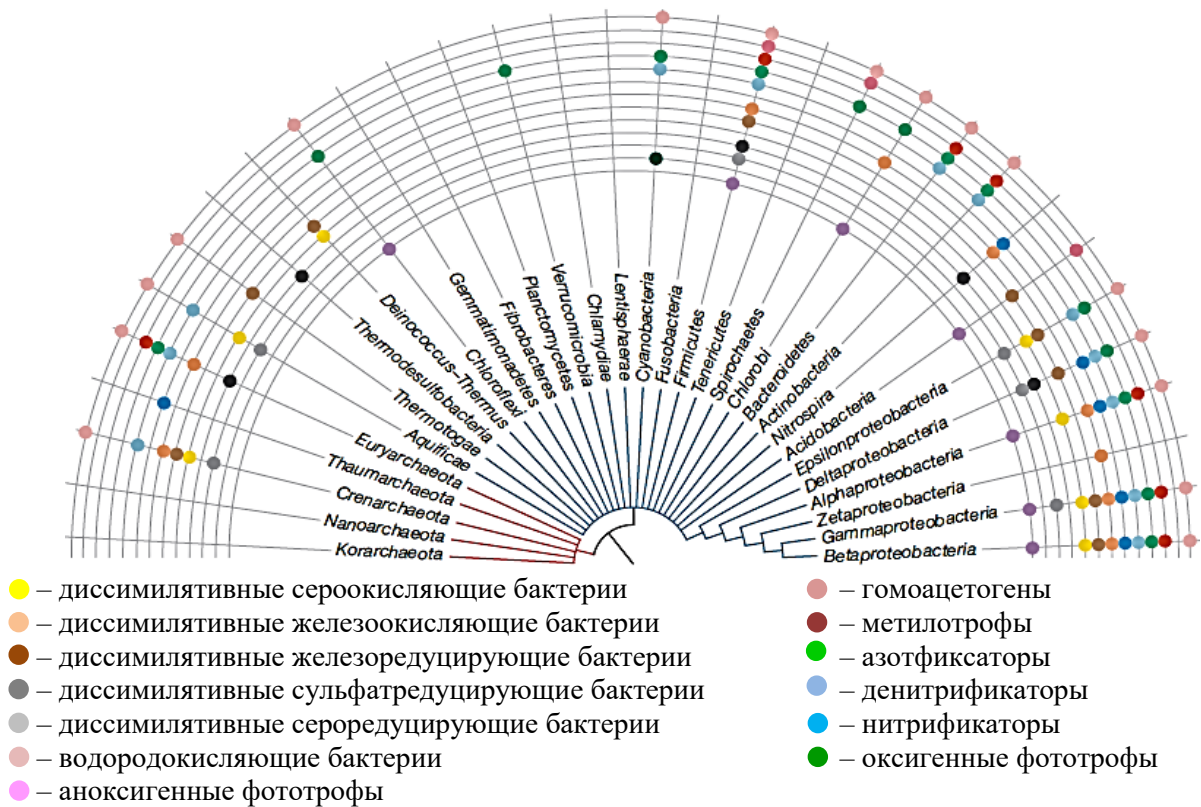


Рисунок 4. Филогенетическое древо главных функциональных представителей различных филумов доменов *Bacteria* и *Archaea* на основании данных о последовательностях фрагментов гена 16S рРНК (Madigan et al., 2014). Синие ответвления – филумы *Bacteria* и красные ответвления – филумы *Archaea*

Сероокисляющие бактерии состоят из хемолитотрофных бесцветных серобактерий (тионовые бактерии и нитчатые серобактерии) и фотоавтотрофных серобактерий (пурпурные серобактерии и зеленые серобактерии). Хемолитотрофные серобактерии окисляют соединения серы с использованием кислорода аэробно или иногда с использованием нитрата в качестве конечного акцептора электронов анаэробно (Bos, Kuenen, 1983). Фотоавтотрофные серобактерии окисляют серу анаэробно в присутствии света (Bos, Kuenen, 1983; Douglas, Douglas, 2001). Они являются пигментированными формами и в большом количестве образуют цветные микробные маты. Хемолитотрофные серобактерии называют бесцветными серобактериями, для того чтобы отличить их от фотоавтотрофных серобактерий; прилагательное "бесцветные" используется из-за отсутствия фотопигментов в этих бактериях (Kim, Gadd, 2008; Robertson, Kuenen, 2006).

Хемолитотрофные бесцветные сероокисляющие бактерии состоят из двух морфологически и таксономически отличных групп; одни – малые короткие палочки рода *Thiobacillus* (*Thiobacillus thioparus*, *Thiobacillus denitrificans* или *Thiobacillus thiooxidans*) и длинные нитевидные бактерии родов *Beggiatoa*, *Thiothrix*, *Thioploca*, *Thiospirillopsis*. Группа длинных нитевидных бактерий окисляет H_2S до S^0 , которую они накапливают в клетке, которая может быть впоследствии окислена до сульфатов. Когда поставка сероводорода бывает достаточной, сера запасается в клетке в форме черных капелек, но в случае нехватки сероводорода или излишка окислителя, S^0 далее окисляется до растворимых сульфатов, которые в состоянии пройти через клеточные стенки (Schmidt et al., 1987).

Бесцветные серобактерии могут быть выделены из сульфидных минеральных источников, начиная от холодных до мезофильных и геотермальных серных источников. Например, сероокисляющие бактерии *Thiobacillus*, *Thiomonas* и матобразующие нитчатые γ -*Proteobacteria* типа *Beggiatoa* и *Thiothrix* встречаются в сульфидных источниках Италии. Популяция *Beggiatoa* развивается в окружающей среде с немного низким доступом кислорода, чем *Thiothrix* (Macalady et al., 2006). *Thiothrix azorensis*, который является облигатно хемолитоавтотрофным термофилом с оптимумом роста в температурном диапазоне от 63 до 86°C, был выделен из термального источника (Odintsova et al., 1996). Нейтрофильные термофильные сероокисляющие бактерии *Thermothrix thiopara*, способные осаждать серу внеклеточно и окислять соединения серы в анаэробных условиях с использованием нитрата, были выделены из горячего источника в штате Нью-Мексико (США) (Caldwell et al., 1976). Термофильный, ацидофильный и факультативно автотрофный род *Sulfolobus* был обнаружен в термальных источниках (Brock, 1972). Из горячих источников Йеллоустонского национального парка (США) также были выделены экстремально термофильные, факультативно гетеротрофные сероокисляющие бактерии *Sulfurihydrogenibium yellowstonense* sp. nov. (Nakagawa et al., 2005).

Бесцветные сероокисляющие бактерии имеют большое значение в биотехнологии: для повышения плодородия почв, уменьшения загрязнения окружающей среды от токсичных сульфидов, присутствующих в сточных водах различных отраслей промышленности и сточных водах выщелачивания экономически важных металлов из бедных руд (Rawat, Rawat, 2015). Хемолитотрофные сероокисляющие бактерии (*Thiobacillus*, *Sulfolobus*, *Thermothrix*, *Beggiatoa* и *Thiothrix*) используются в биотехнологии для биологического удаления сульфидов из-за высокой скорости окисления сульфидов, скромных потребностей в пище и высокого сродства для сульфидов и кислорода (Janssen et al., 1998; Pokorna, Zabranska, 2015).

Фототрофные серобактерии являются представителями группы **аноксигенных фототрофных бактерий**. Аноксигенные фототрофные бактерии представляют собой обширную группу микроорганизмов, осуществляющих фотосинтез без выделения молекулярного кислорода при участии бактериохлорофиллов (Горленко, 2010). При аноксигенном фотосинтезе донорами электронов служат разнообразные органические или неорганические вещества, такие как органические кислоты, спирты, углеводы, сероводород, сера, или водород, селен, арсениты, нитрит, восстановленные соединения железа, которые присутствовали в древней атмосфере и гидросфере Земли (Padan, Cohen, 1982; Горленко, 2010).

Аноксигенные фототрофные бактерии сгруппированы в соответствии с их фотосинтезирующими пигментами и используемыми донорами электронов. Это пурпурные бактерии, зеленые бактерии и гелиобактерии. Пурпурные и зеленые бактерии далее делятся на пурпурные несерные и пурпурные серные бактерии, а также зеленые серные и нитчатые аноксигенные фототрофные бактерии (Kim, Gadd, 2008). Почти каждая из этих групп входит в состав обособленной эволюционной ветви (Woese et al., 1985). Аноксигенные фототрофы присутствуют среди представителей пяти бактериальных филумов: α -, β -, γ -*Proteobacteria*, *Chlorobi*, *Chloroflexi*, *Firmicutes* и *Acidobacteria*.

К α -*Proteobacteria* относится большинство **пурпурных несерных бактерий** родов *Rhodospirillum*, *Rhodobacter*, *Rhodopseudomonas*, *Phaeospirillum*, *Rhodovibrio*, *Rhodothalassium*, *Roseospira*, *Rhodomicrobium*, *Rhodoplanes*, *Rhodovulum*, *Rhodobium*, *Rhodocista*, *Rhodopila* и *Rhodospira*. Их ближайшими нефототрофными филогенетическими соседями в пределах α -подгруппы являются бактерии группы *Paracoccus*, *Agrobacterium*, *Acetobacter*, *Azorhizobium*, а также *Beijerinckia indica*, *Magnetospirillum magnetotacticum*, *Hyphomicrobium vulgare*, *Nitrobacter winogradskyi*, *Azospirillum irakense* (Stackebrandt et al., 1996).

К β -*Proteobacteria* относятся пурпурные несерные бактерии рода *Rhodocyclus*, *Rubrivivax* и *Rhodoferax* (Imhoff et al., 1984; Hiraishi et al., 1991; Willems et al., 1991). Пурпурные несерные бактерии используют восстановленные органические соединения или сероводород, которые окисляют до элементарной серы или сульфатов. В отличие от пурпурных серных бактерий они не обладают способностями окисления элементарной серы. Они широко распространены в природе. Мезофильные виды их постоянно присутствуют в матах термальных источников при температурах свыше 50°C (Горленко, 2010).

К γ -*Proteobacteria* принадлежат такие **пурпурные серобактерии** из семейств *Chromatiaceae* и *Ectothiorhodospiraceae*, относящиеся к двум разным группам внутри γ -*Proteobacteria* (Fowler et al., 1984; Stackebrandt et al., 1984). Пурпурные серобактерии (*Allochromatium*, *Chromatium*, *Thioalkalicoccus*, *Thiorodococcus*, *Thiococcus*, *Thiocystis*, *Thiospirillum*) накапливают серу в форме сферических частиц внутри клеток. Пурпурные серобактерии также способны к использованию органических соединений, и поэтому их рассматривают как факультативные фотолитотрофные бактерии. Есть также такие группы серобактерий (*Ectothiorhodospira*, *Halorhodospira*, *Thiorhodospira*), которые способны к откладыванию серы вне клетки, а затем окисляют ее до сульфата (Tang et al., 2009). У пурпурных серобактерий состав бактериохлорофилла близок к хлорофиллу *a*, кроме того они также содержат красные и желтые каротиноиды.

Близкое родство с пурпурными несерными бактериями показывают также **аэробные аноксигенные фототрофные бактерии**, имеющие своих

представителей в основном в классе *α-Proteobacteria*, и лишь несколько видов среди *β*- и *γ-Proteobacteria*. У всех представителей аэробных аноксигенных фототрофных бактерий бактериохлорофилл *a* синтезируется в аэробных условиях (Горленко, 2010). Присутствуют в различных типах местообитаний, таких как моря, термальные источники, соленые и содовые озера (Hiraishi et al., 2000; Jiang et al., 2009; Болдарева и др., 2009; Medova et al., 2011).

Зеленые серобактерии образуют отдельную филогенетическую группу *Chlorobi*, в которую входят бактерии родов *Chlorobium*, *Chloroherpeton*, *Prosthecochloris*, *Pelodictyon*, *Ancalochloris*, *Chlorobaculum* семейства *Chlorobiaceae* (Gibson et al., 1984; Imhoff, 2003; Bryant, Frigaard, 2006). Зеленые серобактерии окисляют сульфиды через элементарную серу до сульфатов. Зеленые серобактерии в состоянии выполнять фотосинтез в анаэробных условиях, но не растут в темноте (Tang et al., 2009). Самым распространенным из них является *Chlorobium limicola*, у которого оптимальный спектр поглощения света находится в диапазоне 350-850 нм, с оптимумом 760 нм (Stanier et al., 1986). Постоянное поступление сульфида от сульфидогенов дает возможность существовать зеленым серобактериям в средах с малым количеством восстановленных серных соединений. Они развиваются в основном при нейтральных значениях pH и умеренных температурах, за исключением одного вида *Chlorobium tepidum* (Madigan, 2003), обнаруженного в термальных источниках (Горленко, 2010).

Зеленые нитчатые бактерии филума *Chloroflexi* принадлежат к отдельной очень древней эволюционной ветви эубактерий (Oyaizu et al., 1987; Woese, 1987), которая включает как аэробные, так и анаэробные хемогетеротрофы. К зеленым нитчатым бактериям относятся бактерии следующих родов: *Chloroflexus*, *Heliothrix*, *Oscillochloris*, *Chloronema*, *Chlorothrix*, *Roseiflexus* (Дубинина, Горленко, 1975; Горленко, Пивоварова, 1977; Keppen et al., 2000; Gorlenko, Pierson, 2001; Hanada, 2002; Klappenbach, Pierson, 2004). Среди них есть термофилы и мезофилы, широко распространены в гиперсоленых озерах,

пресноводных местообитаниях, термальных источниках (Pierson, Castenholz, 1974; Калашников и др., 2014; Gaisin et al., 2015)

Гелиобактерии семейства *Heliobacteriaceae* – грамположительные бактерии филума *Firmicutes*, продуцирующие эндоспоры и содержащие уникальный бактериохлорофилл *g*. В настоящее время описано 4 рода гелиобактерий – *Heliobacterium*, *Heliobacillus*, *Heliophilum*, (Madigan, 2001). Бактерии рода *Heliobacillus* и *Heliorestis* в процессе фотогетеротрофного роста могут окислять сульфид с образованием серы или полисульфида. Постоянное присутствие гелиобактерий в микробных матах горячих минеральных источников при температурах от 50°C и ниже (Kimple et al., 1995), а также в прибрежных матах содовых озер (Брянцева и др., 2000), дает основание предположить их участие в круговороте углерода, азота и серы в этих древних микробных сообществах (Горленко, 2010).

Аэробные зеленые фототрофные бактерии *Acidobacteria*, принадлежат к отдельной новой филогенетической ветви аноксигенных фототрофов (Bryant et al., 2007). Единственно известный вид «*Chloracidobacterium thermophilum*», полученный из проб микробного мата термального источника Октопус (Йеллоустонский национальный парк, США), поддерживается в бинарной культуре с *Anoxybacillus* sp. Новый микроорганизм является аэробом, имеет реакционный центр первого типа, синтезирует бактериохлорофилл *c* и хлоросомы в качестве антенных структур и содержит FMO-протеин (Горленко, 2010).

Сульфатредуцирующие прокариоты (бактерии и археи) используют сульфат как конечный акцептор электрона в процессе метаболизма (Грабович, 1999; Пиневич, 2007). Более 30 родов сульфатредуцирующих бактерий относятся к представителям класса *Deltaproteobacteria*, хотя они также найдены в других филумах, таких как *Firmicutes* (*Desulfotomaculum* и *Desulfosporosinus*), *Thermodesulfobacteria* (*Thermodesulfobacterium*) и *Nitrospira* (*Thermodesulfovibrio*). Сульфатредукторы также встречаются в роде *Archaeoglobus* филума *Euryarchaeota* домена *Archaea* (рисунок 5) (Madigan et al., 2014).

По представлениям Видделя, сульфатредуцирующие бактерии распадаются на две трофические группы (Заварзин, 1984):

1) Организмы с неполным окислением, образующие ацетат. Включают хорошо изученных сульфатредуцирующих бактерий рода *Desulfovibrio*, наряду с родами *Desulfomonas*, *Desulfotomaculum*, и *Desulfobulbus*.

2) Ацетат-использующие организмы, которые окисляют ацетат и другие жирные кислоты полностью до углекислоты, при этом восстанавливая SO_4^{2-} до H_2S . Включают такие рода как *Desulfobacter*, *Desulfococcus*, *Desulfosarcina*, и *Desulfonema* и многие другие.

Эти две физиологические группы не являются филогенетическим образом когерентными, но вместо этого распределены широко через филогению сульфатредуцирующих бактерий.

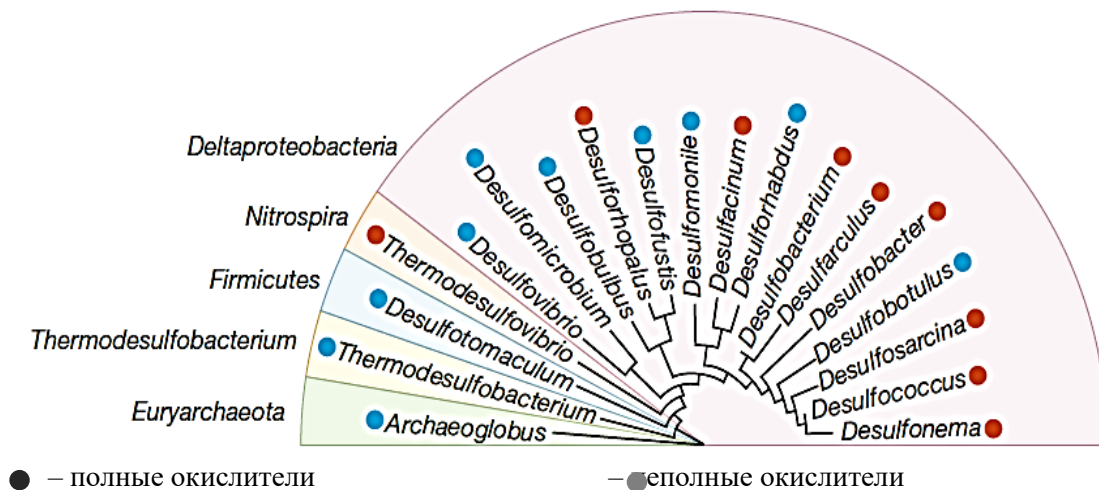


Рисунок 5. Филогенетическое древо представителей некоторых родов сульфатредуцирующих бактерий на основании данных о последовательностях фрагментов гена 16S рРНК (Madigan et al., 2014).

Некоторые сульфатредуцирующие бактерии могут эксплуатировать альтернативные метаболические пути. В дополнение к SO_4^{2-} или S^0 , некоторые сульфатредукторы могут также восстанавливать нитрат и нитрит до аммония и сульфонаты (такие как изотионат, $\text{HO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-SO}_3^-$). Определенные органические соединения также могут быть подвергшимися брожению сульфатредуцирующими бактериями. Наиболее распространенным из них является пируват, который подвергается брожению до ацетата, CO_2 и H_2 .

Сульфатредуцирующие бактерии являются анаэробами, но некоторые из них – вполне толерантны к O_2 , прежде всего штаммы, которые сосуществуют с цианобактериями в микробных матах (Baumgartner et al., 2006; Madigan et al., 2014). *Desulfovibrio oxuclinae* может фактически расти в присутствии O_2 как акцептора электронов под микроаэрофильными условиями (Krekeler et al., 1997). Также *Desulfovibrio desulfuricans* может окислять H_2 за счет O_2 (Krekeler, Cypionka, 1995), а *Desulfobulbus propionicus* окисляет сульфид и элементную серу в присутствии O_2 (Fusler, Cypionka, 1995). Учитывая неорганический или органический характер источника энергии у сульфатредуцирующих бактерий, выделяют два типа анаэробного сульфатного дыхания: автотрофное или гетеротрофное восстановление сульфата (Odom, Singleton, 1993).

Большое разнообразие сульфатредуцирующих микроорганизмов было выделено из водной среды обитания (Rabus et al., 2006). Геохимическая роль сульфатредуцирующих бактерий чрезвычайно велика, поскольку благодаря их деятельности инертное соединение – сульфат в анаэробной зоне в больших масштабах вовлекается в биологический круговорот серы (Грабович, 1999). Сульфатредуцирующие бактерии могут использоваться при очистке сточных вод и других сред, загрязненных тяжелыми металлами и сульфатами (Калюжный и др., 1991), биологической переработке промышленных отходов (Петрова и др., 2003). Также установлено, что сульфатредуцирующие бактерии участвуют в образовании лечебной грязи минеральных источников и озер (Заварзин, 1972).

1.4. Заключение к литературному обзору

Микроорганизмы являются наиболее многочисленными обитателями биосферы, занимающими все доступные для жизни местообитания, в том числе и экосистемы термальных минеральных источников.

Микробные сообщества минеральных источников относят к наиболее древним биоценозам Земли. Подавляющее большинство микроорганизмов, входящих в состав микробных сообществ минеральных источников, не встречаются в других местах (Грабович, 1999). Биоценозы термальных

минеральных источников представляют собой уникальные сообщества живых существ, которые образуются в основном прокариотами – бактериями и археями. Они теснейшим образом связаны между собой трофическими конкурентными и симбиотическими отношениями, а компоненты сообщества и пространственная локализация отдельных видов зависят от условий окружающей среды (Горленко, 1977; Sand, 2003; Franks, Stolz, 2009). Микробные сообщества источников активно участвуют в функционировании и взаимодействии круговоротов всех биогенных элементов (углерода, кислорода, азота, серы, фосфора, железа) и имеют исключительное значение для жизни на Земле (Грабович, 1999; Заварзин и др., 1999; Экология микроорганизмов, 2013).

Изучение микроорганизмов, способных распространяться в термальных источниках, имеет большое значение для открытия новых направлений в области биотехнологии и экологических исследований.

Полное представление микробного разнообразия в термальных источниках до недавнего времени не возможно было из-за ограничений в методах культивирования. Метагеномные исследования природных микробных сообществ дали возможность определить предполагаемые физиологические и метаболические стратегии микроорганизмов и их экологическую роль, провести подробные оценки биоразнообразия прокариот в природных образцах, структуры и динамики культивируемых и некультивируемых микробных сообществ, намного шире узнать их качественный и количественный состав, экологию и физиологию, анализировать сложные геномы микробных ниш, развитие новых форм биологических систем и открытие новых функций, имеющих биотехнологический и биомедицинский потенциал (Streit, Schmitz, 2004; Huang et al., 2011; Tobler, Benning, 2011; Brazelton et al., 2012; Акимов и др., 2013; De Leon et al., 2013; Alsop et al., 2014; Colman et al., 2014; Rozanov et al., 2014 и др.).

Таким образом, использование современных молекулярно-биологических методов позволит более подробно изучить разнообразие микробных сообществ минеральных источников Восточного Саяна, которое ранее не изучалось.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Описание экосистем минеральных источников Восточного Саяна

Объектами исследования служили микробные сообщества воды, микробных матов и илов минеральных источников Хойто-Гол и Жойган, находящихся в отрогах Восточного Саяна на высоте 1600 м над уровнем моря на расстоянии 30 км друг от друга (рисунок 6). Для исследования были отобраны пробы воды, микробных матов и илов на 7 станциях в каждом исследуемом источнике (рисунок 7 и 8). Гидрохимические и микробиологические исследования образцов проводили в 2011-2014 гг.

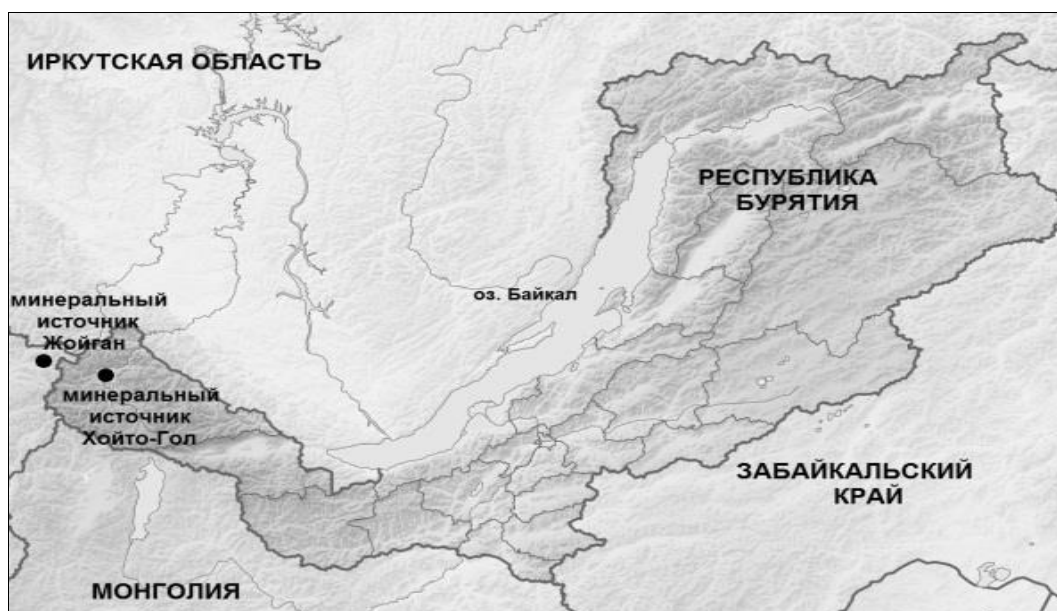


Рисунок 6. Карта расположения минеральных источников Хойто-Гол и Жойган

Минеральные источники Хойто-Гол расположены в долине р. Хойто-Гол (приток р. Сенцы). Выход минеральных источников приурочен к региональному разлому, проходящему по долине р. Сенцы в горной системе Восточного Саяна.

На небольшой по размеру травертиновой площадке левобережья р. Хойто-Гол постоянно функционирует пять источников с температурой воды 30-36°C и суммарным дебитом 13 л/с. По химическому составу эти воды относятся к гидрокарбонатным натриевым с минерализацией 0,9-0,95 г/дм³ и содержанием свободной углекислоты 200-220 мг/дм³. В водах источников содержится до 5

мг/дм³ сероводорода и 40-50 мг/дм³ кремнекислоты. В составе растворенных газов содержится 37% углекислоты, 52% азота и редких газов, 8% кислорода. Травертиновые отложения в районе источников занимают площадь около 300 м², средняя их мощность не превышает 0,5 м (Борисенко, Замана, 1978).

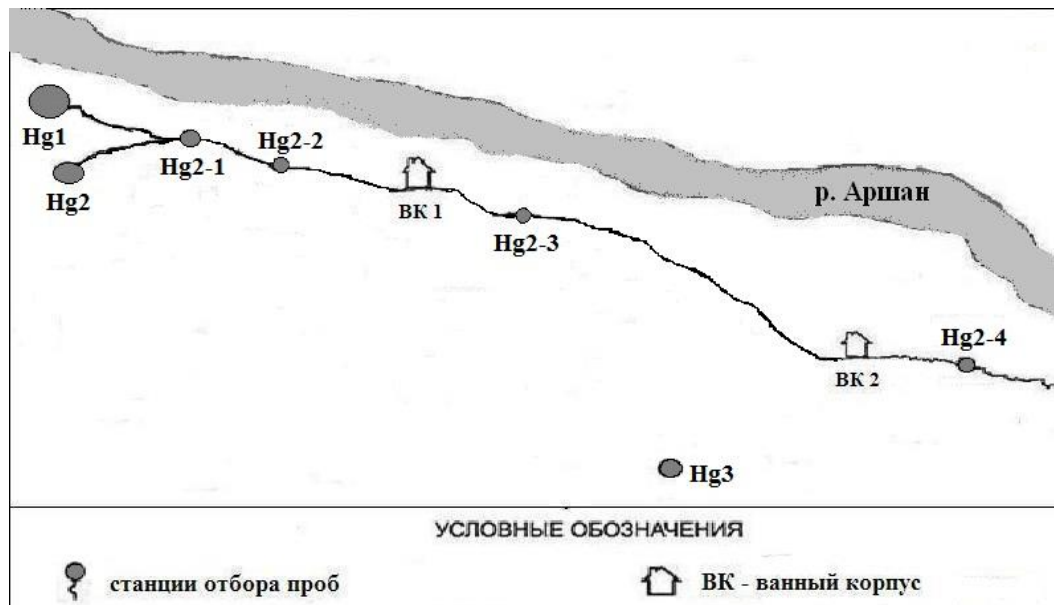


Рисунок 7. Схема расположения станций отбора проб на минеральном источнике Хойто-Гол. Станции отбора проб отмечены Hg1, Hg2, Hg2-1, Hg2-2, Hg2-3, Hg2-4, Hg3

Минеральные источники Жойган находятся в долине реки Аржан-Хем – правом истоке р. Изиг-Суг (система р. Хамсары) у подножия перевала Чойган-Дабан в 2,5 км к западу от границы с Республикой Бурятия. Высота над уровнем моря составляет 1550 м (Пиннекер, 1968; Аракчаа, 2012).

Жойганские источники связаны с крупным широтным разломом в докембрийских породах (гнейсы, мраморы, сланцы), прорванных гранитами и диоритами палеозоя. Вокруг источников развиты обширные поля слежавшихся известковых туфов – травертинов (Пиннекер, 1968). Площадь долины минеральных источников Жойган составляет 28 гектаров, шириной 400 м и длиной 700 м (Аракчаа, 2012).

Минеральные источники Жойган – это уникальное месторождение более 30 выходов термальных и холодных углекислых вод с температурой от 10,0 до 38,8°С и суммарным дебитом 50 л/с (рисунок 8) (Пиннекер, 1968). По

химическому составу термальные источники относятся к гидрокарбонатным кальциево-натриевым с минерализацией 1,3-2,6 г/дм³ и содержанием углекислоты 500-940 мг/дм³. Холодные углекислые воды Жойган с температурой менее 20°С имеют низкую минерализацию (от 0,5 до 1,3 г/дм³), содержат углекислоты больше, чем горячие воды. Состав воды обычно гидрокарбонатный кальциевый. Некоторые воды Жойгана являются радоновыми (более 36-50 эман) и кремнистыми (более 50 мг/дм³), концентрация которых имеет лечебное значение. Источники Жойган содержат соли железа 0,05-15,8 мг/дм³ (Аракчаа и др., 2012).

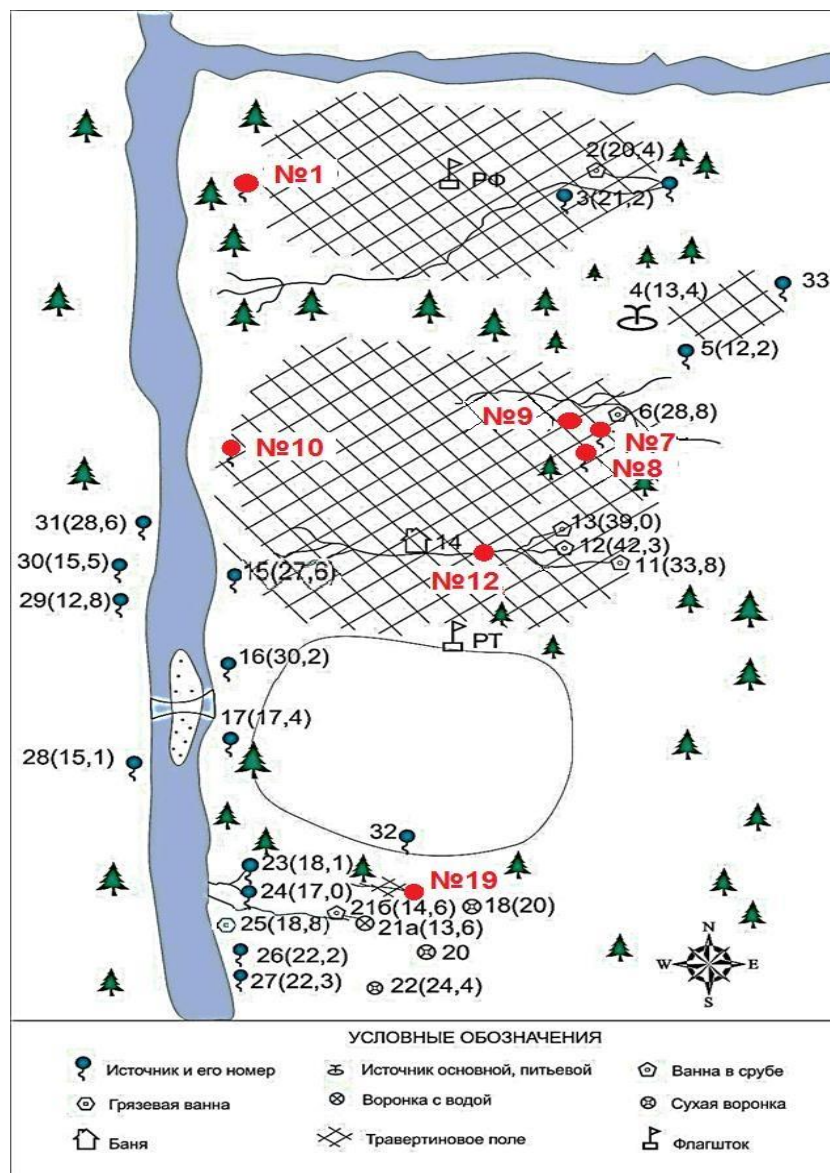


Рисунок 8. Схема расположения станций отбора проб на минеральном источнике Жойган (карта-схема по Аракчаа, 2012). Станции отбора проб отмечены №1, №7, №8, №9, №10, №12, №19

2.2. Методы исследования

2.2.1. Методы отбора проб

Пробы воды, микробных матов и илов для микробиологического анализа отбирали в стерильную посуду. Фиксацию проб для химических и микробиологических определений проводили сразу после отбора проб. До проведения анализов пробы хранили в темноте.

Пробы микробных матов отбирали стерильным пробочным сверлом площадью 1 см² и фиксировали 4% раствором формалина для определения видового состава цианобактерий, 96% раствором этилового спирта или 50% раствором глицерина для определения пигментного состава. Пробы микробных матов для изучения микроморфологии и качественного состава минеральных фаз отбирали с сохранением структуры.

Для молекулярно-генетического анализа пробы микробных матов отбирали в стерильную посуду и фиксировали этанолом до конечной концентрации не менее 70%. Термальную воду фильтровали через бактериальный фильтр (диаметр пор 0,22 мкм) до полного его насыщения взвешенным материалом с последующей фиксацией 70% этанолом.

Пробы воды для определения металлов фильтровали через нитроцеллюлозные мембранные фильтры с диаметром пор 20 мкм и консервировали концентрированной азотной кислотой.

2.2.2. Физико-химические методы исследования

Определение физико-химических характеристик воды (температура, рН, окислительно-восстановительный потенциал, минерализация, содержание сульфида, углекислоты, железа) в местах отбора проб проводили с помощью портативных приборов и стандартными методами гидрохимии (Резников и др., 1970; Намсараев и др., 2005).

Температуру и величину рН измеряли портативным прибором «РН-200» (НМ Digital, Южная Корея), минерализацию воды (М) – тестер-кондуктометром

«TDS-3» (HM Digital, Южная Корея), окислительно-восстановительный потенциал (Eh) – прибором «ORP-169B» (Kelilong, Китай).

Определение металлов в воде выполняли методом масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой и методом атомно-абсорбционной спектрометрии в Аналитическом секторе Института геохимии им. А.П. Виноградова СО РАН (г. Иркутск).

Содержание сульфидов определяли колориметрическим методом с N,N'-диметил-*para*-фенилендиамином (Практикум ..., 2005), содержание углекислоты и кислорода определяли титрованием (Резников и др., 1970).

Определение металлов в воде и образцах микробных матов и травертинов проводили методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно-связанной плазмой, методом масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой (ICP-MS) и атомной абсорбцией в Аналитическом отделе Института геохимии СО РАН (г. Иркутск).

Оптическую плотность измеряли на фотоэлектроколориметре КФК-20 (Россия) и спектрофотометре СЕСІL-1021 (Великобритания).

2.2.3. Методы определения скорости микробных процессов

Скорости микробных процессов определяли радиоизотопными методами (Горленко и др., 1999; Намсараев и др., 2003). Аликвоты микробного мата отбирали пробочным сверлом диаметром 1 см², помещали в стерильные пенициллиновые флаконы, заливали профильтрованной через фильтры с диаметром пор 0,22 мкм природной водой источника под горло и закрывали резиновыми пробками. Для определения процессов фотосинтеза во флаконы вводили шприцом 0,1 мл раствора Na¹⁴НСО₃ (активность 5 мкКи). Для ингибирования кислородного фотосинтеза во флаконе применяли диурон (3-(3,4-дихлорофенил)-1,1-диметилмочевина) в конечной концентрации 7 мкМ. Инкубировали в течение 12-24 ч на свету в воде источника и фиксировали формалином.

Для определения процесса метаногенеза во флаконы вводили шприцом 0,1 мл раствора $\text{Na}^{14}\text{HCO}_3$ (активность 5 мкКи), для определения процесса сульфатредукции – 0,2 мл раствора $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ (активность 15 мкКи). Флаконы оборачивали фольгой, инкубировали в течение 12–24 ч в воде источника и фиксировали формалином. Процесс сульфатредукции дополнительно останавливали 25% раствором ацетата цинка. Обработку фиксированных проб производили по известным методикам (Pimenov, Bonch-Osmolovskaya, 2006). Радиоактивность меченых соединений измеряли на жидкостном сцинтилляционном счетчике Rackbeta (LKB, Швеция). Количество использованного бактериями органического углерода рассчитывали по балансовым уравнениям реакций сульфатредукции и метаногенеза.

2.2.4. Методы учета численности и выделения основных групп микроорганизмов

Учет численности зеленых нитчатых бактерий (ЗНБ), зеленых серобактерий (ЗСБ), пурпурных серобактерий (ПСБ), пурпурных несерных бактерий (ПНБ), сероокисляющих бактерий (СОБ), целлюлозоразлагающих бактерий (ЦРБ), амилолитических, протеолитических, сульфатредуцирующих бактерий (СРБ), железоредуцирующих бактерий (Fe-РБ) проводили методом предельных разведений на селективных питательных средах, представленных в таблице 4.

Учет численности и выделение аноксигенных фототрофных бактерий (АФБ) проводили на жидкой и агаризованной (0,8%) модифицированной среде Пфеннига (таблица 4) (Pfennig, 1965), к которой добавляли сульфид натрия – 0,3 г/дм³ для несерных пурпурных бактерий и 0,7 г/дм³ для пурпурных и зеленых серобактерий, а также для культивирования зеленых нитчатых бактерий. Аноксигенные фототрофные бактерии выращивали анаэробно при температуре 30°C и освещенности 2000 люкс. Очистку культур проводили на агаризованной среде многократным пересевом отдельных колоний из предельных разведений.

В специальных экспериментах для выявления участия выделенных культур пурпурных несерных бактерий в «железном фотосинтезе» в среды вносили соли

закисного железа и под микроскопом наблюдали способность откладывать окислы железа культурами пурпурных бактерий.

При идентификации культур аноксигенных фототрофных бактерий принимали во внимание морфологию клеток, типы бактериохлорофиллов, способность к авто- и гетеротрофному росту на сульфиде, а также к анаэробному росту в темноте.

Таблица 4

Среды, использованные для культивирования основных групп микроорганизмов

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

Примечание: ЗНБ – зеленые нитчатые бактерии, ЗСБ – зеленые серобактерии, ПСБ – пурпурные серобактерии, ПНБ – пурпурные несерные бактерии, СОБ – сероокисляющие бактерии, СРБ – сульфатредуцирующие бактерии, ЦРБ – целлюлозоразлагающие бактерии, Fe-РБ – железоредуцирующие бактерии.

Учет численности и выделение культур сероокисляющих бактерий проводили на среде Видделя и Пфеннига (таблица 4) (Кузнецов, Дубинина, 1989). Тиосульфат и гидрокарбонат натрия стерилизовали отдельно, растворив в небольшом количестве воды, и добавляли в стерильный раствор остальных солей после охлаждения. Для получения твердой среды добавляли 1,5-2% агар «Дифко».

Культивирование проводили в стерильных пробирках, закрытых ватными пробками, при 30°C. Время инкубации составляло 5-10 дней. Во время роста культуры в качестве визуального индикатора подкисления среды добавляли 0,1% раствор бромтимолблау. При выделении чистой культуры проводили последовательные частые пересевы полученных накопительных культур большим количеством посевного материала, вносимого в свежую среду. За развитием сероокисляющих бактерий следили по накоплению биомассы, помутнению среды за счет образования серы, изменению цвета среды с сине-зеленого на желтый при изменении рН. Также в динамике развития культур сероокисляющих бактерий определяли количество сульфатов, образованных при окислении тиосульфата. В основе метода лежит свойство сульфатов образовывать нерастворимую в воде соль сульфата бария, оптическую плотность суспензии которой определяли спектрофотометрически и по стандартной кривой пересчитывали на содержание сульфатов в определяемом растворе (Практикум ..., 2005).

Учет численности и выделение сульфатредуцирующих бактерий (СРБ) проводили на жидкой и агаризованной среде Виделля и Пфеннига (таблица 4) (Кузнецов, Дубинина, 1989). После стерилизации и охлаждения к 1 дм³ основной среды добавляли в виде стерильных растворов: FeSO₄·7H₂O – 0,1 г; Na₂CO₃·10H₂O – 0,57 г; дрожжевой экстракт – 0,1 г. Серноокисное железо добавляли в виде раствора в 1% серной кислоте. Для создания низкого окислительно-восстановительного потенциала среды добавляли 1 г/дм³ Na₂S·9H₂O. В качестве субстратов использовали растворы лактата и ацетата натрия. Для получения агаризованной среды добавляли 1,5-2% агар «Дифко». Реакцию среды доводили до 7,0-7,5 при 25°C, нейтрализуя 5%-ными растворами HCl или NaOH. Культивирование проводили в стерильных пенициллиновых флаконах, заполненных доверху средой. Инкубировали 10-14 дней в термостатах при 30°C. О росте СРБ судили по образованию черного осадка сульфида железа и измерению количества образованного сульфида (Практикум ..., 2005).

Учет численности и выделение аэробных гидролитических бактерий проводили на элективной среде Пфеннига (таблица 4) (Pfennig, 1965). В качестве

субстратов вносили: 1,5% пептона для протеолитиков; 1,5% крахмала для амилолитиков; полоску фильтровальной бумаги (0,5 см×10 см) для целлюлозоразлагающих бактерий. Инкубировали в термостатах при 30°C в течение 5-14 суток. Для получения агаризованной среды добавляли 1,5-2% агар «Дифко». Значения рН сред устанавливали близкими к значениям рН природного источника при температуре 25°C, нейтрализуя 10%-ными растворами HCl или Na₂CO₃. Рост амилолитических и протеолитических бактерий наблюдали по помутнению среды и накоплению биомассы. Рост целлюлозоразлагающих бактерий учитывали визуально по разложению полоски фильтровальной бумаги. Выделение чистых культур, полученных путем последовательных пересевов методом предельных разведений, производили на среде с субстратом натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы (Na-КМЦ) в количестве 3 г/л и с последующим выделением колоний на агаризованной среде Пфеннига.

Учет численности и культивирование железooksисляющих бактерий (Fe-ОБ) проводили на жидкой и агаризованной среде следующего состава (г вещества на 1 дм³ дистиллированной воды): (NH₄)₂SO₄ – 0,5; NaNO₃ – 0,5; K₂HPO₄ – 0,5; MgSO₄·7H₂O – 0,5; лимонная кислота – 10, сахароза – 2; триптон – 1; FeSO₄·5H₂O – 5,9 (Захарова, Парфенова, 2007). Значение рН среды доводили гидроксидом натрия до 6,8–7,0. Для получения агаризованной среды добавляли 1,5-2% агар «Дифко». Инкубировали 7-10 дней в термостатах при 30°C.

Учет численности и выделение железоредуцирующих бактерий проводили на вышеприведенной среде Видделя и Пфеннига (таблица 4) (Кузнецов, Дубинина, 1989) с добавлением в качестве акцептора электронов: 10 мМ раствора цитрата железа (III) или нерастворимого слабокристаллического оксида железа (III) – ферригидрита (конечная концентрация Fe (III) в среде – 90 мМ). Нерастворимый слабокристаллический оксид Fe (III) получали по методике описанной ранее (Slobodkin et al., 1997). В качестве донора электронов вносили смесь 10% растворов ацетата и лактата натрия и 10% раствор пептона. Значения рН среды устанавливали близкими к 7,0-7,5 при температуре 25°C, нейтрализуя 10%-ными растворами HCl или Na₂CO₃. Культивирование проводили в

стерильных пенициллиновых флаконах, заполненных доверху средой. О развитии железоредуцирующих микроорганизмов в первичных накопительных культурах на среде со слабокристаллическим оксидом железа (III) судили по образованию чёрного осадка магнетита или сидерита, а на цитрате железа (III) – по обесцвечиванию среды после инкубации культур в течение 14-21 суток в термостатах при 30°C.

2.2.5. Методы изучения культуральных и физиолого-биохимических свойств бактерий

Культуральные и физиолого-биохимические свойства выделенных культур исследовали по стандартным методикам (Методы ..., 1984; Практикум ..., 2005). Температурные интервалы развития бактерий устанавливали в градиентном политермостате (Юрков и др., 1991). Оптимум и пределы развития pH определяли внесением растворов бикарбоната и карбоната натрия или буферных растворов. Зависимость роста бактерий от солёности изучали внесением хлорида натрия в концентрации 0-50 г/дм³.

Для определения спектра используемых субстратов применяли минеральную питательную среду, на которой были выращены исследуемые бактерии. Готовили отдельно в стеклянных флаконах 5% растворы субстратов, нейтрализовали и автоклавировали при давлении 0,5 атм. Конечная концентрация субстратов составляла 0,3 и 0,5 г/дм³ среды.

2.2.6. Электронно-микроскопические методы

Изучение морфологии клеток, контроль чистоты культур и оценку роста микроорганизмов проводили микроскопированием образцов с помощью световых микроскопов Axiostar PLUS (Carl Zeiss, Германия) и BX41 (Olympus, Япония), снабженных фазово-контрастным устройством и фотодокументирующей системой, при 100-кратном увеличении объектива (общее увеличение 1000).

При приготовлении препаратов целых клеток для электронной микроскопии материал, нанесенный на сеточку с формваровой пленкой, контрастировали 0,2%

водным раствором уранилацетата. Препараты для исследования ультратонкого строения бактериальных клеток готовили по методу Келленберга. Для контрастирования использовали реактив Рейнольдса (Reynolds, 1963). Тотальные препараты и ультратонкие срезы изучали при помощи трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) на электронном микроскопе Jeol JEM 100С (Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ.

Исследование поверхности и элементного состава микробных матов и пленок, образовавшихся при культивировании аэробных сероокисляющих бактерий, проводили с помощью сканирующего электронного микроскопа SEM ТМ-1000 (НИТАСНИ, Япония).

2.2.7. Методы изучения пигментного состава

Пигментный состав фототрофных бактерий определяли по положению максимумов на спектрах поглощения пигментов микробного мата и в препаратах целых клеток с глицерином (1:1). Клетки предварительно разрушали на ультразвуковой установке УЗДН-2Т (22 кГц) в течение 1 мин при 4°C. Разрушенные клетки осаждали центрифугированием при 7000 g в течение 5 мин. Спектры поглощения пигментов снимали на спектрофотометре ЛОМО СФ 56 (Санкт-Петербург, Россия).

2.2.8. Молекулярно-биологические методы

ДНК клеток монокультур нитчатых АФБ выделяли с помощью ЦТАБ-метода с незначительными изменениями (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 сероокисляющих и сульфатредуцирующих бактерий проводили посредством анализа последовательностей генов 16S рРНК и *fmoA* (Fenna–Matthews–Olson protein) в ЦКП «Биоинженерия» Института Биоинженерии, ФИЦ Биотехнологии РАН (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 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» (Axugen, США) с учетом предложенных ранее модификаций (Белькова, 2009). Метагеномный анализ V3-V4 переменных районов 16S рРНК проведен на секвенаторе «MiSeq» (Illumina, США) в центре коллективного пользования «Геномика» (г. Новосибирск). Для анализа были использованы универсальные праймеры (на основные филумы доменов *Bacteria* и *Archaea*) 343F (5'-CTCCTACGRRSGCAGCAG-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>).

2.2.9. Методы статистической обработки результатов

Статистическую обработку данных проводили по стандартным методикам (Гланц, 1998) с использованием программного пакета Microsoft Excel 2010 для Windows 7. Для полученных данных рассчитывали среднее значение и стандартное отклонение.

Для сравнения микробного сообщества использовали диаграммы Венна, которые были построены с помощью графического редактора SmartArt. Расчеты выполняли в Excel 2010 с использованием макросов.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Экологические условия среды обитания микробных сообществ минеральных источников Восточного Саяна

Минеральные источники Хойто-Гол имеют 5 выходов с термальной (32,5-34,0°C) водой вдоль берега р. Аршан. Все выходы воды имеют нейтральные или слабощелочные значения pH (таблица 5).

Таблица 5

Физико-химические параметры минерального источника Хойто-Гол

Станция	Описание микробных матов	t, °C	pH	[H ₂ S], мг/л	[CO ₂], мг/дм ³	[Fe _{общ}], 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.

Низкий окислительно-восстановительный потенциал (от -23 до -130 мВ) обусловлен, скорее всего, наличием сероводорода, поступающего с вулканическими эксгаляциями, а также из донных осадков в процессе сульфатредукции. Содержание сероводорода колебалось от 0,52 до 7,05 мг/дм³. По литературным данным содержание сульфида может достигать 20 мг/л (Данилова и др., 2009). Концентрация железа в них не превышала 0,6 мг/дм³.

Тип воды источника Хойто-Гол – гидрокарбонатно-натриевый. Содержание HCO_3^- составляло более 400 мг/дм³ (таблица 6), содержание CO_2 варьировало от 12,7 до 57,0 мг/дм³ (таблица 5). Концентрация SO_4^{2-} -ионов достигала 33 мг/дм³, а Cl^- – 24 мг/дм³. Ионы фосфатов, нитратов и нитритов присутствовали в наименьшем количестве. Среди катионов преобладали ионы Na^+ (143-149 мг/дм³), в меньшем количестве присутствовали ионы K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} . В воде источника Хойто-Гол обнаружено значительное количество кремния и лития (таблица 6), их содержание было ниже предельно допустимых концентраций.

Таблица 6

Химический состав вод источников Хойто-Гол и Жойган, мг/дм³

Компоненты состава воды	Hg1	Hg2-1	Jg1	Jg10	Jg12
HCO_3^-	417,95	435,45	1537	1970	1824
SO_4^{2-}	32,92	32,76	5,4	10,3	8,6
Cl^-	24,15	23,91	19,4	34,0	24,45
NO_3^-	0,01	0,01	2,4	0,8	1,0
Na^+	143,00	149,00	282,0	347,5	314,35
K^+	16,00	16,30	45,7	53,9	49,8
Ca^{2+}	11,60	12,40	180,2	284,0	268,7
Mg^{2+}	4,60	4,60	27,1	34,2	29,5
Si	0,52	21,47	24,8	23,2	25,15
Li	0,53	0,52	0,85	0,91	1,06

Минеральные источники Жойган отличаются от источника Хойто-Гол крайне низким содержанием сульфида (таблица 7). Они имеют более 30 выходов углекислых минеральных вод с максимальной температурой воды до 42°C. Для исследования были выбраны 7 выходов, в которых образовывался вторичный сульфид или наблюдалось отложение окисного железа (таблица 7). Температура в местах отбора проб варьировала от 22,6 до 35,7°C, значения pH воды были нейтральные. Окислительно-восстановительный потенциал варьировал от -68 до +112 мВ. Отрицательные значения Eh обнаружены в источниках с небольшим содержанием сероводорода (меньше 1 мг/дм³), вода данных источников имела восстановительную среду.

Таблица 7

Физико-химические параметры минерального источника Жойган

Станции	Описание проб	t, °C	pH	[H ₂ S], мг/ дм ³	[CO ₂], 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 Воронка с мутной водой	ил серо-голубого цвета	29,4	7,13	н.о.	387,0	2,8	17,5

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

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), что связано с образованием нерастворимого сульфида железа.

По химическому составу минеральные источники Жойган в основном относились к гидрокарбонатным кальциево-натриевым. Содержание CO₂ варьировало от 203,5 до 379,5 мг/дм³ (таблица 7). Содержание гидрокарбонатов достигало 1970 мг/дм³, сульфатов – 10,3 мг/дм³ (таблица 6). Максимальное значение хлоридов достигало 34 мг/дм³. Ионы фосфатов, нитратов и нитритов присутствовали в наименьшем количестве. Среди катионов преобладали натрий и кальций, содержание которых достигало 348 и 284 мг/дм³, соответственно. Содержание лития и кремния немного выше, чем в водах источника Хойто-Гол.

Таким образом, исследуемые минеральные источники можно отнести к субтермальным нейтральным слабоминерализованным водам.

3.2. Микробные маты минеральных источников Хойто-Гол и Жойган

Физико-химические факторы, такие как температура, pH, освещение, содержание сероводорода и сульфидных ионов и другие, определяют разнообразие и формирование различных типов микробных сообществ (Намсараев и др., 2011). В циано-бактериальном мате взаимодействуют представители разных трофических групп, осуществляя полный цикл биогенных элементов (Заварзин, 2003).

В ложе источников Хойто-Гол и Жойган образовывались микробные маты толщиной от 0,5 до 2 см, в которых основная матобразующая и продукционная функция принадлежала цианобактериям. Аноксигенные фототрофные бактерии в значительном количестве присутствовали в составе микробных матов, играя роль вторичных продуцентов органического вещества или потребителей органических субстратов, в случае фотогетеротрофного роста.

Микробные маты минерального источника Хойто-Гол. Присутствие сероводорода, поступающего с вулканическими эксгаляциями, является

характерной особенностью минеральных источников Хойто-Гол, в которых активно развивались зеленые и серные микробные маты.

В зоне выходов и вниз по ручью исследуемого источника Хойто-Гол развивались микробные маты толщиной до 2 см, которые были представлены зоной кислородного фотосинтеза с преобладающим развитием зеленых скоплений цианобактерий и зоной развития серных бактерий.

На верхнем выходе Нг1 и выходе питьевого источника Нг3 развивались тонкие микробные маты зеленого цвета толщиной 1–2 мм, на выходе Нг2 микробный мат был толще – до 5 мм. 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 с максимумом при 675 нм (рисунок 9).

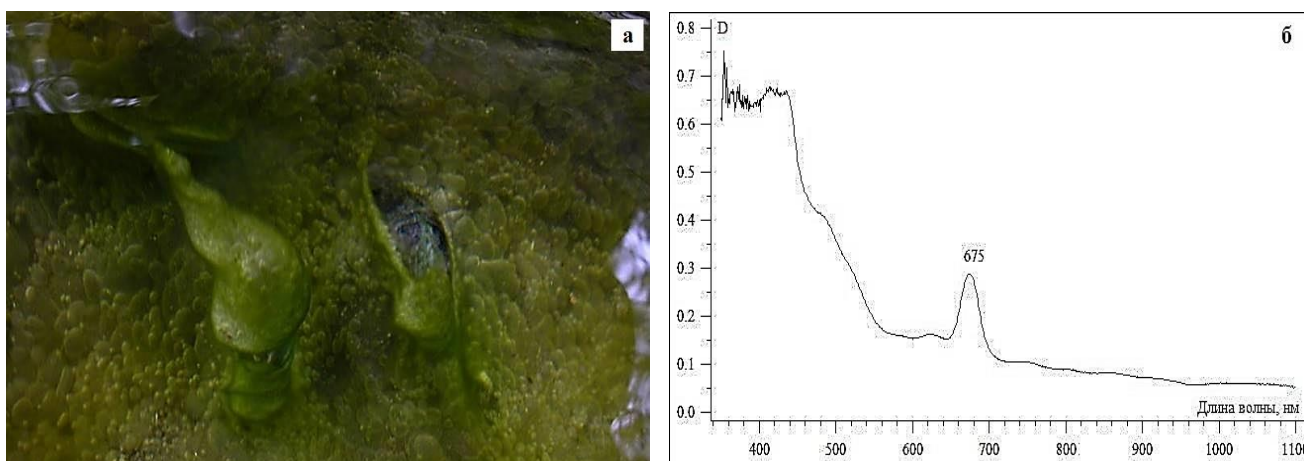


Рисунок 9. (А) Микробный мат со станции Нг2. (Б) Спектр поглощения микробного мата

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 нитчатых цианобактерий *Phormidium* sp. и бесцветных серобактерий *Thiothrix* sp. (рисунок 10). Видовой состав цианобактерий увеличивается за счет появления *Oscillatoria* sp., *Gloeocapsa magma* и *Synechococcus* sp. (таблица 8).

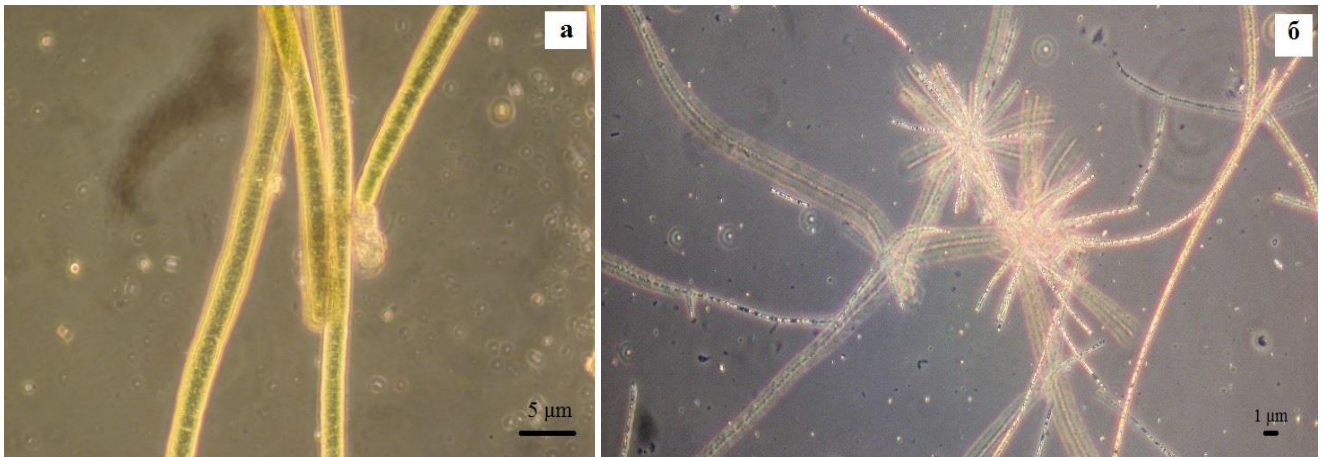


Рисунок 10. (А) Морфология нитчатых цианобактерий *Phormidium* sp. (Б) Морфология бесцветных серобактерий *Thiiothrix* sp.

Спектры поглощения пигментов из микробных матов показывают наличие цианобактерий с хлорофиллом α (максимум поглощения при 674 нм) и АФБ, содержащих ответственные за поглощение света бактериохлорофиллы (рисунок 11). Максимум инфракрасного поглощения в клетке при 745 нм характерен для бактериохлорофилла c , имеющегося у всех зеленых серобактерий класса *Chlorobi* и у некоторых нитчатых аноксигенных фототрофов класса *Chloroflexia*. Пики 805 нм и 875 нм на спектрах поглощения пигментов в клетке указывают на присутствие бактериохлорофилла a , преобладающего у большинства пурпурных фототрофных бактерий, у всех зеленых серобактерий и нитчатых аноксигенных фототрофных бактерий.

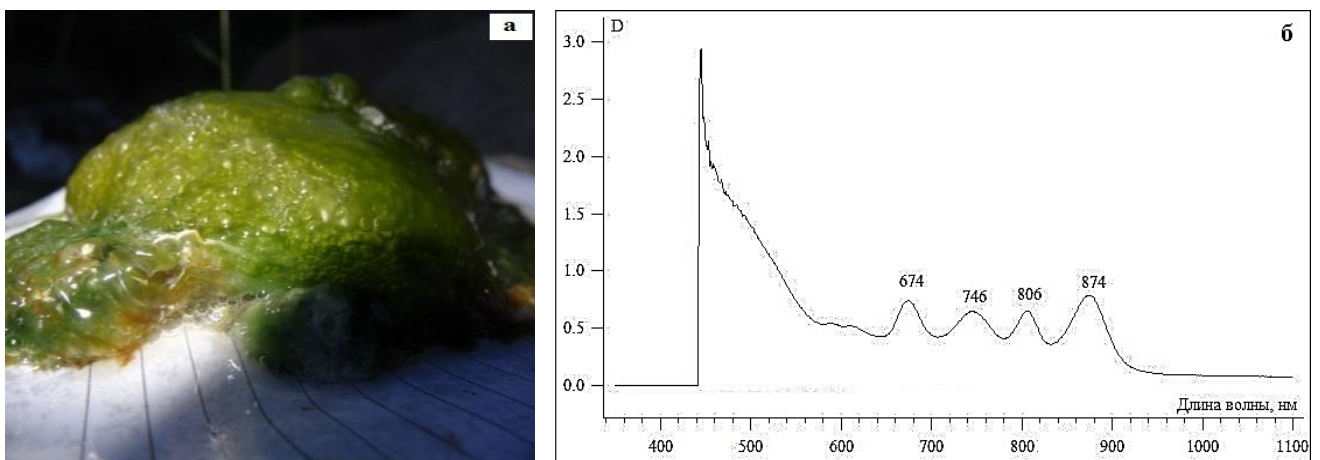


Рисунок 11. (А) Микробный мат со станции Hg2-1. (Б) Спектр поглощения микробного мата.

Видовой состав цианобактерий в микробных матах минеральных источниках
Хойто-Гол и Жойган

Таксон	Хойто-Гол	Жойган
<i>Amorfonostoc punctiforme f. populorum</i>	+	
<i>Anabaena sp.</i>	+	+
<i>Cylindrospermum gredarium</i>		+*
<i>Oscillatoria tenuis</i>		+*
<i>Oscillatoria telebriformis</i>	+	+
<i>Phormidium angustissimum</i>	+	
<i>Phormidium foveolarum</i>	+	
<i>Phormidium laminosum</i>		+
<i>Phormidium molle</i>	+*	
<i>Phormidium subliforme</i>	+	
<i>Phormidium termophilum</i>	+	
<i>Phormidium valderiae</i>		+*
<i>Synechococcus sp.</i>	+	+
<i>Gloeocapsa magma</i>	+	
<i>Microcystis firma</i>	+*	
Количество видов	11	7

Примечание: «+» – доминирующий вид.

Появлению в составе микробного мата бесцветных серобактерий *Thiothrix sp.* способствовало развитие мата в условиях проточной воды, что необходимо для создания градиента сероводорода и кислорода (Заварзин, 1972). На поверхности микробного мата формируются белые минеральные отложения. Результаты исследования элементного состава показали, что они состоят из элементной серы, содержание которой достигает 99% (рисунок 12). Бесцветные серобактерии участвуют в аккумуляции и кристаллизации серы и играют важную роль в поведении системы в целом, так как в ночное время окисление соединений серы оказывается основной статьей расхода кислорода (Заварзин, 2003; Лазарева и др., 2010).

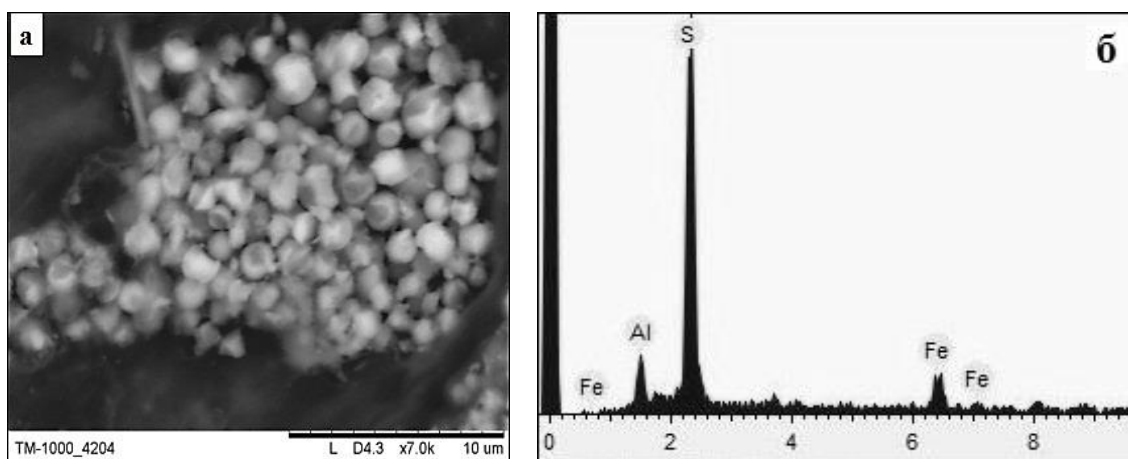


Рисунок 12. Поверхность микробного мата со станции Нг2-1: 1 – минеральные отложения, формирующиеся на поверхности мата; 2 – элементный состав минеральных отложений

Микробные маты минерального источника Жойган. В минеральных источниках Жойган тонкие и рыхлые маты светло-зеленого и зеленого цветов толщиной до 0,5 см наблюдались только в некоторых выходах: Jg1, Jg9, Jg10, Jg12. В составе матов доминировали цианобактерии родов *Phormidium* и *Oscillatoria*, содержащие хлорофилл *a* (674 нм).

В нижних микроразделах микробных матов в непосредственной близости к зоне активных деструкционных процессов, ведущих к образованию сероводорода и подкислению среды, развивались аноксигенные фототрофные бактерии. Спектры поглощения пигментов из микробных матов показывают наличие цианобактерий с хлорофиллом *a* (максимум поглощения при 674 нм) и аноксигенных фототрофных бактерий, содержащих ответственные за поглощение света бактериохлорофиллы (рисунок 13). На поверхности микробных матов развивались диатомовые водоросли *Pinnularia* sp.

В местах интенсивного окисления железа в донных отложениях гидротерм Жойган было обнаружено множество перекрученных ожелезненных нитей железобактерий *Gallionella* sp., указывающие на присутствие микроорганизмов цикла железа (рисунок 14).

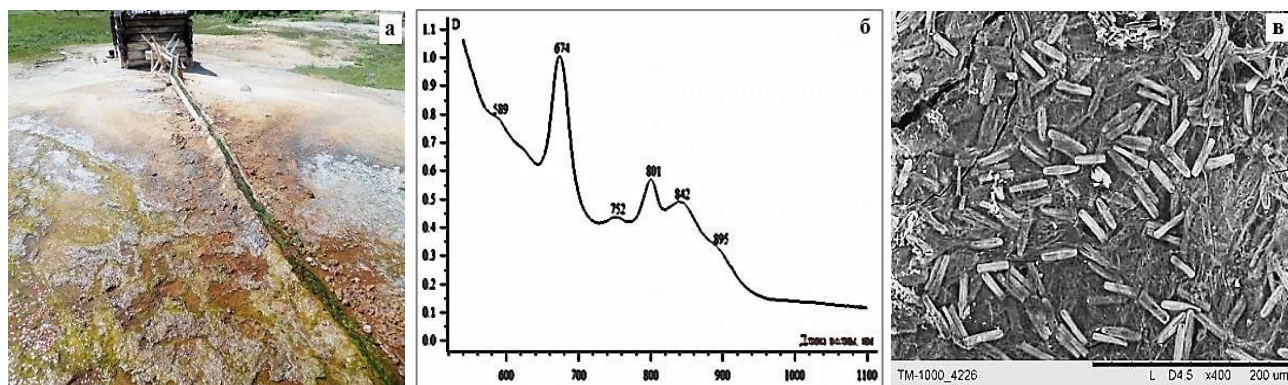


Рисунок 13. Микробные сообщества источника Жойган (станция Jg12): а – травертиновое поле с микробными матами и охристыми отложениями; б – спектр поглощения микробного мата; в – поверхность микробного мата с клетками диатомовых водорослей *Pinnularia* sp. и нитчатых цианобактерий

В местах интенсивного окисления железа в донных отложениях гидротерм Жойган было обнаружено множество перекрученных ожежененных нитей железобактерий *Gallionella* sp., указывающие на присутствие микроорганизмов цикла железа (рисунок 14).

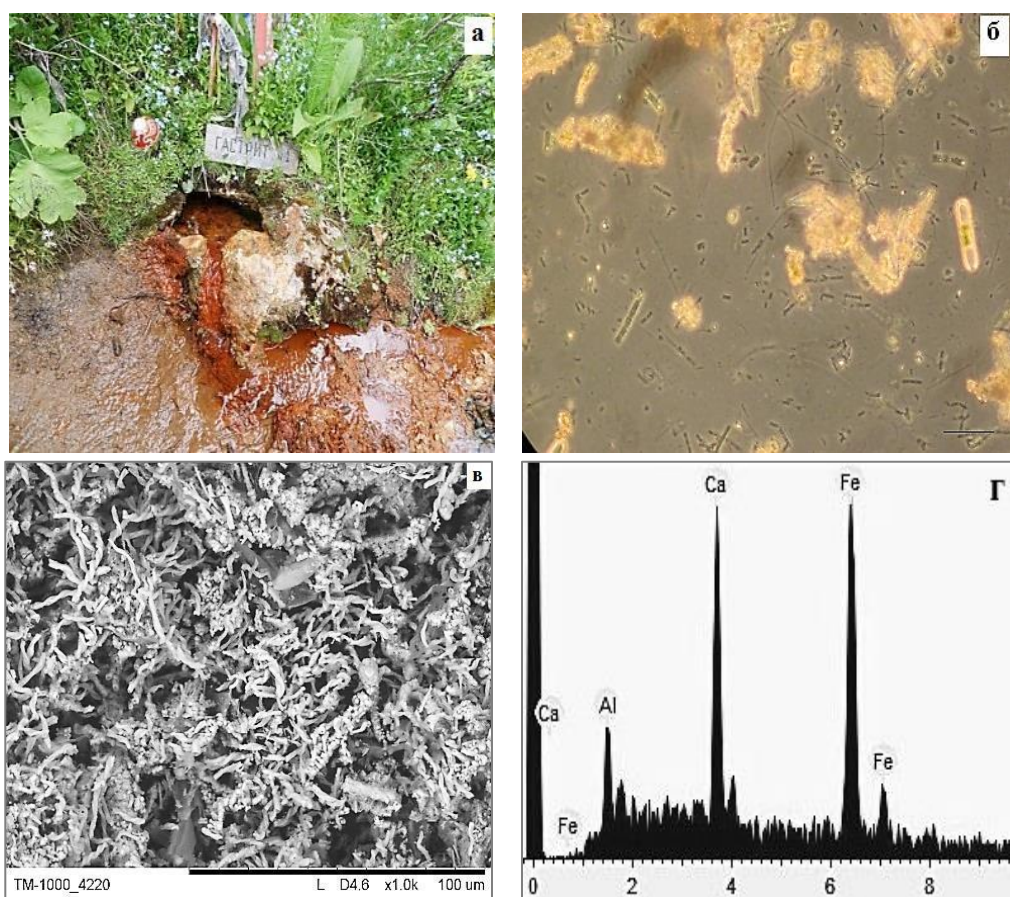


Рисунок 14. Микробные сообщества источника Жойган (станция Jg1): а – выход зелеными матами и с бурым илом; б – сообщество мата, состоящее из диатомей, нитчатых цианобактерий и аноксигенных фототрофов, орудненных клеток бактерий; в - перекрученные ожежененные нити железобактерий *Gallionella* sp. на поверхности мата; г - элементный состав минеральных отложений

Таким образом, можно заключить, что физико-химические условия в исследованных источниках Хойто-Гол и Жойган различались по содержанию сульфида и железа, что отражалось на видовом составе формирующихся микробных матов. В микробных матах минерального источника Хойто-Гол основными формообразующими бактериями являлись цианобактерии *Phormidium* sp. и бесцветные серобактерии *Thiothrix* sp., а в микробных матах минерального источника Жойган – цианобактерии родов *Phormidium* и *Oscillatoria*, диатомовые водоросли *Pinnularia* sp. и железобактерии *Gallionella* sp.

3.3. Продукция и деструкция органического вещества в минеральных источниках Хойто-Гол и Жойган

Интенсивность продукции и деструкции органического вещества в гидротермах Хойто-Гол. Скорость общего фотосинтеза в микробных матах по изливу ручья была равна 0,17–7,61 мгС/(дм³·сут), скорость аноксигенного фотосинтеза составила 0,09–4,8 мгС/(дм³·сут) (таблица 9). Значения продукционных процессов исследуемого источника значительно ниже, чем в гидротермах Байкальской рифтовой зоны (Брянская и др., 2006, Намсараев и др., 2011), Камчатки (Горленко, Бонч-Осмоловская, 1989) и Йеллоустоуна (Revsbech, Ward, 1984; Ferris et al., 1997). Скорость оксигенного и аноксигенного фотосинтеза в микробных матах щелочного Уринского источника (Байкальская рифтовая зона) варьирует в широких пределах и достигает значений 2,1 гС/(м² сут) и 0,42 гС/(м² сут), соответственно. Скорость оксигенного фотосинтеза в источниках Термофильный (Камчатка) и Октопус Спринг (Йеллоустоун) достигали 2,3 гС/(м² сут) и 5,4 гС/(м² сут), соответственно.

В микробных матах темновая фиксация CO₂ составила 0,16–1,63 мгС/(дм³·сут) и показывает, что цианобактерии и аноксигенные фототрофные бактерии могут развиваться и в темноте. Хемосинтез в микробных матах протекал со скоростью 0,05–1,43 мгС/(дм³·сут), а гетеротрофная ассимиляция углекислоты варьировала от 0,05 до 0,78 мгС/(дм³·сут), что показывает присутствие значительного количества автотрофных и гетеротрофных бактерий.

Таблица 9

Скорость процессов продукции и деструкции органического вещества в гидротермах Хойто-Гол

Тип пробы	Фотосинтез, мгС/(дм ³ ·сут)		Темновая фиксация СО ₂ , мгС/(дм ³ ·сут)	Хемосинтез, мгС/(дм ³ ·сут)	Гетеротрофная ассимиляция СО ₂ , мгС/(дм ³ ·сут)	Сульфатредукция		Метаногенез	
	Общий	Анокси- генный				мгS/ (дм ³ ·сут)	Расход С, мгС/(дм ³ ·сут)	мгС/(дм ³ ·сут)	Расход С, мгС/(дм ³ ·сут)
Hg1 Зеленый мат	2,36	1,71	0,49	0,24	0,26	0,04	0,03	0,02	0,10
Hg2 Темно- зеленый мат	7,61	3,4	1,62	1,43	0,19	0,28	0,21	0,06	0,23
Hg2-1 Зеленый мат с белыми и рыжими обрастаниями	6,03	3,2	1,53	1,16	0,37	0,42	0,32	0,001	0,005
Hg2-2 Серный мат с зелеными вкраплениями	0,17	0,09	0,05	0,03	0,02	0,93	0,70	-	-
Hg2-3 Зеленый мат с белыми обрастаниями	5,99	0,58	0,16	0,62	0,78	0,27	0,25	-	-

В микробных матах исследуемого источника также были изучены терминальные процессы анаэробной деструкции органического вещества – сульфатредукция и метаногенез. Образование первичными анаэробами низкомолекулярных органических веществ, присутствие сульфатов биогенного и абиогенного происхождения, способствуют активной деятельности сульфатредуцирующих бактерий. Скорость сульфатредукции в микробных матах исследуемого источника составила 0,04–0,93 мгS/(дм³·сут), что способствует созданию благоприятных условий для активного функционирования микроорганизмов круговорота серы в сообществе. Расчеты показали, что количество использованного бактериями органического вещества в процессе сульфатредукции составило 0,03–0,70 мгC/(дм³·сут).

Скорость метаногенеза была намного ниже. Скорость деструкции органического вещества в процессе метаногенеза достигала 0,23 мгC/(дм³·сут). По сравнению с ранее полученными данными (Данилова и др., 2009) процессы анаэробной деструкции протекали интенсивнее. Количественная оценка деятельности микроорганизмов показывает, что на терминальном этапе деструкции большая часть органического вещества источников Хойто-Гол используется сульфатредуцирующими бактериями.

Интенсивность бактериальной продукции и деструкции органического вещества в гидротермах Жойган. В донных осадках и микробных матах гидротерм Жойган определены скорости микробных процессов продукции (оксигенного и аноксигенного фотосинтеза, темновая фиксация и хемосинтез) и деструкции (сульфатредукция, метаногенез и гетеротрофная ассимиляция углекислоты) органического вещества (таблица 10). В микробных матах скорость оксигенного фотосинтеза варьировала от 0,19 мгC/(дм³·сут) в черном мате до 8,67 мгC/(дм³·сут) в желтом мате и была сопоставима с активностью фототрофов в гидротермах Баргузинской долины. В илах скорость оксигенного фотосинтеза была невысока (0,06–0,47 мгC/(дм³·сут)). Активность аноксигенных фототрофов также была выше в матах, варьируя от 1,7 до 17,24 мгC/(дм³·сут).

Таблица 10

Скорость процессов продукции и деструкции органического вещества в гидротермах Жойган

Тип пробы	Фотосинтез, мгС/(дм ³ ·сут)		Темновая фиксация СО ₂ , мгС/(дм ³ ·сут)	Хемосинтез, мгС/(дм ³ ·сут)	Гетеротрофная ассимиляция СО ₂ , мгС/(дм ³ ·сут)	Сульфатредукция		Метаногенез	
	Окси- генный	Анокси- генный				мгS/ (дм ³ ·сут)	Расход С, мгС/(дм ³ ·сут)	мгС/(дм ³ ·сут)	Расход С, мгС/(дм ³ ·сут)
Jg1 бурый ил и зеленый мат	1,13	0,66	1,15	0,58	0,57	0,01	0,01078	-	-
Jg10 светло- зеленый мат	3,82	1,70	1,42	0,69	2,11	0,03	0,02306	-	-
Jg10 бурый ил	0,58	0,45	1,04	0,31	0,73	0,18	0,13474	-	-
Jg9 желтый мат	25,91	17,24	3,80	2,11	1,69	0,3102	0,23265	0,015	0,06
Jg9 ил	1,96	1,34	2,37	1,51	0,86	0,02	0,16	0,02	0,08
Jg12 зеленый мат	4,34	2,41	2,61	2,20	0,41	0,16	0,125	0,27	1,07
Jg12 черный мат	0,98	0,79	0,20	0,04	0,20	0,0142	0,01064	0,12	0,50
Jg19 «молочная ванна» ил	-	-	0,16	0,09	0,07	0,00579	0,00435	0,01	0,04
Jg21 «молодость» ил	0,06	0,43	0,73	0,30	0,43	0,0041	0,0031	-	-

Темновая фиксация углекислоты достигала наибольших значений в пробе осадка и мата с небольшим содержанием сульфида, составляя 3,8 мгС/(дм³·сут). Интенсивность процессов деструкции была значительно ниже, чем в уже исследованных гидротемах Баргузинской долины и варьировала от 0,004 до 0,18 мгS/(дм³·сут) в илах и от 0,01 до 0,31 мгS/(дм³·сут) в микробных матах.

3.4. Состав микробных сообществ на основании анализа последовательностей нуклеотидов гена 16S рРНК

В образцах воды, микробных матов и ила из минеральных источников Хойто-Гол и Жойган было определено таксономическое разнообразие прокариот. В результате анализа полученных последовательностей гена 16S рРНК были определены флотипы, принадлежащие домену *Bacteria* и *Archaea*. В таблице 11 показано количество определенных последовательностей, количество флотипов (операционная таксономическая единица ОТЕ) и индексы разнообразия на разных уровнях кластерного расстояния: 0,03 (97%) – вид, 0,05 (95%) – род, 0,1 (90%) – семейство. Видовое разнообразие сообщества образцов источника Жойган по индексу Шеннона и Chaol было больше, чем в образцах источника Хойто-Гол (таблица 11). Число определенных флотипов увеличивалось линейно. Кривые накопления 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 (рисунок 15).

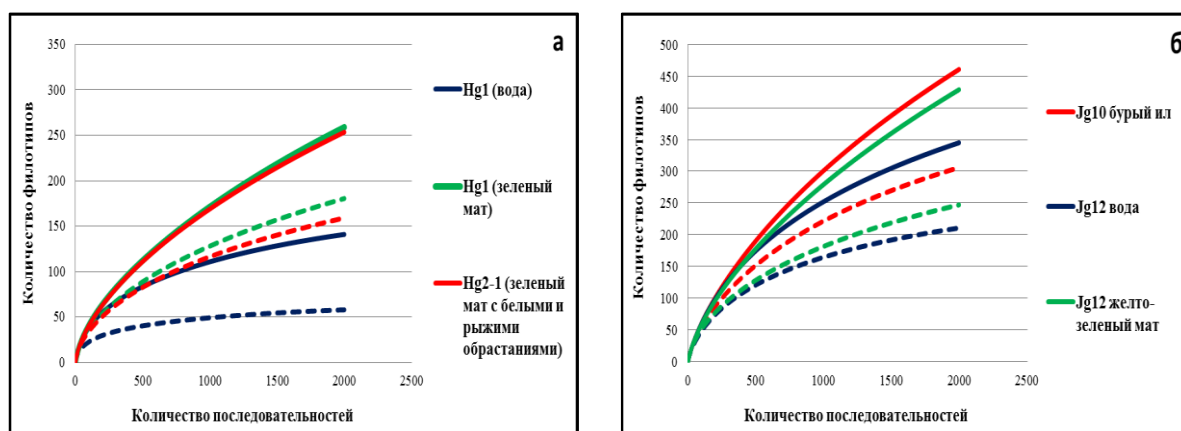


Рисунок 15. Rarefaction анализ микробных сообществ минеральных источников Хойто-Гол (а) и Жойган (б). Показана зависимость количества флотипов на уровне родов (сплошные линии) и семейств (пунктирные линии) кластерного расстояния от количества проанализированных последовательностей 16S рРНК

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

Источник	Образец	Дистанция	Количество последовательностей	Количество филогенов (ОТЕ)	Индексы 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. В водном микробном сообществе источника Хойто-Гол (Hg1) определено 12 бактериальных филумов, среди которых численно доминировали четыре филума (рисунок 16а): *Proteobacteria* (63,7% от общего числа последовательностей), *Bacteroidetes* (28,6%), *Actinobacteria* (3,6%) и *Firmicutes* (3,5%). На более низком таксономическом уровне преобладали широко распространенные в водных экосистемах микроорганизмы: *Acinetobacter*, *Pedobacter*, *Brevundimonas*, *Flavobacterium*, *Serratia*, *Sphingomonas*, *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Sphingobium*.

Они обладают высоким адаптационным потенциалом для выживания в различных, в том числе и экстремальных условиях и в водных экосистемах обычно осуществляют деструкцию органических соединений.

В образце зеленого микробного мата (Hg1) было выявлено 26 филумов домена *Bacteria* (рисунок 16а). Среди них доминировали представители филума *Proteobacteria* (45,0%), участвующие в процессах окисления и восстановления соединений серы: сероредуцирующие бактерии *Sulfurospirillum* (38,7%, класс *Epsilonproteobacteria*), *Geobacter* (2,5%, класс *Deltaproteobacteria*), сероокисляющие бактерии *Thiothrix* (4,8%, класс *Gammaproteobacteria*), *Thiobacillus* (0,4%, класс *Betaproteobacteria*), *Sulfuricurvum* (0,5%, класс *Epsilonproteobacteria*), *Thiofaba* (0,2%, класс *Gammaproteobacteria*), сульфатредуцирующие бактерии *Desulfovibrio* (0,3%, класс *Deltaproteobacteria*), *Desulfobulbus* (0,1%, класс *Deltaproteobacteria*), тиосульфат-окисляющие бактерии *Thiomonas* (0,2%), аноксигенные фототрофные бактерии *Chlorobaculum* (0,3%, класс *Chlorobia*), *Rhodobacter* (1,2%, класс *Alphaproteobacteria*), *Thiocapsa* (0,1%, класс *Gammaproteobacteria*) и др. (таблица 12).

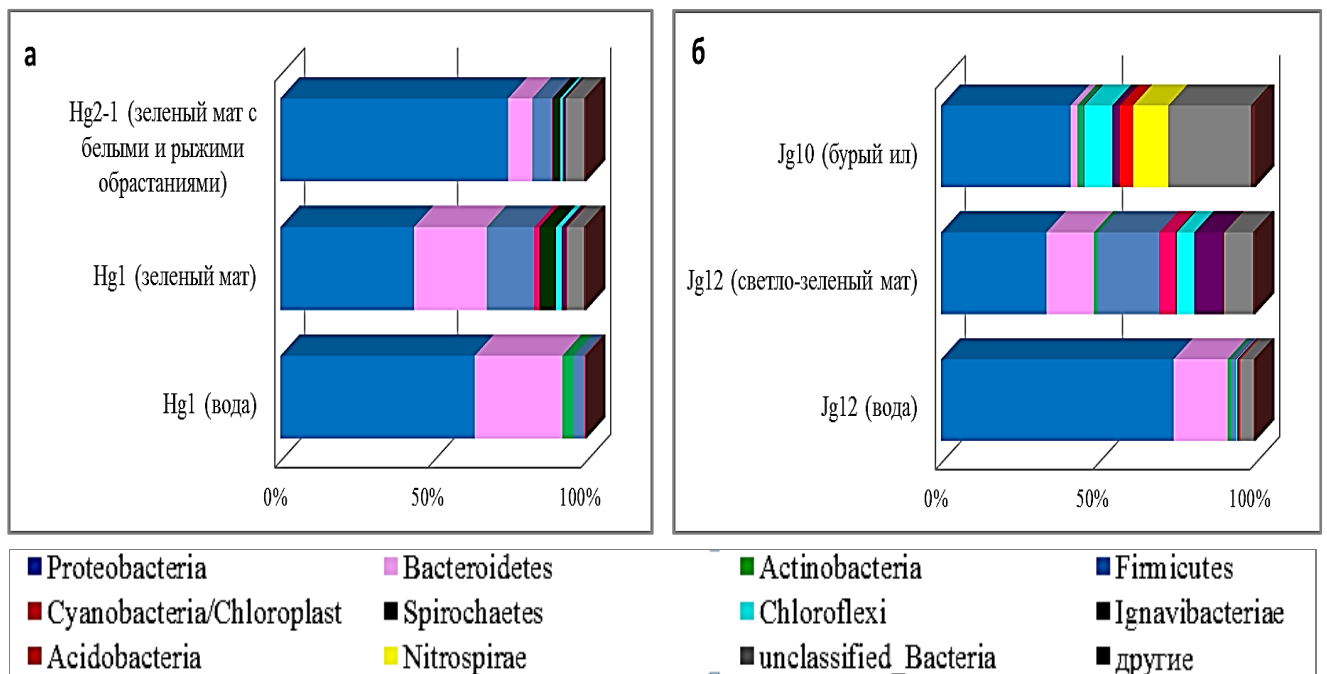


Рисунок 16. Таксономическое разнообразие прокариот, полученное по результатам метагеномного анализа ампликона гена 16S рРНК: а – источник Хойто-Гол, б – источник Жойган

Сравнительная характеристика представленности функционально значимых фило типов бактерий серного цикла и аноксигенных фототрофных бактерий в микробных сообществах источников Хойто-Гол и Жойган
(число последовательностей, шт.)

Название фило типа	Источник Хойто-Гол			Источник Жойган		
	Hg1 (вода)	Hg1 (зеленый мат)	Hg3 (зеленый мат с белыми и рыжими обрастаниями)	Jg10 (бурый ил)	Jg12 (вода)	Jg12 (желто- зеленый мат)
Сероредуцирующие бактерии						
<i>Sulfurospirillum</i> (сем. <i>Campylobacteraceae</i> , <i>Epsilonproteobacteria</i>)	1	11723	189	1	0	10
<i>Geobacter</i> (сем. <i>Geobacteraceae</i> , <i>Deltaproteobacteria</i>)	1	764	288	218	4	638
Сульфатвосстанавливающие бактерии – <i>Deltaproteobacteria</i>						
<i>Desulfovibrio</i> (сем. <i>Desulfovibrionaceae</i>)	0	98	135	3	48	20
<i>Desulfobulbus</i> (сем. <i>Desulfobulbaceae</i>)	0	38	2	2	0	1
<i>Desulfomonile</i> (сем. <i>Syntrophaceae</i>)	8	11	11	3	0	0
<i>Syntrophobacter</i> (сем. <i>Syntrophobacteraceae</i>)	0	7	0	1	0	0
<i>Desulfobacterium</i> (сем. <i>Desulfobacteraceae</i>)	0	7	0	0	0	0
<i>Desulfocapsa</i> (сем. <i>Desulfobulbaceae</i>)	0	5	10	0	0	0
<i>Desulfovirga</i> (сем. <i>Syntrophobacteraceae</i>)	0	2	0	0	0	0
<i>Desulfuromonas</i> (сем. <i>Desulfuromonadaceae</i>)	0	2	0	0	0	92
Сероокисляющие (тионовые) бактерии						
<i>Thiobacillus</i> (сем. <i>Hydrogenophilaceae</i> , <i>Betaproteobacteria</i>)	6	112	28	2	0	0
<i>Thiomonas</i> (сем. <i>Burkholderiales incertae sedis</i> , <i>Betaproteobacteria</i>)	16	53	2823	0	0	0
<i>Acidithiobacillus</i> (сем. <i>Acidithiobacillaceae</i> , <i>Gamma proteobacteria</i>)	0	2	0	0	0	0
Сероокисляющие бактерии (бесцветные серобактерии)						
<i>Thiothrix</i> (сем. <i>Thiotrichaceae</i> , <i>Gamma proteobacteria</i>)	2	1449	16577	6	0	0

Название фило типа	Hg1 (вода)	Hg1 (мат)	Hg3 (мат)	Jg10 (ил)	Jg12 (вода)	Jg12 (мат)
<i>Thiofaba</i> (сем. <i>Halothiobacillaceae</i> , <i>Gammaproteobacteria</i>)	478	53	3662	0	0	0
<i>Thiovirga</i> (сем. <i>Halothiobacillaceae</i> , <i>Gammaproteobacteria</i>)	12	1	0	0	31	0
<i>Sulfuritalea</i> (сем. <i>Rhodocyclaceae</i> , <i>Betaproteobacteria</i>)	362	7	3	0	39	0
<i>Sulfuricurvum</i> (сем. <i>Helicobacteraceae</i> , <i>Epsilonproteobacteria</i>)	0	141	429	2	0	0
Гетеротрофные микроорганизмы, потенциально участвующие в окислении сероводорода, молекулярной серы и тиосульфата						
<i>Pseudomonas</i> (сем. <i>Pseudomonadaceae</i> , <i>Gammaproteobacteria</i>)	859	2	3	10	538	0
<i>Achromobacter</i> (сем. <i>Alcaligenaceae</i> , <i>Betaproteobacteria</i>)	170	109	241	548	313	9
Пурпурные серобактерии						
<i>Thiocapsa</i> (сем. <i>Chromatiaceae</i> , <i>Gammaproteobacteria</i>)	0	41	1	0	0	0
Пурпурные несерные бактерии и аэробные бактериохлорофилл <i>a</i> содержащие бактерии						
Неклассифицированные <i>Rhodobacteraceae</i> , близкие к: <i>Rhodobaca</i>	35	177	124	456	1667	3238
<i>Rhodobacter</i> (сем. <i>Rhodobacteraceae</i> , <i>Alphaproteobacteria</i>)	245	353	16	0	530	8
<i>Rhodospseudomonas</i> (сем. <i>Bradyrhizobiaceae</i> , <i>Alphaproteobacteria</i>)	39	35	54	0	0	1
<i>Labrenzia</i> (сем. <i>Rhodobacteraceae</i> , <i>Alphaproteobacteria</i>)	5	0	0	0	0	0
Зеленые серобактерии						
<i>Chlorobaculum</i> (сем. <i>Chlorobiaceae</i> , <i>Chlorobia</i>)	0	83	28	1	15	0
Аноксигенные нитчатые фототрофные бактерии						
<i>Oscillochloris</i> (сем. <i>Oscillochloridaceae</i> , <i>Chloroflexi</i>)	1	293	99	0	7	37
<i>Heliothrix</i> (сем. <i>Chloroflexaceae</i> , <i>Chloroflexi</i>)	0	20	30	0	0	6

Около 23,8% бактерий были отнесены к филуму *Bacteroidetes*, представленного строго анаэробными пропионат-продуцирующими бактериями рода *Paludibacter* (19,4%). Филумы *Firmicutes* и *Spirochaetes* составляют 15,2% и 5,5% от общего микробного разнообразия, соответственно. В минорных количествах (1,7%) были обнаружены представители *Chloroflexi* и *Cyanobacteria*.

Анализ зеленого мата с белыми и рыжими обрастаниями (Hg2-1) позволил идентифицировать 23 бактериальных филума (рисунок 16а), в котором преобладали *Proteobacteria* (74,8%), *Bacteroidetes* (7,9%), *Firmicutes* (6,4%), *Spirochaetes* (2,5%), *Ignavibacteriae* (1,0%).

В филуме *Proteobacteria* доминировали прокариоты, участвующие в круговороте серы. Бесцветные серобактерии *Thiothrix* sp. (50,2%) были основным компонентом исследуемого мата наряду с фототрофными бактериями филумов *Chloroflexi* (0,9%) и *Cyanobacteria* (0,2%). В данном образце также были обнаружены другие протеобактерии, окисляющие и восстанавливающие соединения серы: *Thiofaba* (11,1%), *Thiomonas* (8,5%), *Sulfuricurvum* (1,3%), *Geobacter* (0,9%), *Sulfurospirillum* (0,6%), *Desulfovibrio* (0,4%) и др. Основная часть *Bacteroidetes* (6,5%) была филогенетически удалена от известных микроорганизмов.

В образцах микробных матов источника Хойто-Гол была обнаружена небольшая доля представителей домена *Archaea* (менее 0,1% от общего числа последовательностей).

В зеленом микробном мате (Hg1) к архейным было отнесено 23 последовательности, где 4 из них отнесены к неклассифицированным археям, 6 – к филуму *Euryarchaeota*, 10 – к филуму *Woesearchaeota* и по одной последовательности к филумам *Pasearchaeota*, *Crenarchaeota* и *Thaumarchaeota*. Следует отметить, что только единичные последовательности идентифицированы на уровне рода: *Methanomassiliicoccus* (класс *Thermoplasmata*, филум *Euryarchaeota*) и *Nitrososphaera* (класс *Nitrososphaeria*, филум *Thaumarchaeota*). Остальные отнесены к неидентифицированным на разном таксономическом уровне от класса (*Thermoprotei*) до филума (*Woesearchaeota*). Род

Methanomassiliicoccus представлен единственным на момент написания работы видом *Methanomassiliicoccus luminyensis*, выделенным из человеческих фекалий. Данный вид является мезофильным, облигатно анаэробным метаногеном, растущим в диапазоне температур 25–45°C (оптимум при 37°C), pH 7,2–8,4 (оптимум при pH 7,6) и солености 0,1–1,0% (оптимум 1,0%) (Dridi et al., 2012). Образует метан из водорода и метанола. Род *Nitrososphaera* представлен видом *Nitrososphaera viennensis*, выделенным из почвы. Это мезофильный, нейтрофильный и аэробный аммоний-окисляющий микроорганизм с оптимальной температурой роста 42°C и pH 7,5 (Stieglmeier et al., 2014).

В бактериальном сообществе зеленого мата с белыми и рыжими обрастаниями (Hg2-1) обнаружено всего 6 последовательностей: из них 1 отнесена к неклассифицированным археям, 5 – к неидентифицированным представителям филума *Woesearchaeota*.

Таким образом, археи составляют менее 0,1% микроорганизмов сообщества микробных матов и представлены мезофильными видами. В нейтральных и слабощелочных источниках Йеллоустона и Камчатки, с умеренно высокой температурой (50-80°C), археи также составляли меньшую часть микробного сообщества (Hugenholtz et al. 1998; Гумеров и др., 2012). Археи доминируют в более экстремальных местообитаниях, например, в высокотемпературных гидротермах (Tobler, Venning, 2011; De Leon et al., 2013).

Микробные сообщества источника Жойган. В результате анализа выявлено, что бактериальное сообщество воды (Jg12) источника Жойган характеризовалось значительным видовым разнообразием бактерий, в составе которого выявлено 21 бактериальных филумов (рисунок 16 б). Из выявленных филумов в воде преобладали *Proteobacteria* (73,4%) и *Bacteroidetes* (16,4%), достигая 89,8% из всех последовательностей 16S рРНК микробного сообщества. Доминирующими родами в воде были *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 представители и других родов.

В образце желто-зеленого мата (Jg12) источника Жойган все выявленные в результате анализа 33060 последовательности были отнесены к 21 филумам домена *Bacteria*. По количеству последовательностей преобладали три филума: *Proteobacteria* (36,5%), *Firmicutes* (21,0%) и *Bacteroidetes* (16,4%) (рисунок 16б). Среди представителей *Proteobacteria* преобладают анаэробные бактерии рода *Geobacter* (9,2%, класс *Deltaproteobacteria*), окисляющие органические вещества и металлы, в том числе железо, а также водород-окисляющие бактерии рода *Hydrogenophaga* (9,7%, класс *Betaproteobacteria*).

В филуме *Firmicutes* доминировали облигатно анаэробные микроорганизмы класса *Clostridia* (*Acetoanaerobium*, *Fusibacter*, *Tissierella*, *Anaerovorax*, *Proteiniclasticum*). Среди представителей других филумов преобладали факультативно-анаэробные и облигатные органотрофные бактерии *Ignavibacterium* sp. (10,7%, класс *Ignavibacteria*), нитчатые анаэробные термофильные бактерии *Caldilinea* sp. (7,7%, класс *Caldilineae*) и пропионат-продуцирующие бактерии *Paludibacter* sp. (6,1%, класс *Bacteroidia*).

В результате параллельного секвенирования образца ила бурого цвета (Jg10) источника Жойган получено 37387 последовательностей домена *Bacteria* и 494 последовательности домена *Archaea*. В микробном сообществе ила среди бактерий наиболее широко были распространены филумы *Proteobacteria* (37,5%), *Ignavibacteriae* (10,3%), *Nitrospirae* (10,2%), *Chloroflexi* (8,2%) и *Acidobacteria* (3,8%) (рисунок 16 б). Они были представлены хемоорганотрофными бактериями *Ignavibacterium* sp. (21,3%, класс *Ignavibacteria*), хемолитотрофными нитрит-окисляющими бактериями *Nitrospira* (21,1%, класс *Nitrospira*), органотрофными бактериями *Pseudolabrys* (5,5%, класс *Alphaproteobacteria*), ацидофильными бактериями Gr6 (2,4%, класс *Acidobacteria_Gr6*), нитчатыми анаэробными термофильными бактериями *Caldilinea* (2,3%, класс *Caldilineae*), нейтрофильными Fe(II)-окисляющими бактериями *Sideroxydans* (1,7%, класс *Betaproteobacteria*), анаэробными бактериями, окисляющими органические вещества и железо, рода *Geobacter* (1,2%, класс *Deltaproteobacteria*) и др.

Археи были обнаружены в воде (Jg12) и буром иле (Jg10). В водном

микробном сообществе археи составили менее 0,1% и были отнесены к метанобразующим бактериям рода *Methanospirillum* (класс *Methanomicrobia*, филум *Euryarchaeota*).

В образце бурого ила (Jg10) к архейным было отнесено 494 последовательности, где 16 из них отнесены к неклассифицированным археям, 2 – к филуму *Euryarchaeota* (метанобразующие бактерии рода *Methanomassiliicoccus*), 170 – к филуму *Pacearchaeota* (род *Pacearchaeota Incertae Sedis AR13*), 304 – к филуму *Thaumarchaeota* (аммоний-окисляющие бактерии рода *Nitrososphaera* и *Nitrosopumilus*) и по одной последовательности к филумам *Woesearchaeota* и *Crenarchaeota* с неидентифицированными представителями.

Таким образом, в воде источника Хойто-Гол преобладают широко распространенные в водных экосистемах фило типы бактерий, преимущественно аэробных хемоорганотрофов, в то время как в микробном мате доминируют бактерии, участвующие в круговороте серы.

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. Такое сообщество может рассматриваться как модель первичных экосистем древней Земли и служить объектом дальнейших более детальных исследований (Гумеров и др., 2011). Микробные сообщества исследуемых источников Хойто-Гол и Жойган существенно отличаются по видовому составу и разнообразию от сообществ ранее исследованных высокотемпературных гидротерм Камчатки, Йеллоустоуна, Исландии, Бурятии, в которых преобладают термофильные прокариоты (Гумеров и др., 2011; Tobler, Benning, 2011; De Leon et al., 2013; Раднагуруева и др., 2016).

3.5. Сравнительный анализ биоразнообразия микробных сообществ минеральных источников Хойто-Гол и Жойган

Микробные сообщества источника Хойто-Гол. Сравнительный анализ микробного разнообразия был проведен с использованием диаграмм Венна на кластерных расстояниях 0,05 (рода) и 0,1 (семейства). 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 17). Количество уникальных для каждого сообщества родов варьировало от 34 в зеленом мате с белыми и рыжими обрастаниями (Hg2-1), до 90 в воде (Hg1). 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.

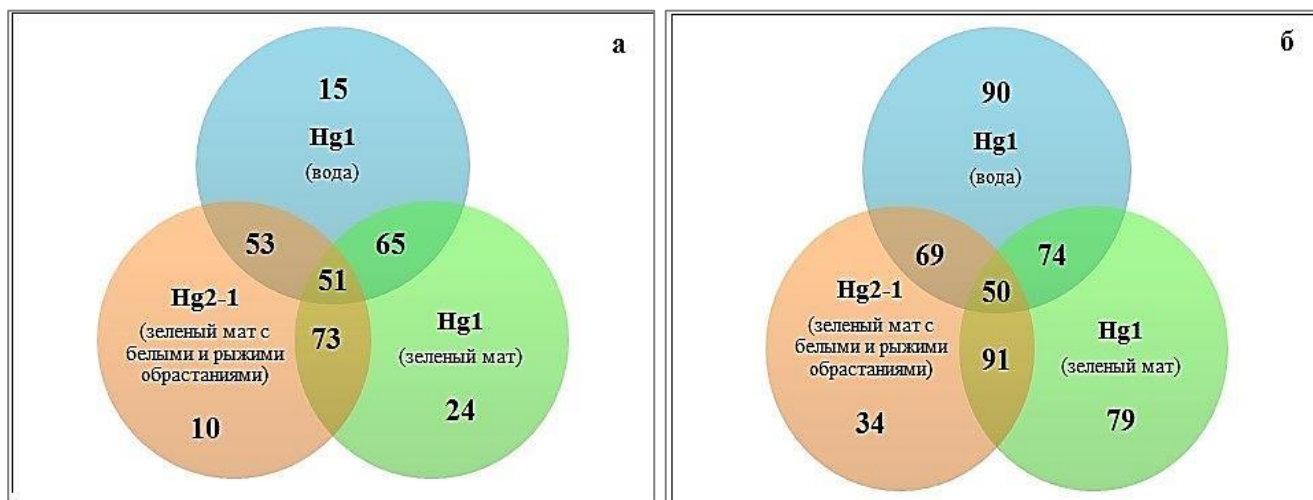


Рисунок 17. Диаграммы Венна, показывающие анализ биоразнообразия микробных сообществ источника Хойто-Гол: а – на уровне семейств; б – на уровне родов

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. Сравнительный анализ исследуемых сообществ показал, что количество общих семейств и родов составило 60 и 65, соответственно (рисунок 18). При этом основная часть принадлежала хемоорганотрофным бактериям рода *Ignavibacterium* и *Sediminibacterium*.

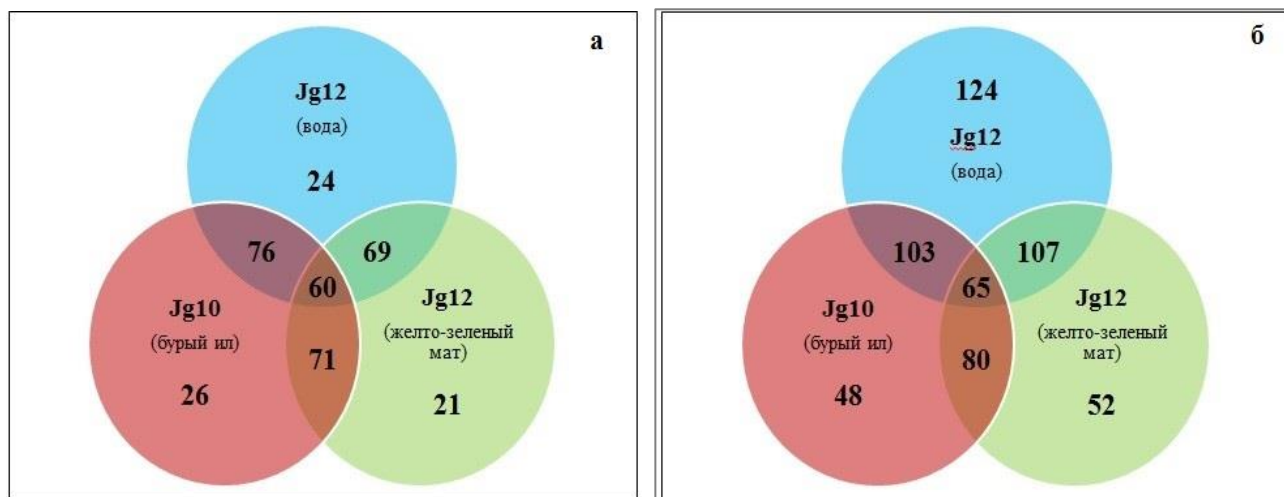


Рисунок 18. Диаграммы Венна, показывающие анализ биоразнообразия микробных сообществ источника Жойган: а – на уровне семейств; б – на уровне родов

Особенностью филогенетического разнообразия микробного сообщества источника Жойган на основе данных параллельного секвенирования является преобладание хемолитоавтотрофных микроорганизмов, участвующих в образовании и окислении водорода. Присутствие и доминирование водород-использующих бактерий в микробном сообществе воды и микробного мата является возможным индикатором 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.

3.6. Количественный учет различных физиологических групп микроорганизмов

Учет различных физиологических групп микроорганизмов был произведен с использованием элективных питательных сред (таблица 4).

Общая численность аноксигенных фототрофных бактерий варьировала в пределах 10^4 - 10^5 кл/см³ и 10^2 - 10^5 кл/см³ в пробах микробных матов источника Хойто-Гол и Жойган, соответственно (таблица 13). Наименьшее количество аноксигенных фототрофных бактерий было выявлено в пробах Jg1 и Jg15, что связано преобладанием цианобактерий в микробных матах. Максимальная численность была определена в точке Jg12, где наблюдалось наибольшее концентрирование микробных матов.

Кроме фототрофных бактерий в продукции органического вещества участвуют аэробные сероокисляющие (тионовые) бактерии, ассимилируя углекислый газ и используя энергию окисления сероводорода и элементной серы. Количество тионовых бактерий в пробах исследуемых источников варьировало в пределах от 0 до 1 млн. кл./см³. Наибольшая численность сероокисляющих бактерий наблюдалась в пробах микробных матов сероводородсодержащего источника Хойто-Гол, чему способствовали физико-химические условия среды обитания. В пробах минерального источника Жойган максимальная численность бактерий наблюдалась в точках, в воде которых было обнаружено небольшое содержание сульфида (0,76 и 0,93 мг/дм³ в источниках Jg7 и Jg8, соответственно).

На начальных этапах деструкции главную роль играют бактерии-гидролитики, разлагающие полимерные соединения (Намсараев и др., 2011). В микробных матах и донных осадках исследуемых гидротерм доминирующими были протеолитические бактерии, их численность достигала 100 млн. кл/см³. Количество бактерий, разлагающих крахмал, варьировало от 10^4 до 10^7 кл/см³. Максимальная численность целлюлозоразлагающих бактерий (ЦРБ) достигала 10^7 кл/см³.

Численность бактерий в минеральных источниках Хойто-Гол и Жойган, кл./см³

Источник	Станции	Аэробные бактерии						Анаэробные бактерии			
		АФБ	СОБ	ЦРБ	Протеолитики	Амилолитики	Fe-ОБ	СРБ	Fe-РБ		
									Ферригидрит	Цитрат железа (III)	
										пептон	лактат+ацетат
Хойто-Гол	Hg1	-	10 ⁶	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁷	1.55·10 ⁵	10 ⁶	10 ³	10 ³	10 ²
	Hg1a	-	10 ⁴	10 ⁶	10 ⁸	10 ⁶	-	10 ⁸	10 ²	10 ¹	10 ²
	Hg2	10 ⁵	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁷	10 ⁶	2.6·10 ³	10 ⁶	10 ³	10 ³	10 ³
	Hg3	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁴	10 ⁶	10 ⁵	-	10 ⁵	10 ⁴	10 ²	10 ⁴
	Hg4	10 ⁴	10 ⁴	10 ²	10 ⁸	10 ⁵	-	10 ⁵	-	-	-
	Hg5	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁷	7.0·10 ⁴	10 ⁴	0	10 ²	10 ²
	Hg6	10 ⁵	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁷	10 ⁷	-	10 ⁴	10 ³	10 ¹	-
Hg7	-	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁸	10 ⁵	0	10 ⁸	10 ⁴	10 ⁴	10 ³	
Жойган	Jg1	10 ²	10 ³	10 ³	10 ⁸	10 ⁶	9.2·10 ⁶	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴	10 ²
	Jg7	-	10 ⁵	10 ⁷	10 ⁷	-	6.0·10 ⁵	10 ⁵	10 ³	10 ²	10 ²
	Jg8	-	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁶	-	-	10 ⁶	10 ²	-	10 ³
	Jg9	-	10 ³	10 ⁴	10 ⁶	10 ⁵	4.9·10 ⁵	10 ⁷	10 ⁸	10 ⁴	10 ⁴
	Jg10	10 ³	0	10 ³	10 ⁷	10 ⁶	-	10 ⁴	10 ⁷	10 ⁵	10 ⁵
	Jg12	10 ⁶	0	10 ⁶	10 ⁸	10 ⁷	1.0·10 ⁶	10 ⁵	10 ⁸	10 ⁵	10 ⁵
	Jg15	10 ²	0	-	10 ⁵	10 ⁵	-	10 ⁴	10 ⁶	10 ⁴	10 ⁵
	Jg19	-	10 ⁴	10 ⁷	10 ⁷	-	1.0·10 ⁴	0	0	0	0
Jg25	-	0	0	10 ⁶	10 ⁴	-	10 ⁴	10 ²	10 ³	10 ⁴	

Примечание: «-» - нет данных, Fe-ОБ – железоокисляющие бактерии

Активная роль на конечных этапах деструкции органического вещества в иловых отложениях и микробных матах принадлежит сульфатредуцирующим бактериям (СРБ), численность которых составляла 10⁷–10⁸ кл/см³ при использовании лактата натрия в качестве источника углерода и энергии (таблица 13). Численность СРБ в пробах минерального источника Хойто-Гол в целом была на порядок выше, чем в пробах минерального источника Жойган, в котором превалировал цикл железа.

Количество железоредуцирующих бактерий на среде с слабокристаллическим оксидом железа (III) и пептоном достигало 10⁸ кл/см³, на среде со смесью лактата с ацетатом – 10⁵ кл/см³.

Численность Fe-РБ на среде с цитратом железа (III) и смесью лактата с ацетатом не превышала 10^5 кл/см³.

В пробах матов и илах исследуемых гидротерм были выявлены микроорганизмы, участвующие в круговороте железа. Рост железooksисляющих бактерий (Fe-ОБ) сопровождался накоплением желто-оранжевых окислов железа (рисунок 19). Численность железобактерий составила от $2,6 \cdot 10^3$ до $9,2 \cdot 10^6$ кл/см³ (таблица 13).

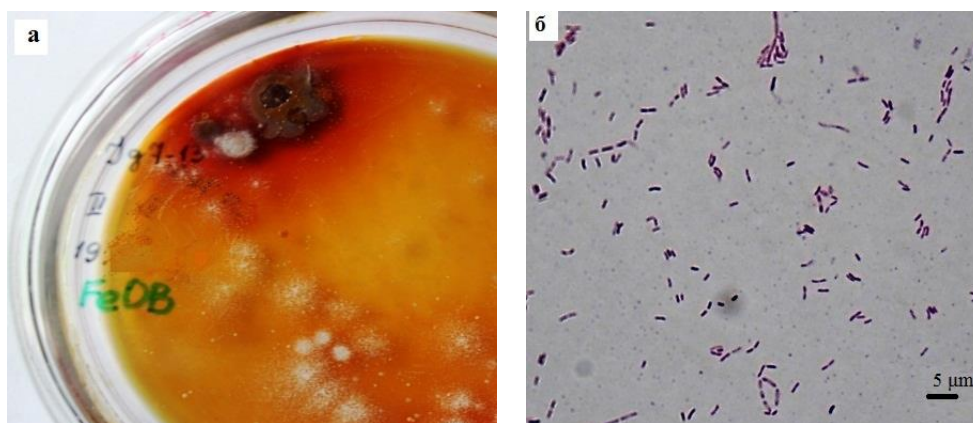


Рисунок 19. Железooksисляющие бактерии, изолированные из микробного мата источника Жойган (станция Jg1): а – бурые колонии на чашке Петри; б – морфология клеток

3.7. Выделение и характеристика бактерий минеральных источников

Хойто-Гол и Жойган

3.7.1. Характеристика аноксигенных фототрофных бактерий

Из проб микробных матов минеральных источников Хойто-Гол (Hg1, Hg2, Hg2-1, Hg2-2, Hg2-3, Hg2-4) и Жойган (Jg1, Jg10, Jg12) были получены накопительные культуры и монокультуры аноксигенных нитчатых зеленых бактерий, а также пурпурных серобактерий *Thiocapsa sp.* и несерных пурпурных бактерий *Rhodopseudomonas palustris*, *Rhodomicrobium vannielii*, *Rhodobacter sp.* и др.

Аноксигенные нитчатые фототрофные бактерии. Из микробных матов Hg2, Hg2-3 и Jg12 было выделено 3 монокультуры нитчатых аноксигенных фототрофных бактерий. На среде, содержащей сульфид, они образовывали колонии светло-зеленого цвета диаметром до 2 мм. Полученные культуры

представляли собой тонкие нити с газовыми вакуолями толщиной до 5 мкм (рисунок 20 а). В качестве основного пигмента бактерии содержали бактериохлорофилл *c* с максимумом поглощения в клетках при 746 нм (рисунок 20 б).

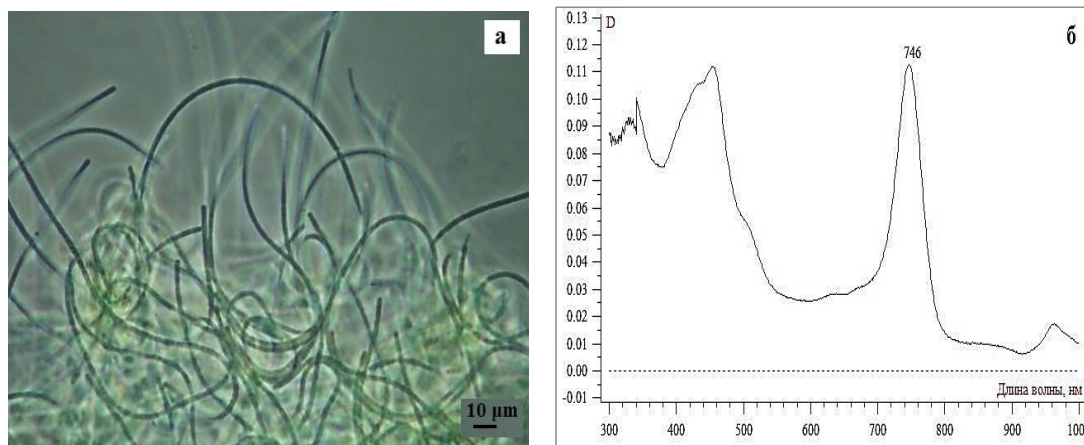


Рисунок 20. Культура зеленой нитчатой бактерии *Oscillochloris trichoides*, (станция Hg2): а – морфология клеток; б – спектр поглощения клеток культуры

Филогенетический анализ, основанный на сравнении нуклеотидных последовательностей гена 16S рНК, показал, что штаммы близки между собой и относятся к известному виду *Oscillochloris trichoides* (99% сходства), принадлежащего к классу *Chloroflexi* (рисунок 21).

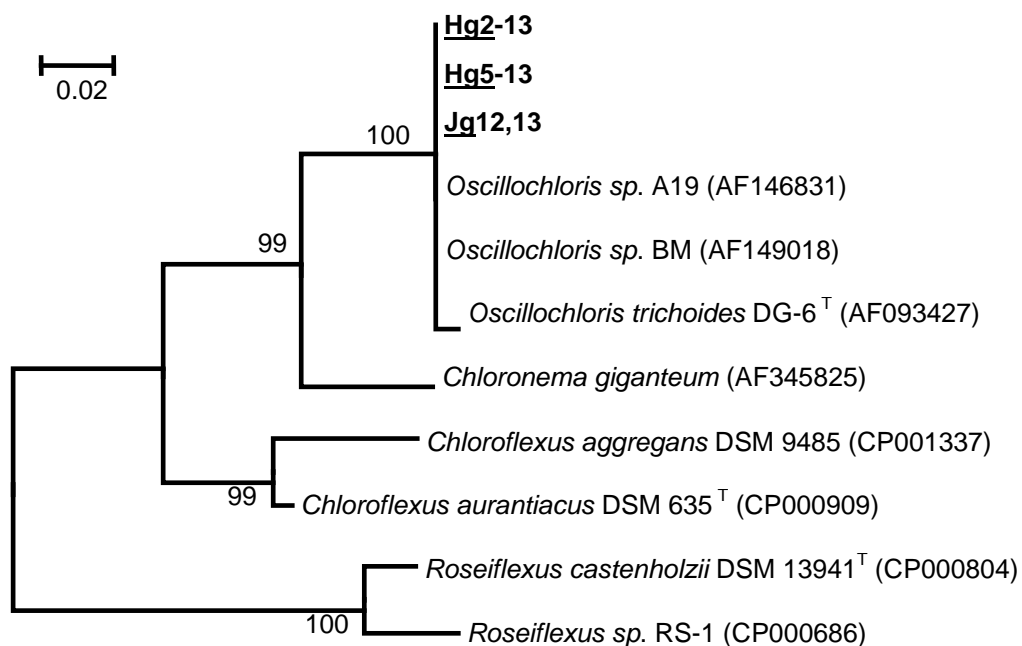


Рисунок 21. Филогенетическое положение зеленых нитчатых бактерий (штаммов Hg2-13, Hg5-13, Jg12,13). Дендрограмма построена с использованием метода Maximum Likelihood на основании сравнения 650 нуклеотидов гена 16S рНК. Масштаб эволюционных расстояний соответствует 2 заменам на 100 аминокислот последовательности. Bootstrap-тест включал построение 700 альтернативных деревьев

Зеленые серобактерии. Были получены 3 культуры зеленых серобактерий, которые участвуют в окислении сульфида при фотосинтезе, с образованием элементарной серы вне клеток. При росте на агаре они образовывали колонии темно-зеленого цвета, диаметром 1-2 мм. Морфологически бактерии представляли собой палочковидные клетки, формируя короткие ветвящиеся цепочки, и соответствовали видам рода *Chlorobium* (рисунок 22а). Основным пигментом у них был бактериохлорофилл *c* (максимум поглощения 742 нм) (рисунок 22б). При сравнении аминокислотной последовательности ФМО-протеина (*fmoA*), полученной при трансляции *in silico* фрагмента гена *fmoA*, амплифицированного из выделенной нами культуры, с референтными последовательностями, было определено, что она наиболее близка к виду *Chlorobium limicola*.

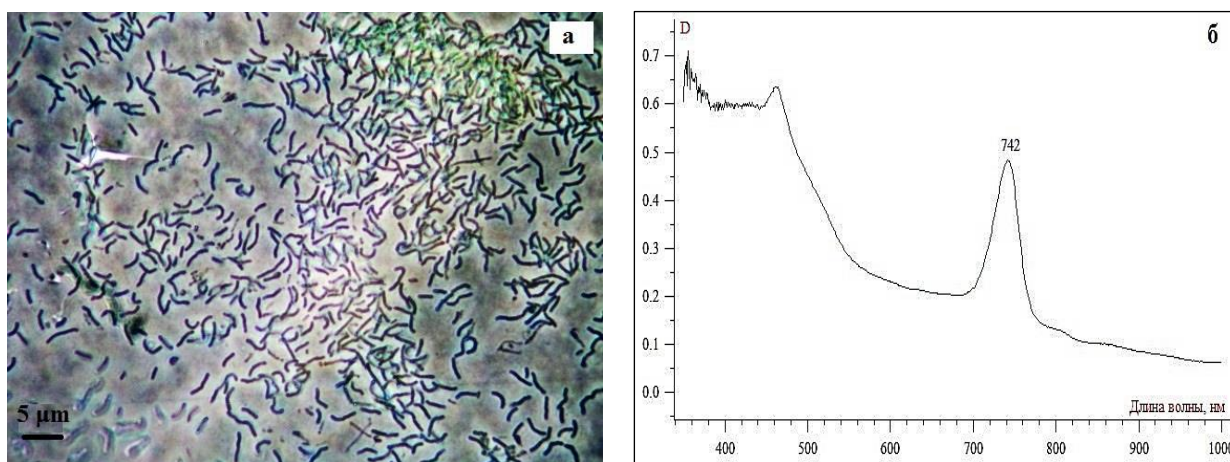


Рисунок 22. (А) Морфология зеленой серобактерии *Chlorobium limicola*, выделенной из микробного мата станции Нг2-2. (Б) Спектр поглощения клеток культуры *Chlorobium limicola*

Пурпурные серные бактерии. Из микробных матов источников Хойто-Гол и Жойган были получены накопительные культуры пурпурных серных бактерий по морфологии похожие на *Thiocapsa sp.*, *Chromacium sp.* и *Thiocystis sp.* (рисунок 23).

Несерные пурпурные бактерии присутствовали в микробных матах во всех исследованных станциях. Было выделено 10 чистых культур пурпурных несерных бактерий, морфологически соответствующие родам *Rhodobacter*, *Rhodomicrobium*, *Rhodopseudomonas*, *Rhodoplanes* и *Rubrivivax*.

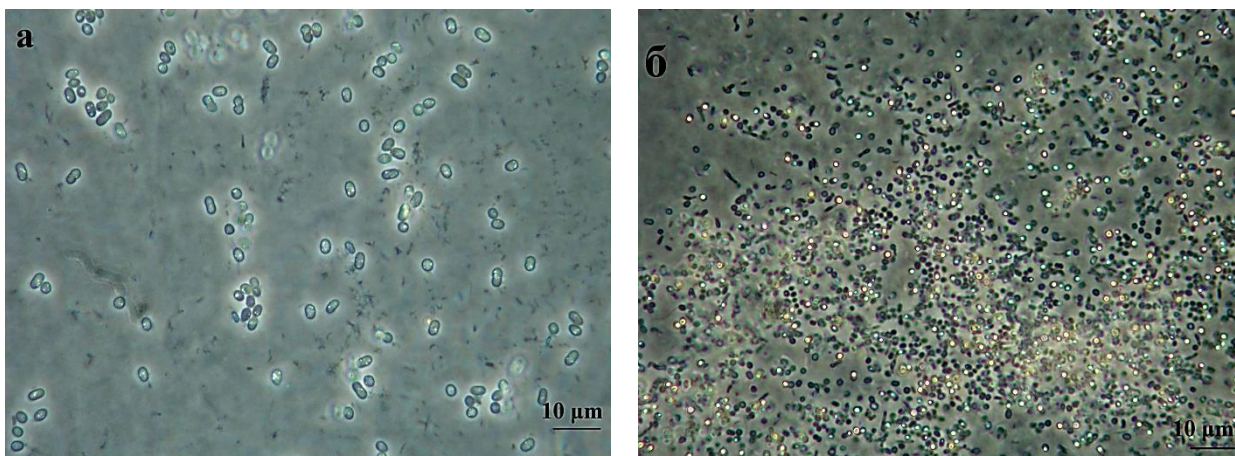


Рисунок 23. Морфология пурпурных серных бактерий: а – *Chromatium* sp.; б – *Thiocystis* sp.

Пурпурные несерные бактерии рода *Rhodobacter* sp. морфологически были представлены короткими овальными палочками (рисунок 24а). В анаэробной среде образовывали колонии темно-коричневого цвета, а в аэробной среде бордового цвета. Филогенетический анализ показал, что штаммы относятся к виду *Rhodobacter capsulatus* (100% сходства).

Бактерии рода *Rhodomicrobium* sp. представляли собой короткие овальные палочки, размножающиеся почкованием с образованием гифоподобных тонких нитей, что характерно для известного вида *Rhodomicrobium vannielii* (рисунок 24б). Данные филогенетического анализа подтвердили, что бактерия относится к виду *Rhodomicrobium vannielii* (99% сходства).

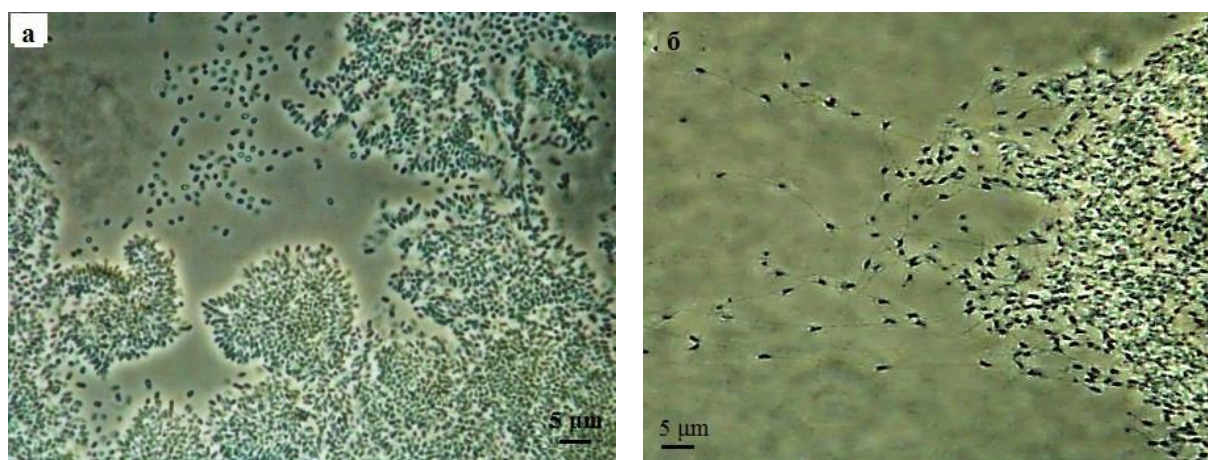


Рисунок 24. Морфология пурпурных несерных бактерий: а – *Rhodobacter capsulatus*; б – *Rhodomicrobium vannielii*

Два остальных морфотипа выделенных пурпурных несерных бактерий филогенетически были близки к ранее известным видам *Rhodopseudomonas polustris* (100% сходства) и *Rhodopseudomonas faecalis* (99% сходства). Подвижные палочковидные бактерии размножаются почкованием, образуя заметное сужение между материнской и дочерней клетками. В старых культурах образуют розеткоподобные кластеры (рисунок 25а).

Из проб источника Хойто-Гол также были выделены из розовато-коричневых колоний палочковидные бактерии с цистами *Rhodoplanes elegans* (100% сходства), размножающиеся почкованием (рисунок 25б).

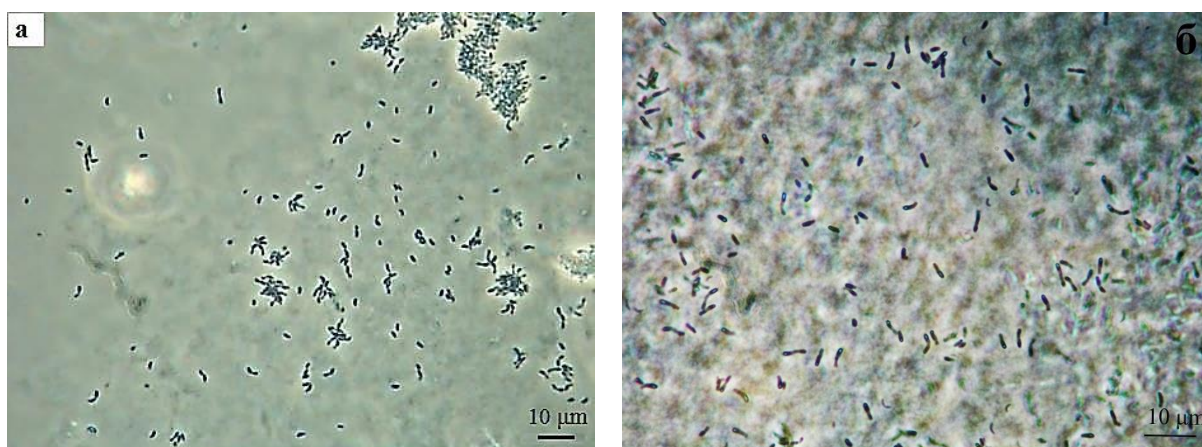


Рисунок 25. Морфология пурпурных несерных бактерий, изолированных из микробных матов источника Хойто-Гол: а – *Rhodopseudomonas polustris*; б – *Rhodoplanes elegans*

В пробах минерального источника Жойган также были выявлены тонкие палочки *Rubrivivax gelatinosus* (100% сходства), образующие микроколонии (рисунок 26).

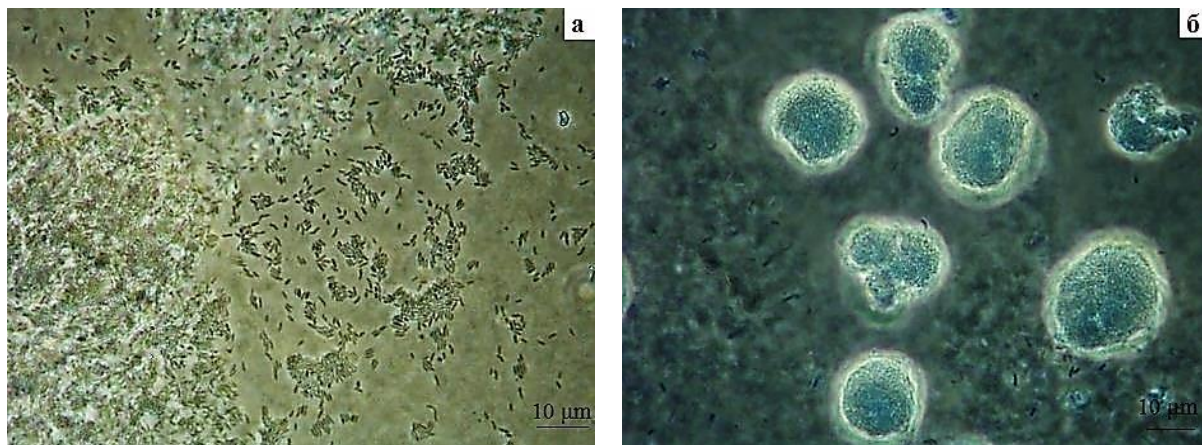


Рисунок 26. Пурпурные несерные бактерии *Rubrivivax gelatinosus* (а) и образующиеся ими микроколонии (б), изолированные из микробных матов источника Жойган

Известно, что некоторые пурпурные бактерии (*Rhodomicrobium vannielii*, *Rhodopseudomonas 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 *Rhodomicrobium vannielii* и *Rhodopseudomonas palustris*, при этом наблюдали образование окисных форм железа, что свидетельствует об участии АФБ в окислении железа (рисунок 25).

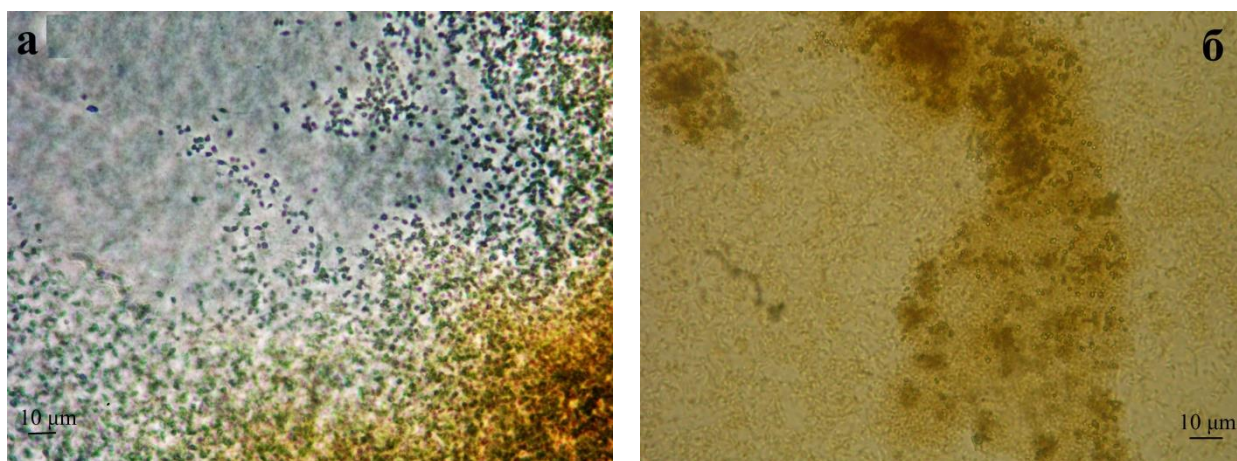


Рисунок 27. Пурпурные фототрофные бактерии, участвующие в «железном» фотосинтезе с образованием окисных форм железа: а – *Rhodomicrobium vannielii*; б – *Rhodopseudomonas palustris*

3.7.2. Характеристика сероокисляющих бактерий

Из проб микробных матов и илов исследуемых источников были получены 4 чистые культуры тионовых бактерий, которые были представлены подвижными одиночными и парными палочками длиной до 1,5 мкм (рисунок 28). При культивировании среда мутнела на 3-5 сутки, и на ее поверхности появлялась белая пленка. Значение рН среды при этом снижалось до 4. Результаты исследования элементного состава пленки показали, что она состоит из элементной серы, содержание которой достигает 100%. Полученные культуры на основании данных нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК соответствовали виду *Thiobacillus thioparus*, идентичность с которым составила 99% (рисунок 29) (Кашкак и др., 2016).

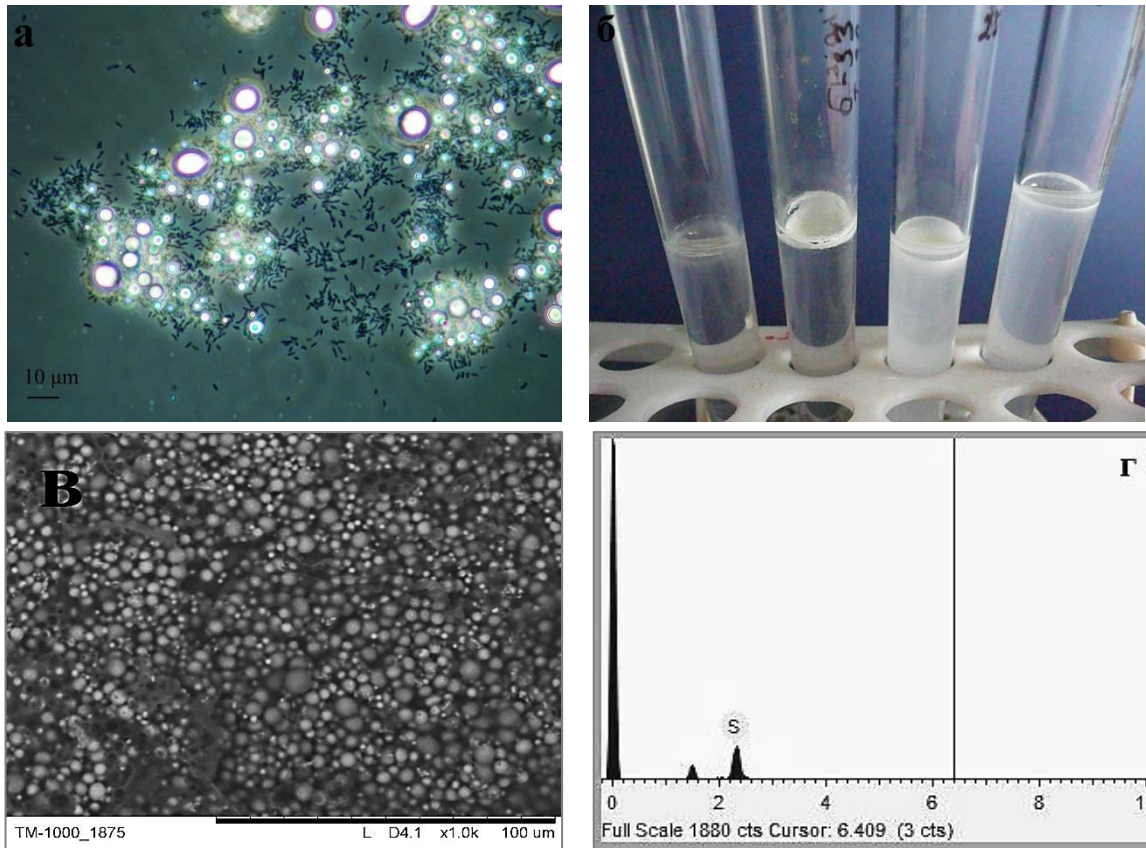


Рисунок 28. а – морфология клеток тионовых бактерий *Thiobacillus thioparus*, с отложениями капель аморфной серы, выделенных из микробного мата станции Hg3; б – образование пленки в пробирках при культивировании бактерий *Thiobacillus thioparus*; в – поверхность пленки; г – элементный состав пленки

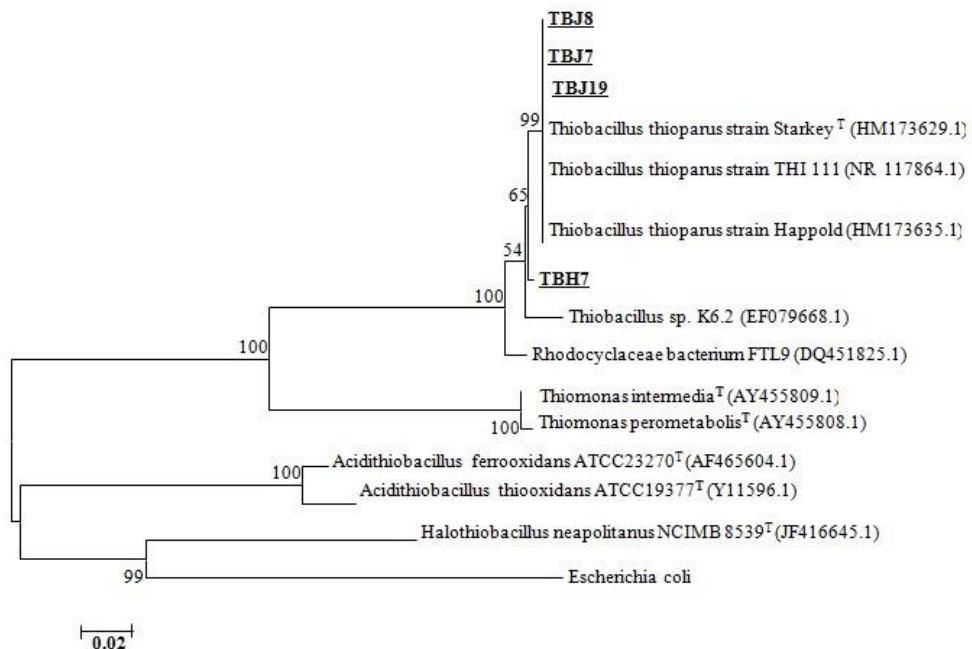


Рисунок 29. Филогенетическое положение сероокисляющих бактерий (штаммов ТВЖ7, ТВЖ8, ТВЖ19, ТВН7). Дендрограмма построена с использованием метода Maximum Likelihood на основании сравнения 650 нуклеотидов гена 16S рРНК. Масштаб эволюционных расстояний соответствует 2 заменам на 100 аминокислот последовательности. Bootstrap-тест включал построение 700 альтернативных деревьев

3.7.3. Характеристика целлюлозоразлагающих бактерий

Консорциум накопительных культур целлюлозоразлагающих бактерий, выделенных из проб источников Хойто-Гол и Жойган, состоял из спорообразующих и неспорообразующих форм. В нем присутствовали морфологически различающиеся палочковидные клетки, часть из которых имела споры (Кашкак, Данилова, 2012). Из накопительных культур ЦРБ путем последовательных пересевов из предельных разведений на среде с субстратом натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы (Na-КМЦ) в количестве 3 г/л и с последующим выделением колоний на агаризованной среде Пфеннига были получены три чистые культуры.

Колонии бактерий были круглыми с выпуклым профилем и ровным краем 1,0-1,2 мм в диаметре с мелкозернистой структурой. Цвета колоний были молочными, кремовыми с различной консистенцией (таблица 14).

Клетки изолированных культур имели различную морфологию: Ц1 – кокки диаметром до 0,83 мкм, соединяющиеся в цепочки, Ц2 и Ц3 – прямые палочки толщиной 0,5-0,7 мкм и длиной 0,8-1,5 мкм (рисунок 30). Грамотрицательные, неспорообразующие, подвижные. Все культуры каталазоположительные, аэробы.

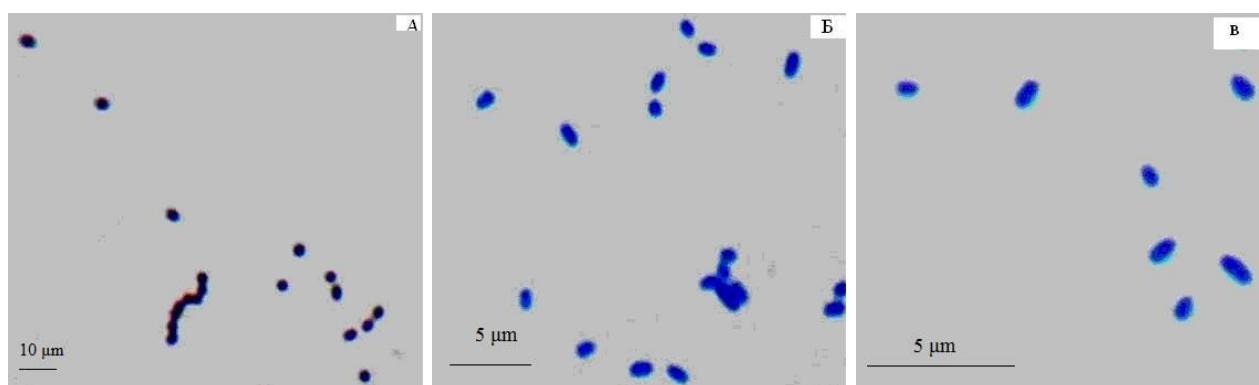


Рисунок 30. Целлюлозоразлагающие бактерии, выделенные из проб микробных матов Хойто-Гол: а – культура Ц1 (Hg2); б – культура Ц2 (Hg2-2); в – культура Ц3 (Hg2-2)

Исследуемые микроорганизмы характеризуются неодинаковой способностью использовать различные соединения углерода для конструктивного и энергетического метаболизма (таблица 14).

Дифференцирующие свойства идентифицируемых бактерий

Обозначение штамма	Ц 1	Ц2	Ц3
Источник выделения	темно-зеленый мат	Серный мат с зелеными вкраплениями	зеленый мат
Описание поверхностной колонии			
Форма и поверхность	Круглая, гладкая	Круглая, гладкая	Круглая, гладкая
Размер, мм	1,0-1,2	1,0-1,2	1,0-1,2
Цвет	Молочный	С желтоватым оттенком	Молочный
Край, профиль	Гладкий, выпуклый	Гладкий, выпуклый	Гладкий, выпуклый
Блеск и прозрачность	Блестящая, непрозрачная	Блестящая, непрозрачная	Блестящая, непрозрачная
Поверхность	Гладкая	Гладкая	Гладкая
Структура	Мелкозернистая	Мелкозернистая	Мелкозернистая
Консистенция	Вязкая, слизистая	Плотная	Плотная
Морфология клеток и цитология			
Морфология	Кокки	Прямые палочки	Прямые палочки
Размеры, мкм	0,6-0,9	0,5-0,7 x 0,8-1,2	0,5-0,7 x 1,0-1,5
Окраска по Граму	-	-	-
Подвижность	+	+	+
Эндоспоры	-	-	-
Кислотоустойчивость	-	-	-
Физиолого-биохимические свойства			
Ксилоза	+	+	+
Глюкоза	+	+	+
Лактоза	-	+	+
Мальтоза	+	+	+
Рафиноза	-	-	+
Галактоза	+	+	+
Фруктоза	-	+	+
Сахароза	-	+	+
Рамноза	-	-	-
Целлобиоза	+	-	-
Этанол	-	+	+

Обозначение штамма	Ц 1	Ц2	Ц3
Сорбит	-	-	-
Глицерин	-	-	+
Маннит	-	-	+
Дульцит	-	-	+
Цитрат	-	-	-
Лактат	-	-	-
Пируват	-	+	+
Ацетат	-	+	+
Сукцинат	-	+	+
Мочевина	-	-	-
L-цистеин	-	-	-
Казеинолитическая активность	-	-	-
Амилолитическая активность	-	+	+
Целлюлазная активность	+	+	+
Тест на каталазу	+	+	+

Культура Ц1 использовала узкий спектр полимерных углеводных субстратов и сахаров: глюкозу, целлобиозу, ксилозу, мальтозу, галактозу. Не использовала натриевые соли органических кислот, спирты, белковые субстраты.

Культура Ц2 росла на среде с пептоном и ксилозой, глюкозой, лактозой, мальтозой, галактозой, фруктозой, сахарозой, этанолом, а также с натриевыми солями пировиноградной, уксусной и янтарной кислот. Организм не использовал рафинозу, рамнозу, целлобиозу, многоатомные спирты, натриевые соли лимонной и молочной кислот. Культура Ц3 использовала в качестве единственного источника углерода многие углеводы, спирты и соли органических кислот, кроме рамнозы, целлобиозы, сорбита, лактата и цитрата натрия. Все выделенные культуры не усваивали азот мочевины и цистеина.

Для определения внеклеточных ферментов использовали следующие высокомолекулярные соединения: крахмал и казеин. Крахмал подвергался гидролитическому расщеплению под действием амилаз. Амилолитическая

активность была выявлена в культурах Ц2 и Ц3, диаметр светлой зоны у которых достигал 5 мм. В культуре Ц1 гидролитического расщепления крахмала не наблюдалось. Для выявления протеолиза казеина использовали молочный агар. Отличительной особенностью всех изолятов является отсутствие роста на гидролизате казеина.

Таким образом, определение физиолого-биохимических особенностей целлюлозоразлагающих бактерий в микробном сообществе источника Хойто-Гол показало, что исследуемые микроорганизмы характеризуются неодинаковой способностью использовать различные соединения углерода для конструктивного и энергетического метаболизма (Кашкак, Данилова, 2012).

3.7.4. Характеристика сульфатредуцирующих бактерий

Активная роль на конечных этапах деструкции органического вещества принадлежит сульфатредуцирующим бактериям (Намсараев и др., 2011). Из микробных матов было выделено две чистые культуры и двенадцать активных накопительных культур сульфатредуцирующих бактерий. Выделенные штаммы бактерий были представлены грамотрицательными вибрионами размером $0,4-0,6 \times 1,0-1,5$ мкм, подвижными за счет одного полярно расположенного жгутика (рисунок 31). Образование спор не обнаружено.

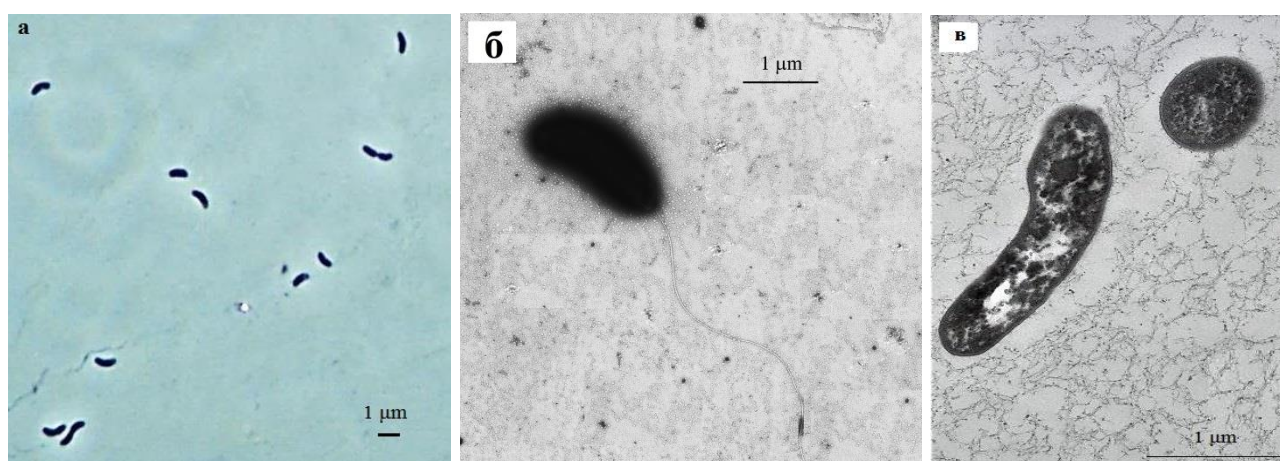


Рисунок 31. Морфология и ультраструктура клеток штамма Jg1-12: а – препарат из среды без железа (II), фазово-контрастный микроскоп; б – тотальный препарат, электронный микроскоп; в – ультраструктура клеток, электронный микроскоп

Выделенные культуры – строгие анаэробы, гетеротрофы, активно восстанавливают сульфат натрия на среде с лактатом натрия, образуя при этом H_2S в анаэробных условиях. На 14 сутки культивирования количество H_2S , образованного штаммами Hg7-11 и Jg1-12, составило 532,5 мг/дм³ и 571,0 мг/дм³, соответственно.

Рост обоих штаммов был оптимален при рН 7,2 и 7,5 (рисунок 32 а). Температурные интервалы развития штаммов лежат в пределах 20–45°C с оптимумом роста при 37°C (штамм Hg7-11) и 42°C (Jg1-12). При температуре ниже 20°C и выше 45°C рост не наблюдался (рисунок 32 б). Штаммы не нуждались в обязательном присутствии хлорида натрия, рост происходил при концентрации NaCl от 0 до 30 г/дм³ с оптимумом 0 г/дм³ (рисунок 32 в).

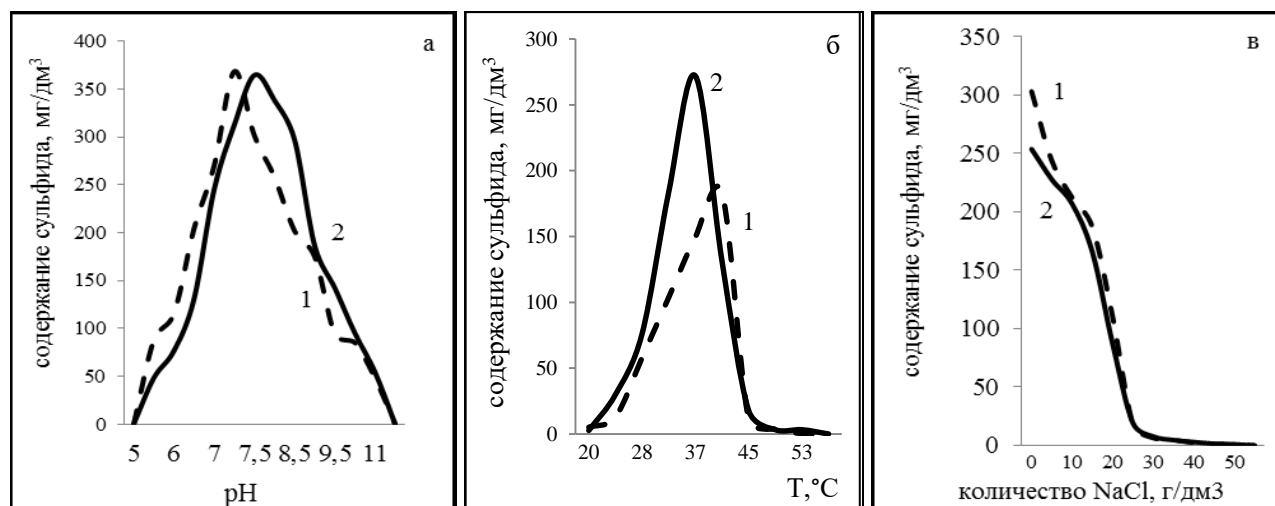


Рисунок 32. Зависимость роста штаммов (1 – штамм Hg7-11, 2 – штамм Jg1-12) от: а – рН; б – Т; в – NaCl

В качестве акцепторов электронов выделенные культуры использовали сульфат, тиосульфат, элементарную серу, диметилсульфооксид DMSO (рисунок 33а), в качестве доноров электронов и источника углерода в анаэробных условиях использовали в основном спирты и карбоновые кислоты (рисунок 33 б). Достаточно активный рост, в сравнении с ростом на лактате, был зафиксирован на этаноле, сукцинате, пропаноле-1, бутаноле-1, фумарате, формиате, глицерине, малате. На среде без донора электронов культуры не развивались. На сахарах и аминокислотах роста также не наблюдалось.

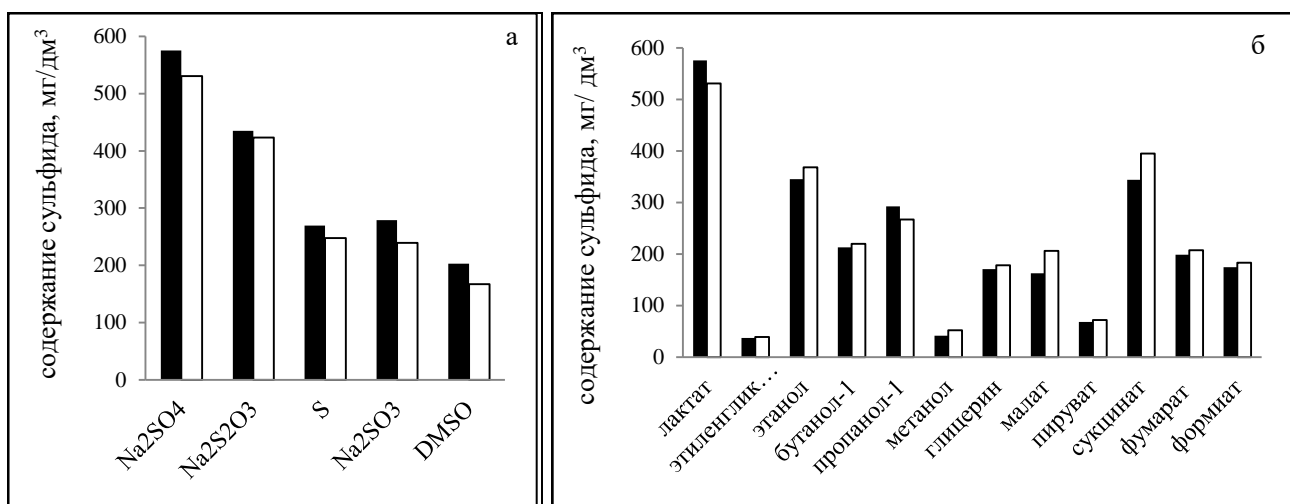


Рисунок 33. Рост культур (оценка по количеству образованного сульфида) при использовании: а – акцепторов электронов; б – доноров электронов. Черные столбики – штамм Jg1-12, белые столбики – штамм Hg7-11

Филогенетический анализ, основанный на сравнении нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК, показал, что штаммы близки между собой и относятся к ранее известному виду *Desulfovibrio alcoholivorans* (99% сходства), класс *Deltaproteobacteria* (рисунок 34). Этот вид впервые изолирован из природных экосистем, ранее эти бактерии были выделены из антропогенных местообитаний (Qatibi et al., 1991).

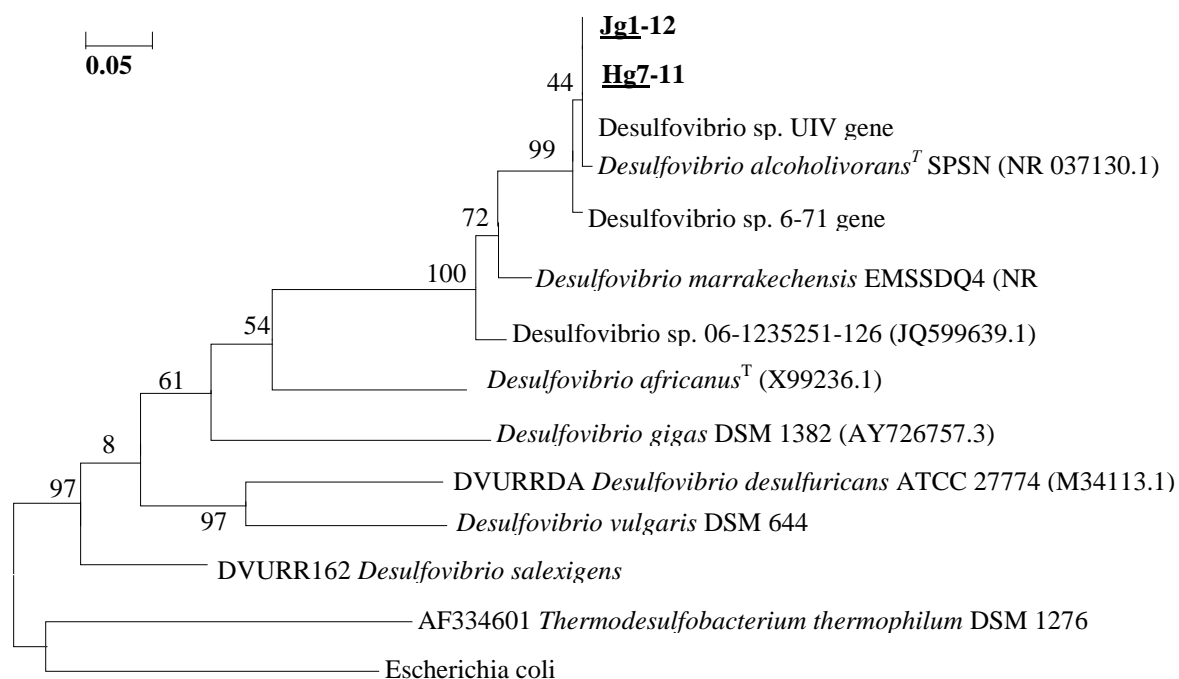


Рисунок 34. Филогенетическое положение сульфатредуцирующих бактерий (штаммов Hg7-11, Jg1-12). Дендрограмма построена с использованием метода Maximum Likelihood на основании сравнения 650 нуклеотидов гена 16S рРНК. Масштаб эволюционных расстояний соответствует 5 заменам на 100 аминокислот последовательности. Bootstrap-тест включал построение 700 альтернативных деревьев

Сравнительная характеристика свойств выделенных штаммов и типового штамма известного вида рода *Desulfovibrio* приведена в таблице 15.

Таблица 15

Сравнительная характеристика свойств выделенных штаммов и типового штамма известного вида рода *Desulfovibrio*

Характеристика	<i>Desulfovibrio alcoholivorans</i> SPSN ^T	Штамм Jg1-12	Штамм Hg7-11
Форма клеток	вибрионы	вибрионы	вибрионы
Размеры клеток, мкм	0.7-0.9×2.8-3.2	0.4-0.6×1.0-1.5	0.4-0.6×1.0-1.5
Подвижность	+	+	+
Спорообразование	-	-	-
Оптимумы и пределы роста:			
pH _{lim/opt}	5-12 / 7,0	5-12 / 7,5	5-12 / 7,25
T _{lim/opt} , °C	20-42 / 37	20-45 / 37	20-45 / 42
NaCl _{lim/opt} , г/дм ³	0-20 / 5-10	0-30 / 0	0-30 / 0
Доноры электронов:			
Сахара	-	-	-
Насыщенные жирные кислоты	-	н.о.	н.о.
Аминокислоты	-	-	-
H ₂ +CO ₂ (3 атм)	+	н.о.	н.о.
Дигидроксиацетон	+	н.о.	н.о.
Спирты:			
Глицерин	Глицерин	Глицерин	Глицерин
Этиленгликоль	Этиленгликоль	Этиленгликоль	Этиленгликоль
1,3-пропандиол	1,3-пропандиол	1,3-пропандиол	1,3-пропандиол
1,2-пропандиол	+	н.о.	н.о.
1,4-бутандиол	+	н.о.	н.о.
Пентанол-1	+	+	+
Пропанол-1	+	+	+
Бутанол-1	+	+	+
Этанол	+	+	+
Метанол	+	+	+

Характеристика	<i>Desulfovibrio alcoholivorans</i> SPSN ^T	Штамм Jg1-12	Штамм Hg7-11
Карбоновые кислоты:			
Лактат	+	+	+
Формиат	+	+	+
Пируват	+	+	+
Фумарат	+	+	+
Сукцинат	+	+	+
Малат	+	+	+
Акцепторы электронов:			
SO ₄ ²⁻	+	+	+
S ₂ O ₃ ²⁻	+	+	+
S	+	+	+
SO ₃ ²⁻	+	+	+
DMSFO	-	+	+
Источник выделения	Анаэробный промышленный ферментер, содержащий сточные воды ликероводочного завода (Франция)	Микробный мат источника Жойган (Тыва, Россия)	Микробный мат источника Хойто-Гол (Бурятия, Россия)
Авторы статей	Qatibi et al., 1991	Наши данные	

3.7.5. Характеристика железоредуцирующих бактерий

Накопительные культуры железоредуцирующих бактерий, использующие пептон в качестве субстрата, были представлены длинными подвижными палочками (рисунок 35).

Из четырех накопительных культур железовосстанавливающих бактерий была выделена тотальная ДНК. С помощью таксон-специфичных праймеров к доменам *Bacteria* и *Archaea* амплифицированы фрагменты генов 16S рРНК (область 500-900 по *E. coli*). Проведено их разделение методом ДГГЭ и определены нуклеотидные последовательности генов 16S рРНК индивидуальных

полос. С архейными праймерами ПЦР-продукт не был обнаружен. ПЦР-продукт на бактериальных праймерах наблюдался во всех пробах.

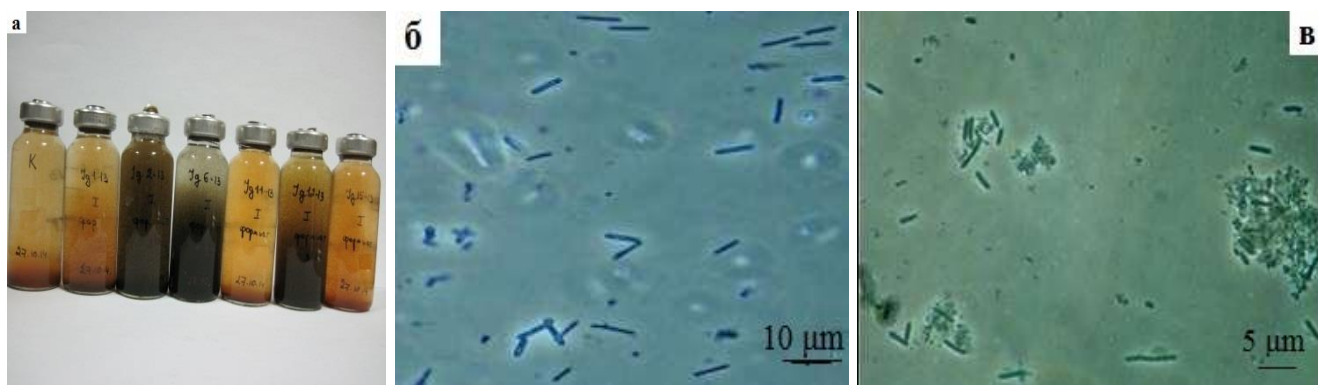


Рисунок 35. а – накопительные культуры железоредуцирующих бактерий, выделенные из проб источника Жойган на среде с слабокристаллическим оксидом железа (III) и пептоном; б – морфология железоредуцирующих бактерий (Jg1); в – морфология железоредуцирующих бактерий (Jg12)

Идентифицировать флотипы получилось только из трех проб накопительных культур. В четвертой пробе Jg7-12 было мало ПЦР-продукта, получить чёткие полосы для анализа ДГГЭ не удалось. Количество детектированных флотипов в накопительных культурах пробы Jg9-13 составило 4, а в пробах Jg10a-13 и Jg12-13 – по 3. Филогенетический анализ железовосстанавливающих накопительных культур выявил доминирование представителей филума *Firmicutes* – класса грамположительных бактерий *Clostridia*. В накопительных культурах выявились последовательности близкие к последовательностям известных видов *Thermincola ferriacetica* (Zavarzina et al., 2007) и *Calderihabitans maritimus* (Yoneda et al., 2013), которые обладают способностью к железоредукции (рисунок 36).

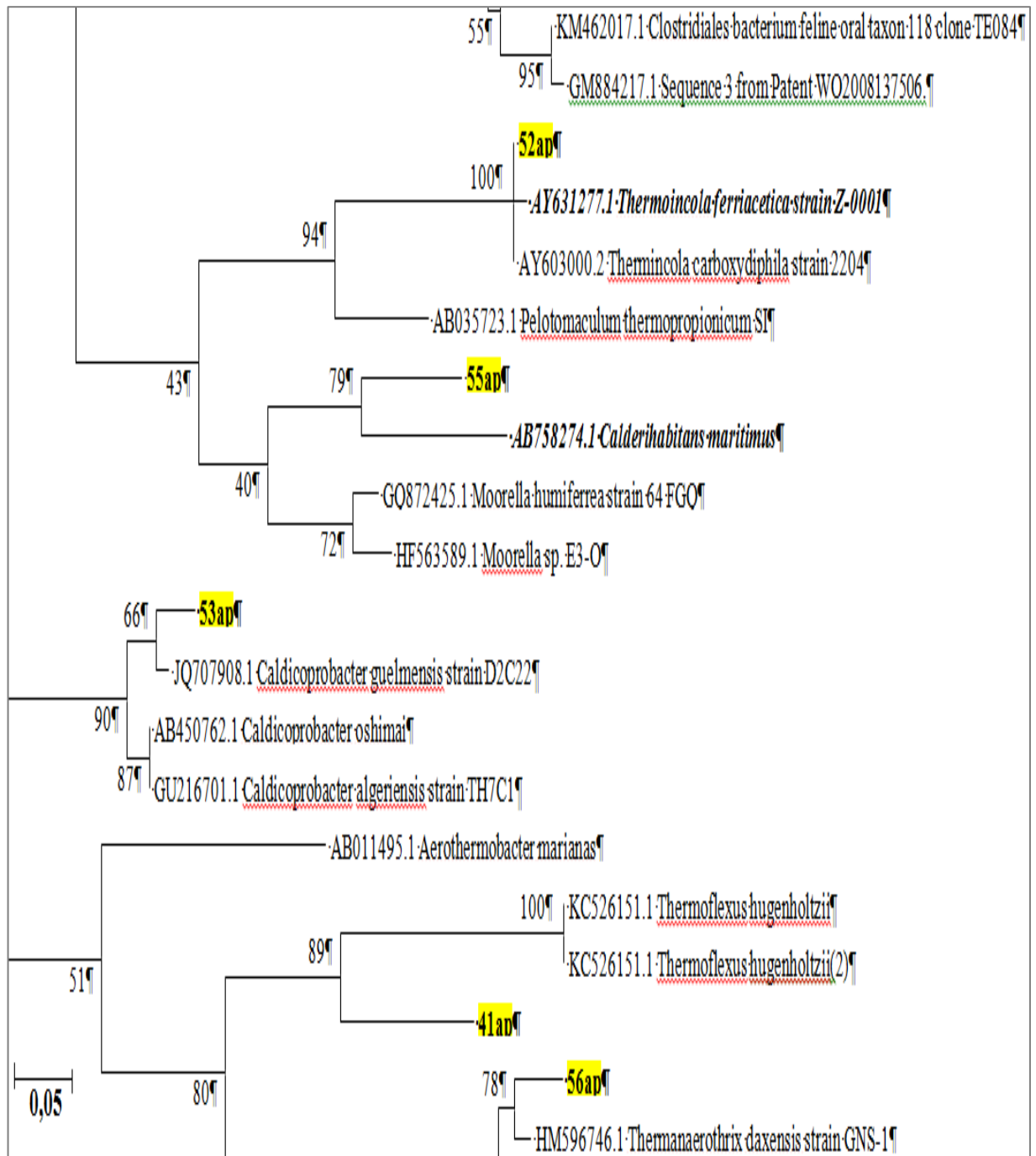


Рисунок 36. Филогенетическое положение накопительных культур железоредуцирующих бактерий. Дендограмма построена с использованием метода Maximum Likelihood на основании сравнения генов 16S рРНК. Масштаб эволюционных расстояний соответствует 5 заменам на 100 аминокислот последовательности. Bootstrap-тест включал построение 700 альтернативных деревьев

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые для оценки микробного разнообразия минеральных источников Восточного Саяна были использованы молекулярно-генетические методы, что позволило охарактеризовать структуру бактериальных популяций и определить функционально значимые группы для их последующего целенаправленного культивирования и изучения физиолого-биохимических свойств.

В исследуемых гидротермах обнаружены разнообразные филогенетические группы прокариот, полностью обеспечивающие замкнутые круговороты основных биогенных элементов. Удалось выявить как сходства, так и различия в составе основных доминирующих групп в изливающейся воде и микробных матах гидротерм. Филум *Proteobacteria* является доминирующим в микробном сообществе как воды, так и матов. Известно, что представители филума *Proteobacteria* широко распространены в самых различных местах обитания, характеризуются большим разнообразием и высокой численностью (Парфенова и др., 2013; Wemheuer et al., 2013; Colman et al., 2014; Sorokin et al., 2014). Но среди *Proteobacteria* в воде источника доминируют представители разных родов бактерий.

В воде источника Хойто-Гол преобладают широко распространенные в водных экосистемах флотипы бактерий, преимущественно аэробных хемоорганотрофов, в то время как в микробном мате доминируют аэробные и анаэробные микроорганизмы, участвующие в круговороте серы. Доминирование бактерий цикла серы являлось отличительной особенностью микробных матов источника Хойто-Гол, что обусловлено значительным содержанием соединений серы, в том числе сульфидов. Важная роль бактерий серного цикла в источнике Хойто-Гол подтверждается высокими интенсивностями процесса сульфатредукции, а также высокими интенсивностями аноксигенного фотосинтеза, осуществляемого пурпурными несерными бактериями (*Rhodopseudomonas palustris*, *Rhodobacter capsulatus*, *Rhodomicrobium vannielii*, *Rubrivivax gelatinosus*), зелеными нитчатými бактериями (*Oscillochloris trichoides*) и зелеными серобактериями (*Chlorobium limicola*), относящимися к трем

филумам: *Proteobacteria*, *Chloroflexi* и *Chlorobi*.

Особенностью филогенетического разнообразия микробного сообщества источника Жойган является преобладание хемолитоавтотрофных микроорганизмов, участвующих в образовании и окислении водорода. Доминирование водород-использующих бактерий в микробном сообществе воды и мата является возможным индикатором значительного вулканогенного влияния. Подобное предположение подтверждается сходством данных с ранее исследованными сообществами просачивающихся сильнощелочных слабоминерализованных источников (Suzuki et al., 2013; Brazelton et al., 2012; Brazelton et al., 2013), так называемых «окон» в подземную гидросферу.

При культивировании бактерий с использованием общепринятых питательных сред, из источников Хойто-Гол и Жойган выделялись одинаковые виды бактерий, несмотря на разницу в таксономическом составе, определенном с помощью параллельного секвенирования. Среди сульфатредуцирующих бактерий выделены чистые культуры, растущие на лактате натрия, отнесенные к известному виду *Desulfovibrio alcoholovorans* (99% сходства). Все выделенные чистые культуры бесцветных сероокисляющих бактерий принадлежат к известному виду *Thiobacillus thioparus* (99-100% сходства).

Таким образом, 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 и метаболически хорошо сбалансированное сложное сообщество, где каждая группа занимает свою экологическую нишу.

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 параллельного 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 микробном сообществе источников Хойто-Гол и Жойган были обнаружены сульфатредуцирующие бактерии *Desulfovibrio alcoholovorans* (99% сходства), сероокисляющие бактерии *Thiobacillus thioparus* (99-100% сходства). Среди группы аноксигенных фототрофных бактерий идентифицированы зеленые нитчатые бактерии *Oscillochloris trichoides*, зеленые серобактерии *Chlorobium limicola*, пурпурные несерные бактерии *Rhodopseudomonas polustris*, *Rhodopseudomonas 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 СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

DMS – диметилсульфид

DMSO – диметилсульфоксид

Eh – окислительно-восстановительный потенциал

Fe-ОБ – железоокисляющие бактерии

Fe-РБ – железоредуцирующие бактерии

Na-КМЦ – натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы

АТФ – аденозинтрифосфорная кислота

АФБ – аноксигенные фототрофные бактерии

БХл – бактериохлорофилл

ДГГЭ (DGGE) – денатурирующий градиентный гель-электрофорез

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ЗНБ – зеленые нитчатые бактерии

ЗСБ – зеленые серобактерии

ОВ – органическое вещество

ОТЕ – операциональная таксономическая единица

ПНБ – пурпурные несерные бактерии

ПСБ – пурпурные серобактерии

ПЦР – полимеразная цепная реакция

рРНК – рибосомальная рибонуклеиновая кислота

СОБ – сероокисляющие бактерии

СРБ – сульфатредуцирующие бактерии

СЭМ – сканирующий электронный микроскоп

ТЭМ – трансмиссионная электронная микроскопия

Хл – хлорофилл

ЦРБ – целлюлозоразлагающие бактерии

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аракчаа, К. Д. Природный аржаанный комплекс «Чойганские минеральные воды» и аржаан Борзу-Холь: перспективы туристско- и лечебно-рекреационного освоения / К. Д. Аракчаа. – Кызыл: РИО ТувГУ, 2012. – 51 с.
2. Басков, Е. А. Гидротермы Земли / Е. А. Басков, С. Н. Суриков. – Л.: Недра, 1989. – 245 с.
3. Белькова, Н. Л. Молекулярно-генетические методы анализа микробных сообществ / Н. Л. Белькова // Разнообразие микробных сообществ внутренних водоемов России: учебно-методическое пособие; под ред. А.М. Андреевой. – Ярославль: Изд-во ООО «Принтхаус», 2009. – С. 53–63.
4. Болдарева, Е.Н. Новая аэробная бактериохлорофилл а-содержащая бактерия *Roseococcus suduntuyensis* sp. nov., выделенная из слабоминерализованного содового озера Восточной Сибири / Е. Н. Болдарева, Т. П. Турова, Т. В. Колганова // Микробиология. – 2009. – Т. 78. – № 1. – С. 106-116.
5. Бонч-Осмоловская, Е. А. Анаэробная деструкция органического вещества в цианобактериальных матах источника Термофильного / Е. А. Бонч-Осмоловская, В.М. Горленко, Г.А. Карпов, Д.А. Старынин // Микробиология. – 1987. – Т. 56. – С. 1022–1028.
6. Бонч-Осмоловская, Е. А. Биоразнообразие анаэробных литотрофных прокариот в наземных гидротермах Камчатки / Е. А. Бонч-Осмоловская, М. Л. Мирошниченко, А. И. Слободкин, Т. Г. Соколова, Г. А. Карпов, Н. А. Кострикина, Д. Г. Заварзина, М. И. Прокофьева, И. И. Русанов, Н. В. Пименов // Микробиология. – 1999. – Т. 68. – № 3. – С. 398–406.
7. Борисенко, И. М. Минеральные воды Бурятской АССР / И. М. Борисенко, Л. В. Замана. – Улан-Удэ: Бурятское книжное изд-во, 1978. – 162 с.
8. Брянская, А. В. Биогеохимические процессы в альгобактериальных матах щелочного термального Уринского источника / А. В. Брянская, З. Б. Намсараев, О. М. Калашникова, Д. Д. Бархутова, Б. Б. Намсараев, В. М. Горленко // Микробиология. – 2006. – Т. 75. – № 5. – С. 702–712.

9. Брянцева, И.А. *Heliobacterium sulfidophilum* sp. nov. и *Heliobacterium undosum* sp. nov.: сульфидокисляющие гелиобактерии из термальных сероводородных источников / И.А. Брянцева, В.М. Горленко, Т.П. Турова, Б.Б. Кузнецов, А.М. Лысенко, С.А. Быкова, В.Ф. Гальченко, Л.Л. Митюшина, Г.А. Осипов // Микробиология. – 2000. – Т. 69. – № 3. – С. 396-406.
10. Булыгина, Е. С. Изучение нуклеотидных последовательностей *pifH* генов у представителей метанотрофных бактерий / Е. С. Булыгина, Б. Б. Кузнецов, А. И. Марусина, И. К. Кравченко, С. А. Быкова, Т. В. Колганова, В. Ф. Гальченко // Микробиология. – 2002. – Т. 71. – № 4. – С. 500–508.
11. Гланц, С. А. Медико-биологическая статистика / С. А. Гланц; пер. с англ. Ю. А. Данилова, под ред. Н. Е. Бузикашвили и Д. В. Самойлова. – Москва: Практика, 1998. – 459 с.
12. Горленко В.М., Намсараев Б.Б., Кулырова А.В., Заварзина Д.Г., Жилина Т.Н. Активность сульфатредуцирующих бактерий в донных осадках содовых озер Юго-Восточного Забайкалья // Микробиология. – 1999. – Т. 68. – № 5. – С. 664–670.
13. Горленко, В. М. Влияние температуры на распространение фототрофных бактерий в термальных источниках / В.М. Горленко, Е.И. Компанцева, Н.Н. Пучкова // Микробиология. – 1985. – Т. 54. – №5. – С. 848-853.
14. Горленко, В. М. О принадлежности сине-зеленой водоросли *Oscillatoria coerulea* Gicklhorn, 1921 к новому роду хлоробактерий *Oscillochloris* nov. gen / В. М. Горленко, Т. А. Пивоварова // Известия академии наук СССР. – Сер. Биология. – 1977. – № 3. – С. 396–409.
15. Горленко, В. М. Формирование микробных матов в горячих источниках и активность продукционных и деструкционных процессов / В. М. Горленко, Е. А. Бонч-Осмоловская // Кальдерные микроорганизмы. – М.: Наука, 1989. – Гл. IV. – С. 72–82.
16. Горленко, В. М. Экология водных микроорганизмов / В. М. Горленко, Г. А. Дубинина, С. И. Кузнецов. – М.: Наука, 1977. – 289 с.

17. Горленко, В.М. Аноксигенные фоторофные бактерии / В.М. Горленко // Труды Института микробиологии им. С.Н. Виноградского: Вып.15: Фотосинтезирующие микроорганизмы: отв. ред. В. Ф. Гальченко. – М.: МАКС Пресс, 2010. – С. 133-174.
18. Грабович, М. Ю. Участие прокариот в круговороте серы / М. Ю. Грабович // Соросовский образовательный журнал. – 1999. – № 12. – С. 16–20.
19. Громов, Б. В. Экология бактерии: учебное пособие / Б. В. Громов, Г. В. Павленко. – Л.: Изд-во Ленинградского университета, 1989. – 248 с.
20. Громов, Б.В. Цианобактерии в биосфере / Б.В. Громов // Соросовский образовательный журнал. Биология. – 1996. – №9. – С. 33-39.
21. Гумеров, В. М. Молекулярный анализ биоразнообразия микроорганизмов в источнике Заварзина, Кальдера Узон, Камчатка / В. М. Гумеров, А. В. Марданов, А. В. Белецкий, Е. А. Бонч-Осмоловская, Н. Н. Равин // Микробиология. – 2011. – Т. 80. – № 2. – С. 258–265.
22. Данилова, Э. В. Влияние экологических условий на распределение функциональных групп микроорганизмов в минеральных источниках Хойто-Гол (Восточные Саяны) / Э. В. Данилова, Д. Д. Бархутова, А. В. Брянская, З. Б. Намсараев, Б. Б. Намсараев // Сибирский экологический журнал . – 2009. – № 1. – С. 45–53.
23. Данилова, Э. В. Структурно-функциональная организация микробного сообщества минеральных источников Восточных Саян: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.16, 03.00.07 /Данилова Эржена Викторовна. – Улан-Удэ, 2001. – 21 с.
24. Дубинина, Г. А. Новые нитчатые фотосинтезирующие бактерии с газовыми вакуолями / Г. А. Дубинина, В. М. Горленко // Микробиология. – 1975. – Т. 44. – № 2. – С. 511–517.
25. Дульцева, Н. М. *Thiobacillus sajanensis* sp. nov. – новая облигатно автотрофная сероокисляющая бактерия, выделенная из сероводородных источников Хойто-Гол, Бурятия / Н. М. Дульцева, Т. П. Турова, Е. М.

- Спиридонова, Т. В. Колганова, Г. А. Осипов, В. М. Горленко // Микробиология. – 2006. – Т. 75. – № 5 – С. 670–681.
26. Заварзин Г.А., Жилина Т.Н., Кевбрин В.В. Алкалофильное микробное сообщество и его функциональное разнообразие / Г.А. Заварзин, Т.Н. Жилина, В.В. Кевбрин // Микробиология. – 1999. – Т. 68. – № 5. – С. 579-600.
27. Заварзин, Г. А. Бактерии и состав атмосферы / Г. А. Заварзин. – М.: Наука, 1984. – 199 с.
28. Заварзин, Г. А. Бактерии и состав атмосферы / Г. А. Заварзин. – М.: ЛЕНАНД, 2014. – 200 с.
29. Заварзин, Г. А. Введение в природоведческую микробиологию / Г. А. Заварзин, Н. Н. Колотилова. – М.: Наука, 2001. – 256 с.
30. Заварзин, Г. А. Лекции по природоведческой микробиологии / Г. А. Заварзин. – М.: Наука, 2003. – 348 с.
31. Заварзин, Г. А. Литотрофные микроорганизмы / Г. А. Заварзин. – М.: Наука, 1972. – 323 с.
32. Заварзин, Г. А. Становление биосферы / Г. А. Заварзин // Вестник РАН. – 2001. – Т. 71. – № 11. – С. 988–1001.
33. Заварзин, Г.А. Эволюция прокариотной биосферы: «Микробы в круговороте жизни». 120 лет спустя: Чтение им. С.Н. Виноградского // Г. А. Заварзин, ред. Колотилова Н.Н. – М.: МАКС Пресс, 2011. – 144 с.
34. Захарова, Ю. Р. Метод культивирования микроорганизмов, окисляющих железо и марганец в донных отложениях озера Байкал / Ю.Р. Захарова, В.В. Парфенова // Известия РАН. Серия биологическая. – 2007. – № 3. – С. 290-295.
35. Калашников, А. М. Аноксигенные фототрофные бактерии микробных сообществ термального источника Горячинск (Прибайкалье) / А. М. Калашников, В. А. Гайсин, М. В. Сухачева, Б. Б. Намсараев, А. Н. Пантелеева, Е. Н. Нуянзина-Болдарева, Б. Б. Кузнецов, В. М. Горленко // Микробиология. – 2014. – Т. 83. – № 4. – С. 484–499.

36. Калюжный, С.В. Анаэробная биологическая очистка сточных вод / С. В. Калюжный, Д. А. Данилович, А. Н. Ножевникова // Итоги науки и техники, сер. Биотехнология. – М.: ВИНТИ, 1991. — 187 с. – Т. 29.
37. Кашкак, Е. С. Филогенетическое и функциональное разнообразие прокариот мезотермального источника Хойто-Гол (Восточный Саян, Бурятия) / Е. С. Кашкак, Н. Л. Белькова, Э. В. Данилова, О. П. Дагурова, Б. Б. Намсараев, В. М. Горленко // Микробиология. – 2016. – Т.85. – №5. – С. 555-567.
38. Кашкак, Е. С. Формирование и функционирование микробных матов минерального источника Хойто-Гол (Восточный Саян). / Е. С. Кашкак, В. А. Гайсин, О. П. Дагурова, И. А. Брянцева, Э. В. Данилова // Известия Самарского научного центра РАН. – 2016. – Т.18. – №2(2). – С. 397-402.
39. Кашкак, Е. С. Биохимическая характеристика целлюлозоразлагающих бактерий гидротерм Хойто-Гол / Е. С. Кашкак, Э. В. Данилова // Вестник Бурятского госуниверситета. – 2012. – Выпуск 4. Химия, физика.– С. 73-76.
40. Крайнов, С. Р. Геохимия подземных вод: теоретические, прикладные и экологические аспекты / С. Р. Крайнов, Б. Н. Рыженко, В. М. Швец; отв. ред. Н. П. Лаверов. – Москва: ЦентрЛитНефтеГаз, 2012. – 670 с.
41. Кузнецов, С. И. Методы изучения водных микроорганизмов / С. И. Кузнецов, Г. А. Дубинина. – М.: Наука, 1989. – 288 с.
42. Кузнецов, С. И. Микробиологическое изучение внутренних водоемов / С. И. Кузнецов, В. И. Романенко. – Л.: Изд-во АН СССР, 1963. – 129 с.
43. Курильщикова, А.М. Методы и объекты метагеномных исследований / А. М. Курильщикова, Н. В. Тикунова, М. Р. Кабилов // Вестник НГУ. Серия: биология, клиническая медицина. – 2012. – Т. 10. – № 1. – С. 191-201.
44. Лазарева, Е. В. Минералообразование в цианобактериальных матах щелочных гидротерм Баргузинской впадины Байкальской рифтовой зоны / Е. В. Лазарева, А. В. Брянская, С. М. Жмодик, С. З. Смирнов, О. П. Пестунова, Д. Д. Бархутова, Е. В. Полякова // Доклады академии наук. – 2010. – Т. 430. – № 5. – С. 675–680.

45. Методы общей бактериологии: под ред. Ф. Герхарда и др., пер. с англ. В 3 т. Том 2. – М.: Мир, 1984. – 472 с.
46. Намсараев, Б. Б. Геохимическая деятельность микроорганизмов гидротерм Байкальской рифтовой зоны // Б. Б. Намсараев, Д. Д. Бархутова, Э. В. Данилова, А. В. Брянская, С. П. Бурюхаев, Е. Ж. Гармаев, В. М. Горленко, О. П. Дагурова, В. Б. Дамбаев, С. В. Зайцева, Л. В. Замана, А. М. Зякун, Е. В. Лаврентьева, З. Б. Намсараев, А. М. Плюснин, А. В. Татаринов, А. В. Турунхаев, В. В. Хахинов, Д. Д. Цыренова, Л. И. Ялович; под ред. В. М. Вайнштейна. – Новосибирск: Академическое издательство «Гео», 2011. – 302 с.
47. Намсараев, Б. Б. Полевой практикум по водной микробиологии и гидрохимии: методическое пособие / Б. Б. Намсараев, В. М. Горленко, З. Б. Намсараев, В. В. Хахинов. – М.-Улан-Удэ: Изд-во Бурятского госуниверситета, 2005. – 87 с.
48. Намсараев, З. Б. Структура и биогеохимическая активность фототрофных сообществ щелочного Большереченского термального источника / З. Б. Намсараев, В. М. Горленко, Б. Б. Намсараев, С. П. Бурюхаев, В. В. Юрков // Микробиология. – 2003. – Т. 72. – № 2. – С. 228-238.
49. Перельман, А. И. Геохимия / А. И. Перельман – М.: Высшая школа, 1989. – 528 с.
50. Петрова, О.Е. Сульфатредуцирующие бактерии в биологической переработке промышленных отходов, содержащих нитроцеллюлозу / О.Е. Петрова, М.Н. Давыдова, Н.Б. Тарасова, Ф.К. Мухитова // Вестн. Моск. Ун-та. – 2003. – Сер. 2. Химия. – Т. 44. – №1. – С. 43-45.
51. Пиневиц, А. В. Микробиология. Биология прокариотов: в 3 т. Том 2 / А. В. Пиневиц. – СПб.: Изд-во С.-Петербур. университета, 2007. – 331 с.
52. Пиннекер, Е. В. Минеральные воды Тувы / Е. В. Пиннекер. – Кызыл: Тувинское книжное издательство, 1968. – 105 с.
53. Посохов, Е. В. Минеральные воды (лечебные, промышленные, энергетические) / Е. В. Посохов, Н.И. Толстихин. – Л.: Недра, 1977. – 240 с.

54. Посохов, Е. В. Общая гидрогеохимия / Е. В. Посохов. – Л.: Недра, 1975. – 208 с.
55. Практикум по микробиологии: учебное пособие для студентов высших учебных заведений / А. И. Нетрусов, М. А. Егорова, Л. М. Захарчук и др.: под ред. А. И. Нетрусова. – М.: Издательский центр «Академия», 2005. – 608 с.
56. Принципы и методы биохимии и молекулярной биологии / Под ред. К. Уилсон и Дж. Уолкер; пер. с англ. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2013. – 848 с.
57. Раднагуруева, А. А. Органотрофные бактерии горячих источников Байкальской рифтовой зоны / А. А. Раднагуруева, Е. В. Лаврентьева, В. Г. Будагаева, Д. Д. Бархутова, Я. Е. Дунаевский, Б.Б. Намсараев // Микробиология. – 2016. – Т. 85. – № 3. – С. 347–360.
58. Резников, А. А. Методы анализа природных вод / А. А. Резников, Е. П. Муликовская, И. Ю. Соколов. – М.: Недра, 1970. – 488 с.
59. Современная биология. Прокариоты: в 2-х т. / Под ред. Ленгелера Й, Дрекса Г., Шлегеля Г.; пер. с англ. И.В. Алферовой, А.В. Лебединского и К.Л. Тарасова. – М.: Изд-во «Мир», 2005. – 496 с. – 2 т.
60. Современная биология. Прокариоты: в 2-х т. / Под ред. Ленгелера Й, Дрекса Г., Шлегеля Г.; пер. с англ. И.А. Берга, Р.Н. Ивановского, А.И. Нетрусова, Д.И. Никитина и В.К. Плакунова. – М.: Изд-во «Мир», 2005. – 654 с. – 1 т.
61. Татаринев, А. В. Бактериальные сообщества термального источника Хойто-Гол (Восточные Саяны) и эколого-геологические условия их формирования / А. В. Татаринев, Э. В. Данилова, Л. И. Ялович, Д. Д. Бархутова, З. Б. Намсараев, А. В. Брянская, А. М. Плюснин // Геохимия. – 2010. – № 2. – С. 164–173.
62. Татаринев, А. В. Участие микроорганизмов в образовании травертинов и сапропелитового керогена в отложениях термальных углекислых вод Байкальской рифтовой зоны / А. В. Татаринев, Л. И. Ялович, Э. В. Данилова, З. Б. Намсараев // Доклады Академии наук. – 2006. – Т. 411. – № 4. – С. 1435–1438.

63. Экология микроорганизмов: учебник для бакалавров / А. И. Нетрусов, Е. А. Бонч-Осмоловская, В. М. Горленко и др.; под общ. ред. А. И. Нетрусова. – М.: Изд-во Юрайт, 2013. – 268 с.
64. Юрков, В. В. Влияние лимитирующих факторов на структуру фототрофных сообществ в Большереченских термальных источниках / В. В. Юрков, В. М. Горленко, Л. Л. Митюшина, Д. А. Старынин // Микробиология. – 1991. – Т. 60. – № 6. – С. 129–138.
65. Alsop E.B., Boyd E.S., Raymond J. Merging metagenomics and geochemistry reveals environmental controls on biological diversity and evolution // BMC Ecol. – 2014. – V.14:16. – P. 1–12: doi: 10.1186/1472-6785-14-16.
66. Amann, R.I. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation / R.I. Amann, W. Ludwig, K.H. Schleifer // Microbiol. Rev. – 1995. – V. 59. – P. 143–169.
67. Bak, F. Chemolithotrophic growth of *Desulfovibrio sulfodismutans* sp.nov.by disproportionation of inorganic sulfur compounds / F. Bak, N. Pfennig // Arch. Microbiol. – 1987. – V. 147. – P. 184–189.
68. Baumgartner, L. K. Sulfate reducing bacteria in microbial mats: Changing paradigms,new discoveries / L. K. Baumgartner, R. P. Reid, C. Dupraz, A. W. Decho, D. H. Buckley, J. R. Spear, K. M. Przekop, P. T. Visscher // Sedimentary Geology. – 2006. – V. 185. – P. 131-145.
69. Beja, O. Unsuspected diversity among marine aerobic anoxygenic phototrophs / O. Beja, M. T. Suzuki, J. F. Heidelberg, W. C. Nelson, C. M. Preston, T. Hamada, J. A. Eisen, C. M. Fraser, E. F. De Long // Nature. – 2002. – V. 415. – P. 630–633.
70. Bhaya, D. Population level functional diversity in a microbial community revealed by comparative genomic and metagenomic analyses / D. Bhaya, A.R. Grossman, A.-S. Steunou, N. Khuri, F.M. Cohan, N. Hamamura, M.C. Melendrez, M.M. Bateson, D.M. Ward, J.F. Heidelberg // Int. Soc. Microbial. Ecol. J. – 2007. – V.1. – P. 703–713.
71. Biddle, J. F. Metagenomic signatures of the Peru Margin seafloor biosphere show a genetically distinct environment / J.F. Biddle, S. Fitz-Gibbon, S.C.

- Schuster, J.E. Brenchley, C.H. House // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2008. – V. 105. – №30. – P. 10583–10588.
72. Bos, P. Microbiology of sulphur oxidizing bacteria / P. Bos, J. Kuenen // Microbial corrosion. – London: The metals society, 1983. – P. 18-27.
73. Brazelton, W. J. Bacterial communities Associated with Subsurface Geochemical Processes in Continental Serpentine Springs / W. J. Brazelton, P. L. Morrill, N. Szponar, M. O. Schrenk // Appl. Environ. Microbiol. – 2013. – V. 79. – № 13. – P. 3906–3916: doi: 10.1128/AEM.00330-13.
74. Brazelton, W. J. Metagenomic evidence for H₂ oxidation and H₂ production by serpentine-hosted subsurface microbial communities / W. J. Brazelton, B. Nelson, M. O. Schrenk // Front. Microbiol. – 2012. – V. 2. – № 268. – P. 1–14. doi: 10.3389/fmicb.2011.00268.
75. Brock, T.D. Sulfolobus: a new genus of sulfur-oxidizing bacteria living at low pH and high temperature / T.D. Brock, K.M. Brock, R.T. Belly, R.L. Weiss // Arch. Mikrobiol. – 1972. – V. 84. – P. 54–68.
76. Brüser, T. The biological sulfur cycle / T. Brüser, P. N. L. Lens, H. G. Trüper // Environmental Technologies to Treat Sulfur Pollution: principles and engineering. – London: IWA Publishing, 2000. – P. 47–86.
77. Bryant, D. A. Candidatus *Chloracidobacterium thermophilum*: an aerobic phototrophic *Acidobacterium* / D. A. Bryant, A. M. Garcia Costas, J. A. Maresca, A. G. Chew, C. G. Klatt, M. M. Bateson, L. J. Tallon, J. Hostetler, W. C. Nelson, J. F. Heidelberg, D. M. Ward // Science. – 2007. – V. 317. – P. 523–526.
78. Bryant, D. A. Prokaryotic photosynthesis and phototrophy illuminated / D. A. Bryant, N. U. Frigaard // Trends Microbiol. – 2006. – V. 14. – № 11. – P. 488–496.
79. Caldwell, D. *Thermothrix thioparus* gen. et sp. nov. a facultatively anaerobic facultative chemolithotroph living at neutral pH and high temperature / D. Caldwell, S. Caldwell, and J. Laycock // Can. J. Microbiol. – 1976. – V. 22. – № 10. – P. 1509-1517.

80. Campbell, B. J. The versatile *ε-Proteobacteria*: key players in sulphidic habitats / B. J. Campbell, A. S. Engel, M. L. Porter, K. Takai // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2006. – V. 4. – P. 458–468: doi: 10.1038/nrmicro1414.
81. Canfield, D.E. Biogeochemical cycles of carbon, sulfur, and free oxygen in a microbial mat / D.E. Canfield, D.J. Des Marais // *Geochim. Cosmochim. Acta.* – 1993. – V. 57. – P. 3971–3984.
82. Casamayor, E. O. Changes in archaeal, bacterial and eukaryal assemblages along a salinity gradient by comparison of genetic fingerprinting methods in a multipond solar saltern / E. O. Casamayor, R. Massana, S. Benlloch, L. Øvreas, B. Díez, V. J. Goddard, J. M. Gasol, I. Joint, F. Rodríguez-Valera, C. Pedrós-Alió // *Environ. Microbiol.* – 2002. – V. 4. – P. 338–348.
83. Casamayor, E. O. Microheterogeneity in 16S rDNA-defined bacterial populations from a stratified planktonic environment is related to temporal succession and to ecological adaptations / E. O. Casamayor, C. Pedrós-Alió, G. Muyzer, R. Amann // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2002. – V. 68. – P. 1706–1714.
84. Cole, J. R. Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis / J. R. Cole, Q. Wang, J. A. Fish, B. Chai, D. M. McGarrell, Y. Sun, C. T. Brown, A. Porras-Alfaro, C. R. Kuske, J. M. Tiedje // *Nucl. Acids Res.* – 2014. – V. 42. – P. D633–D642 : doi: 10.1093/nar/gkt1244.
85. Colman, D. R. An analysis of geothermal and carbonic springs in the western United States sustained by deep fluid inputs / D. R. Colman, J. R. Garsia, L. J. Crossey, K. Karlstrom, O. Jackson-Weaver, C. Takacs-Vesbach // *Geobiology.* – 2014. – V. 12. – P. 83–98: doi:10.1111/gbi.12070.
86. Cox-Foster, D. L. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder / D. L. Cox-Foster, S. Conlan, E. C. Holmes, G. Palacios, J. D. Evans, N. A. Moran, P. Quan, T. Briese, M. Hornig, D. M. Geiser, et al. // *Science.* – 2007. – V. 318. – P. 283–287.
87. De Leon, K. B. Archaeal and bacterial communities in three alkaline hot springs in Heart Lake Geysir Basin, Yellowstone National Park / K. B. De Leon, R. Gerlach,

- B. M. Peyton, M. W. Fields // *Front. Microbiol.* – 2013. – V. 4:330. – P. 1–10: doi: 10.3389/fmicb.2013.00330.
88. Dorigo, U. Molecular approaches to the assessment of biodiversity in aquatic microbial communities / U. Dorigo, L. Volatier, J. Humbert // *Water Research.* – 2005. – V. 39. – P. 2207–2218.
89. Douglas, S. Structural and geomicrobiological characteristics of a microbial community from a cold sulfide spring / S. Douglas, D. D. Douglas // *Geomicrobiol. J.* – 2001. – V. 18. – № 4. – P. 401–422.
90. Dridi, B. *Methanomassiliicoccus luminyensis* gen. nov., sp. nov., a methanogenic archaeon isolated from human faeces / B. Dridi, M. L. Fardeau, B. Ollivier, D. Raoult, M. Drancourt // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2012. – V. 62. – P. 1902–1907.
91. Dupraz, C. Microbial lithification in marine stromatolites and hypersaline mats / C. Dupraz, P.T. Visscher // *Trends Microbiol.* – 2005. – V. 13. – P. 429–438.
92. Edwards, R. A. Using pyrosequencing to shed light on deep mine microbial ecology / R.A. Edwards, B. Rodriguez-Brito, L. Wegley, M. Haynes, M. Breitbart, D. M. Peterson, M. O. Saar, S. Alexander, E. C. Alexander Jr., F. Rohwer // *BMC Genomics.* – 2006. – V. 7. – № 57. – P. 1-13: doi: 10.1186/1471-2164-7-57.
93. Ehrenreich, A. Anaerobic oxidation of ferrous iron by purple bacteria, a new type of phototrophic metabolism / A. Ehrenreich, F. Widdel // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1994. – V. 60. – № 12. – P. 4517–4526.
94. Everroad, R.G. Diversification of Bacterial Community Composition along a Temperature Gradient at a Thermal Spring // R.G. Everroad, H. Otaki, K. Matsuura, S. Haruta / *Microbes Environ.* – 2012. – V. 27. – № 4. – P. 374–381.
95. Ferrera, I. Thermophiles. In *Encyclopedia of Life Sciences* / I. Ferrera, A.-L. Reysenbach. – London: John Wiley and Sons, 2007. – P. 1-9: doi: 10.1002/9780470015902.a0000406.
96. Ferris, M. J. Population structure and physiological changes within a hot spring microbial mat community following disturbance / M. J. Ferris, S. C. Nold, N. D.

- Revsbech, D. M. Ward // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1997. – V. 63. – P. 1367–1374.
97. Fowler, V. J. Towards a phylogeny of phototrophic purple sulfur bacteria 16S rRNA oligonucleotide cataloguing of 11 species of *Chromatiaceae* / V. J. Fowler, N. Pfennig, W. Schubert, E. Stackebrandt // *Arch. Microbiol.* – 1984. – V. 139. – P. 382–387.
98. Franks, J. Flat laminated microbial mat communities / J. Franks, J. F. Stolz // *Earth-Science Reviews* 96. – 2009. – P. 163–172.
99. Fuscler, K. Elemental sulfur as an intermediate of sulfide oxidation with oxygen by *Desulfolobus propionicus* / K. Fuseler, H. Cypionka // *Arch. Microbiol.* – 1995. – V. 164. – P. 104–109.
100. Gaisin, V. A. Filamentous anoxygenic phototrophic bacteria from cyanobacterial mats of Alla hot springs (Barguzin Valley, Russia) / V. A. Gaisin, A. M. Kalashnikov, M. V. Sukhacheva, Z. B. Namsaraev, D. D. Barhutova, V. M. Gorlenko, B. B. Kuznetsov // *Extremophiles.* – 2015. – V. 19. – № 6. – P. 1067–1076.
101. Gibson, J. *Chloroherpeton thalassium* gen. nov. et spec. nov., a non-filamentous, flexing and gliding green sulfur bacterium / J. Gibson, N. Pfennig, J. B. Waterbury // *Arch. Microbiol.* – 1984. – V. 138. – № 2. – P. 96–101.
102. Gilbride, K.A. Molecular techniques in wastewater: understanding microbial communities, detecting pathogens, and real-time process control / K.A. Gilbride, D.Y. Lee, L.A. Beaudette // *J. Microbiol. Methods.* – 2006. – V. 66 – P. 1–20.
103. Gorlenko, V. M. The genus *Chloronema* / V. M. Gorlenko, B. K. Pierson // *Bergey's manual of systematic bacteriology.* – New York: Springer, 2001. – V. 1. – P. 51–58.
104. Gray, N.F. *Biology of Wastewater Treatment* / N.F. Gray. – London: Imperial College Press, 2004. – P. 1164.
105. Hall, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT / T. Hall // *Nucleic Acids. Symposium Series.* – 1999. – № 41. – P. 95–98.

106. Hanada, S. *Roseiflexus castenholzii* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, filamentous, photosynthetic bacterium that lacks chlorosomes / S. Hanada, S. Takaichi, K. Matsuura, K. Nakamura // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2002. – V. 52. – P. 187–193.
107. Handelsman, J. Metagenomics: Application of Genomics to Uncultured Microorganisms / J. Handelsman // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 2004. – V. 68. – № 4. – P. 669–685: doi: 10.1128/MBR.68.4.669–685.2004
108. Harismendy, O. Evaluation of next generation sequencing platforms for population targeted sequencing studies / O. Harismendy, P. C. Ng, R. L. Strausberg, X. Wang, T. B. Stockwell, K. Y. Beeson, N. J. Schork, S. S. Murray, E. J. Topol, S. Levy, K. A. Frazer // *Genome Biol.* – 2009. – V.10. – № 3. R32: doi:10.1186/gb-2009-10-3-r32.
109. Heising, S. *Chlorobium ferrooxidans* sp. nov., a phototrophic green sulfur bacterium that oxidizes ferrous iron in coculture with a «Geospirillum» sp. strain / S. Heising, L. Richter, W. Ludwig, B. Schink // *Arch. Microbiol.* – 1999. – V. 172. – № 2. – P. 116–124.
110. Heising, S. Phototrophic oxidation of ferrous iron by a *Rhodomicrobium vannielii* strain / S. Heising, B. Schink // *Microbiology.* – 1998. – V. 144. – P. 2260–2269.
111. Hinck, S. Physiological adaptation of a nitrate-storing *Beggiatoa* sp. to diel cycling in a phototrophic hypersaline mat / S. Hinck, T.R. Neu, G. Lavik, M. Mussmann, D. de Beer, H.M. Jonkers // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2007. – V. 73. – P. 7013–7022.
112. Hiraishi, A. *Acidiphaere rubrifaciens* gen.nov., sp. nov., an aerobic bacteriochlorophyll-containing bacterium isolated from acidic environments / A. Hiraishi, Y. Matsuzawa, T. Kanbe, N. Wakao // *IJSEM.* – 2000. – V. 50. – P. 1539–1546.
113. Hiraishi, A. *Rhodoferax fermentans* gen. nov., sp. nov., a phototrophic purple nonsulfur bacterium previously referred to as the "*Rhodocyclus gelatinosus*-like" group / A. Hiraishi, Y. Hoshino, T. Saton // *Arch. Microbiol.* – 1991. – V. 155. – P. 330–336.

114. Hoehler, T.M. The role of microbial mats in the production of reduced gases on the early Earth / T.M. Hoehler, B.M. Bebout, D.J. Des Marais // *Nature*. – 2001. – V. 412. – P. 324–327.
115. Huang, Q. Archaeal and bacterial diversity in hot springs on the Tibetan Plateau, China / Q. Huang, C. Z. Dong, R. M. Dong, H. Jiang, S. Wang, G. Wang, B. Fang, X. Ding, L. Niu, X. Li, C. Zhang, H. Dong // *Extremophiles*. – 2011. – V. 15. – P. 549–563: doi: 10.1007/s00792-011-0386-z.
116. Hugenholtz, P. Novel division level bacterial diversity in a Yellowstone hot spring / P. Hugenholtz, C. Pitulle, K.L. Hershberger, N.R. Pace // *J. Bacteriol.* – 1998. – V. 180. – P. 366–376.
117. Imhoff, J. F. Functional gene sequence studies of pure cultures are the basis of systematic studies of environmental communities of phototrophic bacteria / J. F. Imhoff // *Bull. BISMIS*. – 2011. – V. 2. – Pt. 2. – P. 107–115.
118. Imhoff, J. F. Phylogenetic taxonomy of the family *Chlorobiaceae* on the basis of 16S rRNA and *fmo* (Fenna-Matthews-Olson protein) gene sequences / J. F. Imhoff // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2003. – V. 53. – P. 941–951.
119. Imhoff, J. F. Rearrangement of the species and genera of the phototrophic "purple nonsulfur bacteria" / J. F. Imhoff, H. G. Trüper, N. Pfennig // *Int. J. Syst. Bacteriol.* – 1984. – V. 34. – P. 340–343.
120. Janssen, A. J. H. Application of the redox potential for controlling a sulfide oxidizing bioreactor / A. J. H. Janssen, S. Meijer, J. Bontsema, G. Lettinga // *Biotechnology and Bioengineering*. – 1998. – V. 60. – № 2. – P. 147–155.
121. Jiang, H. Abundance and diversity of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in saline lakes on the Tibetan plateau / H. Jiang, H. Dong, B. Yu, G. Lv, S. Deng, Z. Wu, M. Dai, N. Jiao // *FEMS Microbiol Ecol.* – 2009. – V. 67. – P. 268–278.
122. Jonkers, H.M. Structural and functional analysis of a microbial mat ecosystem from a unique permanent hypersaline inland lake: "La Salada de Chiprana" (NE Spain) / H.M. Jonkers, R. Ludwig, R. De Wit, O. Pringault, G. Muyzer, H. Niemann, N. Finke, D. de Beer // *FEMS Microbiol. Ecol.* – 2003. – V. 44. – P. 175–189.

123. Keer, J.T. Molecular methods for the assessment of bacterial viability / J.T. Keer, L. Birch // *Journal of Microbiological Methods*. – 2003. – V. 53. – P. 175 – 183.
124. Kelly, D. P. Reclassification of Some Species of *Thiobacillus* to the Newly Designated Genera *Acidithiobacillus* gen. nov., *Halothiobacillus* gen. nov., and *Thermithiobacillus* gen. nov. / D. P. Kelly, A. P. Wood // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2000. – V. 50. – P. 511–516.
125. Keppen, O. I. Proposal of *Oscillochloridaceae* fam. nov. on the basis of a phylogenetic analysis of the filamentous anoxygenic phototrophic bacteria, and emended description of *Oscillochloris* and *Oscillochloris trichoides* in comparison with further new isolates / O. I. Keppen, T. P. Tourova, B. B. Kuznetsov, R. N. Ivanovsky, V. M. Gorlenko // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2000. – V. 50. – № 4. – P. 1529–1537.
126. Kim, B.H. Sulfur bacteria and the oxidation of sulfur compounds. / B.H. Kim, G.M. Gadd // *Bacterial Physiology and Metabolism*. – New York: Cambridge University Press, 2008. – P. 358-362.
127. Kimble, L. K. *Heliobacterium modesticaldum*, sp. nov., a thermophilic heliobacterium of hot springs and volcanic soils / L. K. Kimble, L. Mandelco, C. R. Woese, M. T. Madigan // *Arch. Microbiol.* – 1995. – V. 163. – P. 259–267.
128. Klappenbach, J. A. Phylogenetic and physiological characterization of a filamentous anoxygenic photoautotrophic bacterium 'Candidatus *Chlorothrix halophila*' gen. nov., sp. nov., recovered from hypersaline microbial mats / J. A. Klappenbach, B. K. Pierson // *Arch. Microbiol.* – 2004. – V. 181. – № 1. – P. 17–25: doi: 10.1007/s00203-003-0615-7.
129. Krekeler, D. A sulfate-reducing bacterium from the oxic layer of a microbial mat from Solar Lake (Sinai), *Desulfovibrio oxycliniae* sp. nov. / D. Krekeler, P. A. Teske, Sigalevich, H. Cypionka, Y. Cohen // *Arch. Microbiol.* – 1997. – V. 167. – P. 369-375.
130. Krekeler, D. The preferred electron acceptor of *Desulfovibrio desulfuricans* CSN / D. Krekeler, H. Cypionka // *FEMS Microbiol. Ecol.* – 1995. – V. 17. – № 4. – P. 271–277.

131. Lane, D. J. 16S/23S rRNA sequencing / D. J. Lane // *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. – New York, USA: John Wiley and Sons, 1991. – P. 115–175.
132. Lavrentieva, E. V. Bacterial Diversity in Two Microbial Mats from Hot Springs of Baikal Rift Zone / E. V. Lavrentieva, A. A. Radnagurueva, T. G. Banzaraktsaeva, D. D. Barkhutova // *Extremophiles. 10th International Congress on Extremophiles*. – Saint Petersburg, 2014. – P. 139.
133. Ledergerber, C Base-calling for next-generation sequencing platforms / C. Ledergerber, C. Dessimoz // *Brief. Bioinform.* – 2011. – V. 12. – № 5. – P. 489–497: doi:10.1093/bib/bbq077.
134. Liu, L. Comparison of Next-Generation Sequencing Systems / L. Liu, Y. Li, S. Li, N. Hu, Y. He, R. Pong, D. Lin, L. Lu, M. Law // *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. – 2012. – P. 1-11: doi:10.1155/2012/251364.
135. Lopez-Lopez, O. Hot Spring Metagenomics / O. López-López, M. E. Cerdán, M. I. González-Siso // *Life*. – 2013. – V. 2. – P. 308-320: doi: 10.3390/life3020308.
136. Macalady, J.L. Dominant Microbial Populations in Limestone-Corroding Stream Biofilms, Frasassi Cave System, Italy / J.L. Macalady, E.H. Lyon, B. Koffman, L.K. Albertson, K. Meyer, S. Galdenzi, S. Mariani // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2006. – V. 72. – № 8. – P. 5596-5609.
137. Madigan, M. T. Brock Biology of Microorganisms / M. T. Madigan, J. M. Martinko, K. S. Bender, D. H. Buckley, D. A. Stahl. – Fourteenth edition. – Pearson Education, 2014. – 1136 p.
138. Madigan, M. T. Family VI. “Heliobacteriaceae” / M. T. Madigan / *Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology: 2nd edn.* – 2001. – New York: Springer, 2001. – V. 1. – P. 625–626.
139. Madigan, M.T. Anoxygenic phototrophic bacteria from extreme environments / M.T. Madigan // *Photosynth. Res.* – 2003. – V. 76. – P. 157–171.
140. Malik, S. The use of molecular techniques to characterize the microbial communities in contaminated soil and water / S. Malik, M. Beer, M. Megharaj, R. Naidu // *Environment International*. – 2008. – V. 34. – P. 265–276.

141. Medova, H. High abundances of aerobic anoxygenic phototrophs in saline steppe lakes / H. Medova, E. N. Boldareva, P. Hrouzek, S. V. Borzenko, Z. B. Namsaraev, V. M. Gorlenko, B. B. Namsaraev, M. Kobl'iz'ek // FEMS Microbiol. Ecol. – 2011. – V. 76. – P. 393–400.
142. Meisinger, D.B. In situ detection of novel Acidobacteria in microbial mats from a chemolithoautotrophically based cave ecosystem (Lower Kane Cave, WY, USA) / D.B. Meisinger, J. Zimmermann, W. Ludwig, K.-H. Schleifer, G. Wanner, M. Schmid, P.C. Bennet, A.S. Engel, N.M. Lee // Environ. Microbiol. – 2007. – V. 9. – P. 1523–1534.
143. Miller, S.R. Bar-coded pyrosequencing reveals shared bacterial community properties along the temperature gradients of two alkaline hot springs in Yellowstone National Park // S.R. Miller, A.L. Strong, K.L. Jones, M.C. Ungerer / Appl. Environ. Microbiol. – 2009. – V. 75. – № 13. – P. 4565–4572.
144. Miller, S.R. Effects of visible light and UV radiation on photosynthesis in a population of a hot spring cyanobacterium, a *Synechococcus* sp., subjected to high-temperature stress / S.R. Miller, C.E. Wingard, R.W. Castenholz // Appl. Environ. Microbiol. – 1998. – V. 64. – P. 3893–3899.
145. Moriarty, D. J. W. The role of microorganisms in aquaculture ponds / D. J. W. Moriarty // Aquaculture. – 1997. – V. 151. – № 1–4. – P. 333–349.
146. Muyzer, G. Phylogenetic relationships of *Thiomicrospira* species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments / G. Muyzer, A. Teske, C. O. Wirsen, H. W. Jannasch // Arch. Microbiol. – 1995. – V. 164. – P. 165–172.
147. Muyzer, G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA / G. Muyzer, E. C. De Waal, A. G. Uitterlinden // Appl. Environ. Microbiol. – 1993. – V. 59. – P. 695–700.
148. Nakagawa, S. *Sulfurihydrogenibium yellowstonense* sp. nov., an extremely thermophilic, facultatively heterotrophic, sulfur-oxidizing bacterium from Yellowstone National Park, and emended descriptions of the genus

- Sulfurihydrogenibium, Sulfurihydrogenibium subterraneum and Sulfurihydrogenibium azorense / S. Nakagawa, Z. Shtaih, A. Banta, T.J. Beveridge, Y. Sako and A.L. Reysenbach // *Int. J. Sys. Evol. Microbiol.* – 2005. – V. 55. – № 6. – P. 2263-2268.
149. Nakagawa, T. Phylogenetic characterization of microbial mats and streamers from a Japanese alkaline hot spring with a thermal gradient / T. Nakagawa, F. Manabu // *J. Gen. Appl. Microbiol.* – 2002. – V. 48. – P. 211–222.
150. Neekelanta, G. The Use of Metagenomic Approaches to Analyze changes in Microbial communities / G. Neelakanta, H. Sultana // *Microbiology Insights.* – 2013. – № 6. – P. 37-48.
151. Nisbet, E. G. The habitat and nature of early life / E. G. Nisbet, N. H. Sleep // *Nature.* – 2001. – V. 409. – P. 1083-1091.
152. Odintsova, E. V. *Thermothrix azorensis* sp. nov., an obligately chemolithoautotrophic, sulfur-oxidizing, thermophilic bacterium / E.V. Odintsova, H.W. Jannasch, J.A. Mamone and T.A. Langworthy // *Int. J. Sys. Evol. Microbiol.* – 1996. – V. 46. – № 2. – P. 422-428.
153. Odom, J. M. *The Sulfate-reducing Bacteria: Contemporary Perspectives* / J. M. Odom, Jr. R. Singleton. – New York: Springer-Verlag New York Inc., 1993. – 290 p.
154. Oyaizu, H. The green non-sulfur bacteria: a deep branching in the eubacterial line of descent / H. Oyaizu, B. Debrunner-Vossbrinck, L. Mandelco, J. A. Studier, C. R. Woese // *Syst. Appl. Microbiol.* – 1987. – V. 9. – P. 47–53.
155. Padan, E. Anoxygenic photosynthesis / E. Padan, Y. Cohen // *The biology of cyanobacteria.* – Berkeley: University of California Press. – 1982. – P. 215–235.
156. Paerl, H.W. Cyanobacterial-bacterial mat consortia: examining the functional unit of microbial survival and growth in extreme environments / H.W. Paerl, J.L. Pinckney, T.L. Steppe // *Environ. Microbiol.* – 2000. – V. 2. – P. 11–26.
157. Palenik, B. Coastal *Synechococcus* metagenome reveals major roles for horizontal gene transfer and plasmids in population diversity / B. Palenik, Q. Ren, V. Tai, I. T. Paulsen // *Environ. Microbiol.* – 2009. – V. 11. – P. 349–359.

158. Pfennig, N. Anreicherungskulturen für rote und grüne Schwefelbakterien / N. Pfennig // Zentbl. Bakt. Parasitenk. 1965. – Abt. 1. – Suppl. 1. – P. 179–189.
159. Pfennig, N. Photosynthetic bacteria / N. Pfennig // Ann. Rev. Microbiol. – 1967. – V. 21. – P. 285–324.
160. Pfennig, N. Phototrophic green and purple bacteria: a comparative systematic survey / N. Pfennig // Ann. Rev. Microbiol. – 1977. – V. 31. – P. 275–290.
161. Pfennig, N. Über das Vitamin B12 – bedürfnis phototropher Schwefel bakterien / N. Pfennig, K. D. Lippert // Arch. Mikrobiol. – 1966. – V. 55. – P. 245–256 (in German).
162. Pierson, B.K. A phototrophic, gliding filamentous bacterium of hot springs, *Chloroflexus aurantiacus*, gen. and sp. nov. / B.K. Pierson, R.W. Castenholz // Arch. Microbiol. – 1974. – V. 100. – P. 5–24.
163. Pimenov, N.V. In situ activities in thermal environments / N.V. Pimenov, E.A. Bonch-Osmolovskaya // In Methods in microbiology. Elsevier, London, United Kingdom. – 2006. – V. 35. – P. 29–53.
164. Pokorna, D. Sulfur-oxidizing Bacteria in Environmental Technology, Biotechnology Advances / D. Pokorna, J. Zabranska. – 2015. – V. 33. – P. 1246–1259: doi:10.1016/j.biotechadv.2015.02.007.
165. Qatibi, A. I. *Desulfovibrio alcoholovorans* sp. nov., a sulfate-reducing bacterium able to grow on glycerol, 1,2- and 1,3-propanediol / A.I. Qatibi, V. Niviere, J. L. Garcia // Arch. Microbiol. – 1991. – V. 155. – P. 143–148.
166. Quail, M. A. A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers / M. A. Quail, M. Smith, P. Coupland, T. D. Otto, S. R. Harris, T. R. Connor, A. Bertoni, H. P. Swerdlow, Y. Gu // BMC Genomics. – 2012. – V. 13. – № 341. – P. 1–13.
167. Rabus, R. Dissimilatory Sulfate- and Sulfur-Reducing Prokaryotes / R. Rabus, T. A. Hansen, F. Widdel // Prokaryotes. – 2006. – V. 2. – P. 659–768: doi: 10.1007/0-387-30742-7_22.
168. Rappe, M. S. The uncultured microbial majority / M. S. Rappe, S. J. Giovannoni // Annu. Rev. Microbiol. – 2003. – V. 57. – P. 369–394.

169. Revsbech, N. D. Microelectrode studies of interstitial water chemistry and photosynthetic activity in a hot spring microbial mat / N. D. Revsbech, D. M. Ward // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1984. – V. 48. – № 2. – P. 270–275.
170. Revsbech, N.P. Microelectrode studies of the photosynthesis and O₂, H₂S, and pH profiles of a microbial mat / N.P. Revsbech, B.B. Jørgensen, T.H. Blackburn, Y. Cohen // *Limn. Oceanogr.* – 1983. – V. 28. – P. 1062–1074.
171. Reynolds, J. The use of lead citrate of high pH as electron opaque in electron microscopy / J. Reynolds // *J. Cell. Biol.* – 1963. – V. 17. – № 1. – P. 208–218.
172. Riesenfeld, C. S. Metagenomics: genomic analysis of microbial communities / C. S. Riesenfeld, P. D. Schloss, J. Handelsman // *Annu Rev Genet.* – 2005. – V. 38. – P. 525–552.
173. Robertson, L. A. The colorless sulfur bacteria / L. A. Robertson, J. G. Kuenen // *The Prokaryotes.* – New York: Springer, 2006. – V. 2. – P. 985–1011.
174. Rossello-Mora, R. The species concept for prokaryotes / R. Rossello-Mora, R. Amann // *FEMS Microbiol Rev* 2001;25:39–67.
175. Rozanov, A. S. Molecular analysis of the benthos microbial community in Zavarzin thermal spring (Uzon Caldera, Kamchatka, Russia) / A. S. Rozanov, A. V. Bryanskaya, T. K. Malup, I. A. Meshcheryakova, E. V. Lazareva, O. P. Taran, T. V. Ivanisenko, V. A. Ivanisenko, S. M. Zhmodik, N. A. Kolchanov, S. E. Peltek // *BMC Genomics.* – 2014. – V. 15. – P. 1–15: doi:10.1186/1471-2164-15-S12-S12.
176. Sand, W. Microbial life in geothermal waters / W. Sand // *Geothermics.* – 2003. – V. 32. – P. 655–667: doi:10.1016/S0375-6505(03)00058-0.
177. Sanger, F. Nucleotide sequence of bacteriophage φX174 DNA / F.Sanger, G.M. Air, B.G. Barrell, N.L. Brown, A.R. Coulson, J.C. Fiddes, C.A. Hutchison, P.M. Slocombe, M. Smith // *Nature.* – 1977. – V. 265. – P. 687-690.
178. Schmidt, T. M. Sulfur metabolism in *Beggiatoa alba* / T. M. Schmidt, B. Arieli, Y. Cohen, E. Padan, W. R. Strohl // *J. Bacteriol.* – 1987. – V. 169. – P. 5466–5472.
179. Shendure, J. Next-generation DNA sequencing / J. Shendure, H. Ji // *Nat. Biotechnol.* – 2008. – V. 26. – P. 1135–45.

180. Sievert, S. M. The Sulfur Cycle / S. M. Sievert, R. P. Kiene, H. N. Schulz-Vogt // Oceanography Society. – 2007. – V. 20. – № 2. – P. 117–123.
181. Skirnisdottir, S. Influence of Sulfide and Temperature on Species Composition and Community Structure of Hot Spring Microbial Mats // S. Skirnisdottir, G.O. Hreggvidsson, S. Hjörleifsdottir, V.T. Marteinson, S.K. Petursdottir, O. Holst, J.K. Kristjansson / Appl. Environ. Microbiol. – 2000. – V. 66. – № 7. – P. 2835–2841.
182. Slobodkin, A. *Thermoterrabacterium ferrireducens* gen. nov., sp. nov., a thermophilic anaerobic dissimilatory Fe(III)-reducing bacterium from a continental hot spring / A. Slobodkin, A-L. Reysenbach, N. Strutz, M. Dreier, J. Wiegel // Int. J. Syst. Bacteriol. – 1997. – V. 47. – P. 541–547.
183. Stackebrandt, E. Anoxygenic phototrophic across the phylogenetic spectrum: current understanding and future perspectives / E. Stackebrandt, F. A. Rainey, N. Ward-Rainey // Arch. Microbiol. – 1996. – V. 166. – № 4. – P. 211–223.
184. Stackebrandt, E. Towards a phylogeny of phototrophic purple sulfur bacteria the genus *Ectothiorhodospira* / E. Stackebrandt, V. J. Fowler, W. Schubert, J. F. Imhoff // Arch. Microbiol. – 1984. – V. 137. – P. 366–370.
185. Stanier, R. Y. The methods of microbiology / R. Y. Stanier, J. L. Ingraham, M. L. Wheelis, P. R. Painter // The Microbial. World: 5th edn. –NJ: Prentice Hall, 1986. – 28 p.
186. Stetter, K. Extremophiles and their adaption to hot environments / K. Stetter // FEBS Letters. – 1999. – V. 452. – P. 22–25.
187. Stieglmeier, M. *Nitrososphaera viennensis* gen. nov., sp. nov., an aerobic and mesophilic, ammonia-oxidizing archaeon from soil and a member of the archaeal phylum Thaumarchaeota / M. Stieglmeier, A. Klingl, R. J. E. Alves, S. K.-M. R. Rittmann, M. Melcher, N. Leisch, C. Schleper // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2014. – V. 64. – P. 2738–2752.
188. Stolz, J.F. Bacterial Intracellular Membranes. In Embryonic Encyclopedia of Life Sciences. – London: Nature Publishing Group, 2006. www.els.net.

189. Straub, K. L. *Rhodovulvum iodosum* sp.nov. and *Rhodovulvum robiginosum* sp.nov., two new marine phototrophic ferrous-iron-oxidizing purple bacteria / K. L. Straub, F. A. Rainey, F. Widdel // *Int. J. Syst. Bacteriol.* – 1999. – V. 49. – P. 729–735: doi: 10.1099/00207713-49-2-729.
190. Streit, W. R. Metagenomics – the key to the uncultured microbes / W. R. Streit, R. A. Schmitz // *Current Opinion in Microbiology.* – 2004. – V. 7. – P. 492–498.
191. Streit, W.R. Metagenomics – the key to the uncultured microbes / W.R. Streit, R.A. Schmitz // *Curr. Opin. Microbiol.* – 2004. – V. 7. – № 5. – P. 492–498.
192. Suzuki, S. Microbial diversity in The Cedars, an ultrabasic, ultrareducing, and low salinity serpentizing ecosystem / S. Suzuki, S. Ishii, A. Wu, A. Cheung, A. Tenney, G. Wanger, J. G. Kuenen, K. H. Nealson // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2013. – V. 110. – P. 15336–15341: doi: 10.1073/pnas.1302426110.
193. Tamura, K. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. / K. Tamura, G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski, S. Kumar // *Mol. Biol. Evol.* – 2013. – V. 30. – P. 2725–2729.
194. Tang, K. Bacteria of the sulphur cycle: An overview of microbiology, biokinetics and their role in petroleum and mining industries / K. Tang, V. Baskaran, M. Nemati // *Biochemical Engineering Journal.* – 2009. – V. 44. – P. 73–94.
195. Tobler, D. J. Bacterial diversity in five Icelandic geothermal waters: temperature and sinter growth rate effects / D. J. Tobler, L. G. Benning // *Extremophiles.* – 2011. – V. 15. – P. 473–485: doi: 10.1007/s00792-011-0378-z.
196. Turnbaugh, P.J. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest / P. J. Turnbaugh, R.E. Ley, M.A. Mahowald, V. Magrini, E.R. Mardis, J.I. Gordon // *Nature.* – 2006. – V. 444. – P. 1027–1031: doi:10.1038/nature05414
197. van der Meer, M.T.J. Diel variations in carbon metabolism by green nonsulfur-like bacteria in alkaline siliceous hot spring microbial mats from Yellowstone National Park / M.T.J. van der Meer, S. Schouten, M.M. Bateson, U. Nuebel, A. Wieland, M. Koehl, J.W. de Leeuw, D.J.S. Sinninghe, D.M. Ward // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2005. – V. 71. – P. 3978–3986.

198. Visscher, P.T. Microbial mats as bioreactors: populations, processes, and products / P.T. Visscher, J.F. Stolz // *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* – 2005. – V. 219. – P. 87–100.
199. Visscher, P.T. Formation of lithified micritic laminae in modern marine stromatolites (Bahamas): the role of sulfur cycling / P.T. Visscher, R.P. Reid, B.M. Bebout, S.E. Hoefft, I.G. Macintyre, Jr. J. Thompson // *Am. Min.* – 1998. – V. 83. – P. 1482–1491.
200. Walter, M. R. Paleontology of Devonian thermal spring deposits, Drummond Basin, Australia / M. R. Walter, S. McLoughlin, A. N. Drinnan, J. D. Farmer // *Alcheringa.* – 1998. – V. 22. – P. 285–314.
201. Wang, Q. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy / Q. Wang, G. M. Garrity, J. M. Tiedje, J. R. Cole // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2007. – V. 73. – P. 5261–5267: doi: 10.1128/AEM.00062-07
202. Ward, D.M. Cyanobacterial ecotypes in the microbial mat community of Mushroom Spring (Yellowstone National Park, Wyoming) as species-like units linking microbial community composition, structure, and function. / D.M. Ward, M.M. Bateson, M.J. Ferris, M. Kuehl, A. Wieland, A. Koepfel, F.M. Cohan // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* – 2006. – V. 361. – P. 1997–2008.
203. Wemheuer, B. Microbial diversity and biochemical potential encoded by thermal spring metagenomes derived from the Kamchatka Peninsula / B. Wemheuer, R. Taube, P. Akyol, F. Wemheuer, R. Daniel // *Archaea.* – 2013. – V. 2013. – P. 1–13: doi: 10.1155/2013/136714.
204. Widdel, F. Ferrous iron oxidation by anoxygenic phototrophic bacteria / F. Widdel, S. Schnell, S. Heising, A. Ehrenreich, B. Assmus, B. Schink // *Nature.* – 1993. – V. 362. – P. 834–835.
205. Willems, A. Transfer of *Rhodocyclus gelatinosus* to *Rubrivivax gelatinosus* gen. nov., comb. nov., and phylogenetic relationships with *Leptothrix*, *Sphaerotilus natans*, *Pseudomonas saccharophila*, and *Alcaligenes latus* / A. Willems, M. Gillis, J. De Ley // *Int. J. Syst. Bacteriol.* – 1991. – V. 41. – P. 65–73.

206. Wilson, K. Preparation of Geomic DNA from Bacteria // Current Protocols in Molecular Biology. – 2001:doi:10.1002/0471142727.mb0204s56.
207. Woese, C. R. Bacterial evolution / C. R. Woese // Microbiol. Rev. – 1987. – V. 51. – P. 221–271.
208. Woese, C. R. The phylogeny of purple bacteria: The gamma subdivision / C. R. Woese, W. G. Weisburg, C. M. Hahn, B. J. Paster, L. B. Zablen, B. J. Lewis, T. J. Macke, W. Ludwig, E. Stackebrandt // Syst. Appl. Microbiol. – 1985. – V. 6. – P. 25–33.
209. Yoneda, Y. A thermophilic, hydrogenogenic and carboxydophilic bacterium, *Calderihabitans maritimus* gen. nov., sp. nov., from a marine sediment core of an undersea caldera / Y. Yoneda, T. Yoshida, H. Yasuda, C. Imada, Y. Sako // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2013. – Pt. 10. – P. 3602–3608: doi: 10.1099/ijs.0.050468-0.
210. Zavarzina, D. G. *Thermincola ferriacetica* sp. nov., a new anaerobic, thermophilic, facultatively chemolithoautotrophic bacterium capable of dissimilatory Fe(III) reduction / D. G. Zavarzina, T. G. Sokolova, T. P. Tourova, N. A. Chernyh, N. A. Kostrikina, E. A. Bonch-Osmolovskaya // Extremophiles. – 2007. – V. 11. – № 1. – P. 1–7.
211. Zhivetev, M.A. The Role of Endophytic Microorganisms of Medicinal Plants in the Adaptation of Host Plants / M.A. Zhivetev, A.L. Turskaya, T.E. Putilina, Ju. A. Markova, I.A. Graskova, V.K. Voinikov // Journal of Stress Physiology & Biochemistry. – 2015. – V. 11. – № 3. – P. 62-70.

СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА

Рисунок 1. Схематическое представление метагеномного анализа (Neelakanta, Sultana, 2013)

Рисунок 2. Идеализированные профили для кислорода, сероводорода и pH в течение дня (light) и ночи (dark) (Dupraz, Visscher, 2005)

Рисунок 3. Круговорот серы (Madigan et al., 2014). Процессы окисления обозначены серыми стрелками, процессы восстановления черными стрелками. Реакции, протекающие без изменения окислительно-восстановительного потенциала, обозначены белыми стрелками. (DMS – диметилсульфид; DMSO – диметилсульфоксид)

Рисунок 4. Филогенетическое древо главных функциональных представителей различных филумов доменов *Bacteria* и *Archaea* на основании данных о последовательностях фрагментов гена 16S рРНК (Madigan et al., 2014). Синие ответвления – филумы *Bacteria* и красные ответвления – филумы *Archaea*

Рисунок 5. Филогенетическое древо представителей некоторых родов сульфатредуцирующих бактерий на основании данных о последовательностях фрагментов гена 16S рРНК (Madigan et al., 2014)

Рисунок 6. Карта расположения минеральных источников Хойто-Гол и Жойган

Рисунок 7. Схема расположения станций отбора проб на минеральном источнике Хойто-Гол. Станции отбора проб отмечены Hg1, Hg2, Hg2-1, Hg2-2, Hg2-3, Hg2-4, Hg3

Рисунок 8. Схема расположения станций отбора проб на минеральном источнике Жойган (карта-схема по Аракчаа, 2012). Станции отбора проб отмечены №1, №7, №8, №9, №10, №12, №19

Рисунок 9. (А) Микробный мат со станции Hg2. (Б) Спектр поглощения микробного мата

Рисунок 10. (А) Морфология нитчатых цианобактерий *Phormidium* sp. (Б) Морфология бесцветных серобактерий *Thiothrix* sp.

Рисунок 11. (А) Микробный мат со станции Hg2-1. (Б) Спектр поглощения микробного мата

Рисунок 12. Поверхность микробного мата со станции Hg2-1: 1 – минеральные отложения, формирующиеся на поверхности мата; 2 – элементный состав минеральных отложений

Рисунок 13. Микробные сообщества источника Жойган (станция Jg12): а – травертиновое поле с микробными матами и охристыми отложениями; б – спектр поглощения микробного мата; в – поверхность микробного мата с клетками диатомовых водорослей *Pinnularia* sp. и нитчатых цианобактерий

Рисунок 14. Микробные сообщества источника Жойган (станция Jg1): а – выход зелеными

матами и с бурым илом; б – сообщество мата, состоящее из диатомей, нитчатых цианобактерий и аноксигенных фототрофов, орудненных клеток бактерий; в - перекрученные ожелезненные нити железобактерий *Gallionella* sp. на поверхности мата; г - элементный состав минеральных отложений

Рисунок 15. Rarefaction анализ микробных сообществ минеральных источников Хойто-Гол (а) и Жойган (б). Показана зависимость количества флотипов на уровне родов (сплошные линии) и семейств (пунктирные линии) кластерного расстояния от количества проанализированных последовательностей 16S рРНК

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

Рисунок 17. Диаграммы Венна, показывающие анализ биоразнообразия микробных сообществ источника Хойто-Гол: а – на уровне семейств; б – на уровне родов

Рисунок 18. Диаграммы Венна, показывающие анализ биоразнообразия микробных сообществ источника Жойган: а – на уровне семейств; б – на уровне родов

Рисунок 19. Железоокисляющие бактерии, изолированные из микробного мата источника Жойган (станция Jg1): а – бурые колонии на чашке Петри; б – морфология клеток

Рисунок 20. Культура зеленой нитчатой бактерии *Oscillochloris trichoides*, (станция Hg2): а – морфология клеток; б – спектр поглощения клеток культуры

Рисунок 21. Филогенетическое положение зеленых нитчатых бактерий (штаммов Hg2-13, Hg5-13, Jg12,13). Дендрограмма построена с использованием метода Maximum Likelihood на основании сравнения 650 нуклеотидов гена 16S рРНК. Масштаб эволюционных расстояний соответствует 2 заменам на 100 аминокислот последовательности. Bootstrap-тест включал построение 700 альтернативных деревьев

Рисунок 22. (А) Морфология зеленой серобактерии *Chlorobium limicola*, выделенной из микробного мата станции Hg2-2. (Б) Спектр поглощения клеток культуры *Chlorobium limicola*

Рисунок 23. Морфология пурпурных серных бактерий: а – *Chromacium* sp.; б – *Thiocystis* sp.

Рисунок 24. Морфология пурпурных несерных бактерий: а – *Rhodobacter capsulatus*; б – *Rhodomicrobium vanniellii*

Рисунок 25. Морфология пурпурных несерных бактерий, изолированных из микробных матов источника Хойто-Гол: а – *Rhodopseudomonas polustris*; б – *Rhodoplanes elegans*

Рисунок 26. Пурпурные несерные бактерии *Rubrivivax gelatinosus* (а) и образующиеся ими микроколонии (б), изолированные из микробных матов источника Жойган

Рисунок 27. Пурпурные фототрофные бактерии, участвующие в «железном» фотосинтезе

с образованием окисных форм железа: а – *Rhodomicrobium vannielii*; б – *Rhodopseudomonas palustris*

Рисунок 28. а – морфология клеток тионовых бактерий *Thiobacillus thioparus*, с отложениями капель аморфной серы, выделенных из микробного мата станции Hg3; б – образование пленки в пробирках при культивировании бактерий *Thiobacillus thioparus*; в – поверхность пленки; г – элементный состав пленки

Рисунок 29. Филогенетическое положение сероокисляющих бактерий (штаммов ТВJ7, ТВJ8, ТВJ19, ТВН7). Дендрограмма построена с использованием метода Maximum Likelihood на основании сравнения 650 нуклеотидов гена 16S рРНК. Масштаб эволюционных расстояний соответствует 2 заменам на 100 аминокислот последовательности. Bootstrap-тест включал построение 700 альтернативных деревьев

Рисунок 30. Целлюлозоразлагающие бактерии, выделенные из проб микробных матов Хойто-Гол: а – культура Ц1 (Hg1); б – культура Ц2 (Hg2-2); в – культура Ц3 (Hg2-2)

Рисунок 31. Морфология и ультраструктура клеток штамма Jg1-12: а – препарат из среды без железа (II), фазово-контрастный микроскоп; б – тотальный препарат, электронный микроскоп; в – ультраструктура клеток, электронный микроскоп

Рисунок 32. Зависимость роста штаммов от: а – рН; б – Т; в – NaCl (1 – штамм Hg7-11, 2 – штамм Jg1-12)

Рисунок 33. Рост культур (оценка по количеству образованного сульфида) при использовании: а – акцепторов электронов; б – доноров электронов. Черные столбики – штамм Jg1-12, белые столбики – штамм Hg7-11

Рисунок 34. Филогенетическое положение сульфатредуцирующих бактерий (штаммов Hg7-11, Jg1-12). Дендрограмма построена с использованием метода Maximum Likelihood на основании сравнения 650 нуклеотидов гена 16S рРНК. Масштаб эволюционных расстояний соответствует 5 заменам на 100 аминокислот последовательности. Bootstrap-тест включал построение 700 альтернативных деревьев

Рисунок 35. а – накопительные культуры железоредуцирующих бактерий, выделенные из проб источника Жойган на среде с слабокристаллическим оксидом железа (III) и пептоном; б – морфология железоредуцирующих бактерий (Jg1); в – морфология железоредуцирующих бактерий (Jg12)

Рисунок 36. Филогенетическое положение накопительных культур железоредуцирующих бактерий. Дендограмма построена с использованием метода Maximum Likelihood на основании сравнения генов 16S рРНК. Масштаб эволюционных расстояний соответствует 5 заменам на 100 аминокислот последовательности. Bootstrap-тест включал построение 700 альтернативных деревьев