



УДК 574.472: 579.262 (553.721)

Идентификация доминирующих генотипов в микробных сообществах углекислых минеральных источников Жойган (Восточный Саян)

Е. С. Кашкак¹, Н. Л. Белькова^{2,3}, Э. В. Данилова⁴

¹Бурятский государственный университет, Улан-Удэ

²Цитологический институт СО РАН, Иркутск

³Иркутский государственный университет, Иркутск

⁴Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН, Улан-Удэ

E-mail: klslena@yandex.ru

Аннотация. На травертиновых платформах углекислых гидротерм Жойган (Восточные Саяны) проведён молекулярный анализ природных цианобактериальных сообществ, в которых выявлены представители следующих филумов бактерий: Cyanobacteria, Verrucomicrobia, Proteobacteria, Chloroflexi и археи Euryarchaeota. Анализ библиотеки клонов показал преобладание бактериального домена. Доминирующими являются цианобактерии (35 %), а среди протеобактерий преимущественно определены представители класса дельтапротеобактерии (17 %). Анализ функциональных характеристик микроорганизмов доминирующих генотипов в бактериальных матах показал, что они осуществляют процессы оксигенного и аноксигенного фотосинтеза, деструкции органического вещества, как в аэробных, так и анаэробных условиях, а также имеют хемолитотрофный метаболизм.

Ключевые слова: минеральные источники, микробные сообщества, разнообразие генотипов, молекулярно-генетические методы.

Введение

Гидротермальные проявления – уникальные природные лаборатории, в естественных условиях которых происходят процессы современного минералообразования. Возможное участие микроорганизмов в этих процессах привлекает особое внимание исследователей и остаётся одним из важных моментов доказательства активной их роли в функционировании геосистем и в круговороте элементов. Знания о функциональном, физиологическом, фенотипическом и генетическом разнообразии микроорганизмов, особенностях и закономерностях их распространения в гидротермальных экосистемах представляют огромный интерес для фундаментальной микробиологии, а также в связи с широкими перспективами их биотехнологического использования [2–8; 10]. В последнее время активное применение различных молекулярно-генетических подходов для исследования микроорганизмов из гидротерм позволило определить и детектировать новые группы

разного таксономического уровня и предложить оптимальные методы для их культивирования в лабораторных условиях [1; 11 и др.]. Изучение доминирующих групп микроорганизмов даёт возможность охарактеризовать основные биогеохимические процессы, реализующиеся в экосистеме, и получить информацию о функциональном статусе микробного сообщества в целом.

Район Восточных Саян представляет собой горную страну с проявлениями молодых тектонических сил и кайнозойского вулканизма, следствием которых является наличие в районе термальных и холодных углекислых источников, локализующихся в основном в зоне тектонических нарушений. Местность Жойган – это более 20 выходов термальных и холодных углекислых минеральных вод. Их общими характеристиками являются: преобладание в газовом составе CO_2 , температура термальной воды, не превышающая $38,5^\circ\text{C}$, нейтральные значения pH (6,0–7,5) и низкая минерализация (не более 1 г/дм^3) [9; 11]. Углекислые воды Восточных Саян образуют травертиновые платформы, возникновение которых обусловлено извлечением кальция из изверженных пород и последующим осаждением карбонатов [9; 10]. Экологические условия и физико-химические параметры воды источников являются оптимальными для жизнедеятельности различных функциональных групп микроорганизмов и их сообществ.

Целью настоящей работы стало изучение доминирующих генотипов в микробных сообществах бактериальных матов, формирующихся в различных экологических условиях минеральных источников Жойган.

Материалы и методы

Физико-химические характеристики воды минеральных источников определены общепринятыми методами с использованием портативных приборов: прецизионного pH-метра PRO (Сингапур), тестер-кондуктометра TDS-4 (Сингапур), ртутного максимального термометра. Концентрацию сульфида и сульфат-иона определяли колориметрическим и йодометрическим методом. Содержание гидрокарбонатов, углекислоты, кислорода анализировали с помощью титрования.

Выделение ДНК проводили коммерческими наборами ДНК-сорб-Б и РИБО-сорб по протоколам фирмы-производителя (ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва). ДНК, выделенную разными методами, использовали в качестве матрицы в полимеразной цепной реакции (ПЦР) с праймерами, комплементарными наиболее консервативным участкам гена 16S рРНК бактерий (в скобках дана нумерация нуклеотидов по *Escherichia coli*) 500L (514–533) и 1350R (1389–1407) [1]. Целевые ампликоны лигировали в векторе из коммерческого набора GeneJET™ PCR Cloning Kit (Fermentas, Литва), все реакции проводили по протоколу фирмы-производителя. Полученной лигазной смесью трансформировали компетентные клетки *E. coli* (штамм XL-1) по стандартной методике [12]. Анализ выросших колоний проводили методом ПЦР на плазмидных праймерах с использованием грубого лизата бактериальных клеток в качестве матрицы. Нуклеотидные после-

довательности определяли на автоматическом секвенаторе ABI 3130×1 (Genetic Analyzer, США) в ЦПК «Геномика» СО РАН (г. Новосибирск). Сравнительный анализ нуклеотидных данных выполнен с использованием пакета программ FASTA (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/fasta/nucleotide.html>).

Результаты и обсуждение

Минеральные источники Жойган имеют более 20 выходов термальных и холодных углекислых минеральных вод. Нами были изучены физико-химические характеристики (табл. 1) и микробиологический состав (табл. 2) шести из них.

Минеральные источники Жойган являются как термальными (Jg-3, Jg-8, Jg-11), так и низкотемпературными (Jg-1, Jg-4, Ж-10). Максимальная температура (37,8 °С) зарегистрирована на станции Jg-8, а минимальная (12,2 °С) – на станции Jg-1. Значения pH воды во всех источниках нейтральные или слабощелочные и варьируют от 6,8 до 8,2. Окислительно-восстановительный потенциал высокий от +176 до +350 мВ. Минерализация низкая, характерная для вод этого типа от 0,57 до 1,55 г/дм³.

Таблица 1

Физико-химическая характеристика минеральных источников Жойган

Станция отбора проб	Краткая характеристика источника	<i>t</i> , °С	pH	Eh, мВ	Минерализация, г/дм ³
Jg-1	Холодный железистый источник с красно-коричневыми агломератами, формирующими плотные слои	12,2	6,9	+233	1,30
Jg-3	Озерцо с глиной, бактериальные маты не сформированы, детектированы отдельные нити и взвешенные агломераты серого цвета	30,8	7,1	+207	1,55
Jg-8	Травertiновое поле, на котором развиваются цианобактериальные маты с чёрными вкраплениями и минеральными образованиями	37,8	8,2	+244	н. о*
Jg-11	Травertiновое поле, на котором развиваются светло-зелёные цианобактериальные маты с белыми минеральными вкраплениями	35,4	8,1	+244	н. о*
Jg-4	Источник «Молодость», озерцо с размерами 7×5 м, глубиной до 1,5 м, на дне которого формируется тонкая бактериальная пленка	14,9	6,9	+350	0,57
Ж-10	Холодный источник на левом берегу р. Аржан-Хем, пурпурный бактериальный мат	16,0	6,8	+176	1,50

Примечание: * н. о. – не определяли.

По химическому составу минеральные источники долины Жойган являются углекислыми с содержанием CO_2 от 78,9 до 664,1 мг/дм³; гидрокарбонатными, с содержанием HCO_3^{2-} от 744 до 1976 мг/дм³. На этой территории простирается мощное поле травертинов, которое свидетельствует о значительных выходах углекислых вод. Концентрация сульфатов в воде источников составила от 2,6 до 9,0 мг/дм³. Содержание кислорода небольшое от 0,4 до 6,0 мг/дм³.

В микробных сообществах бактериальных матов, формирующихся в разных экологических условиях, определено разнообразие доминирующих генотипов *in situ* методами молекулярно-генетического анализа. В микробном сообществе цианобактериальных матов, развивающихся на травертиновых платформах углекислых терм Жойган, обнаружены представители 8 филогенетических линий, в том числе археи, с доминированием цианобактерий (35,0 %) и протеобактерий (35,2 %) (рис.).

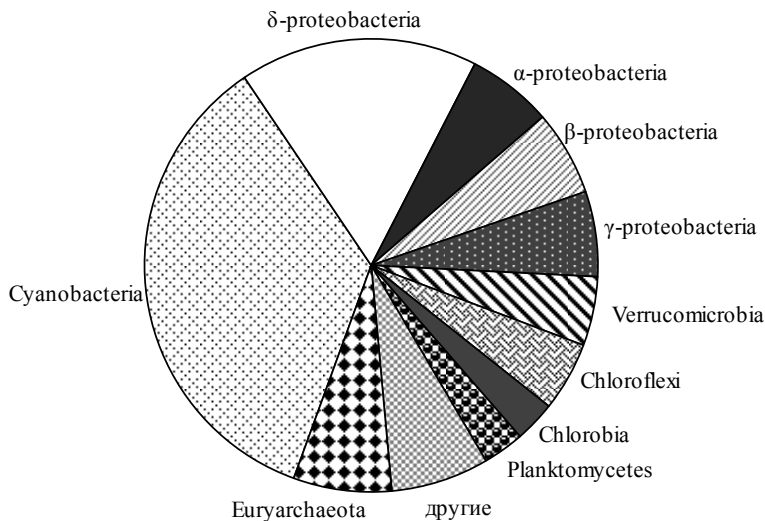


Рис. Филогенетическое разнообразие доминирующих генотипов прокариот в цианобактериальном сообществе гидротерм Жойган

В таблице 2 представлены результаты сравнительного анализа для последовательностей, гомология которых с ближайшими родственниками превысила 90 %.

Основная функция цианобактерий в бактериальных матах – фотосинтез, а также фиксация атмосферного азота. По результатам молекулярно-генетической идентификации определена нуклеотидная последовательность редко встречающейся цианобактерии *Cylyndrospermum* sp. Присутствие других цианобактерий ранее было показано микроскопическими методами и подтверждено в настоящей работе, это представители следующих родов: *Tychoneta*, *Napalosisiphon* и *Anabaena*.

Таблица 2

Разнообразие доминирующих генотипов микробных сообществ
углекислых минеральных источников Жойган

Станция	Название гомолога, процент сходства	Описание	
		Классификация организма	Экотоп гомолога
J-3	Methanomicrobiales archaeon, 97,3 %	Archaea; Euryarchaeota; Methanomicrobia; Methanomicrobiales	Мезофильные мета- ногенные осадки
Ж-10	Verrucomicrobiae bacterium, 93,1 %	Bacteria; Verrucomicrobia; Verru- comicrobiae; Verrucomi- crobiales	Древесина из архео- логических раскопок
J-4	<i>Opitutus</i> sp., 92,3 %	Bacteria; Verrucomicrobia; Opitutae; Opitutales; Opitutaceae; <i>Opitutus</i>	Анаэробные почвы рисовых полей
Ж-10	<i>Tychonema bourrellyi</i> , 98,1 %	Bacteria; Cyanobacteria; Oscillatoriales; <i>Tychonema</i>	—
J-3	<i>Cylindrospermum</i> sp., 95,4 %	Bacteria; Cyanobacteria; Nostocales; Nostoca- ceae; <i>Cylindrospermum</i>	—
J-11			
J-11			
J-11	<i>Hapalosiphon hibernicus</i> , 96,6 %	Bacteria; Cyanobacteria; Stigonematales; <i>Hapa- losiphon</i>	—
J-8	<i>Anabaena variabilis</i> , 94,7 %	Bacteria; Cyanobacteria; Nostocales; Nostoca- ceae; <i>Anabaena</i>	—
J-3	<i>Syntrophobacter fumaroxidans</i> , 90,0 %	Bacteria; Proteobacteria; Deltaproteobacteria; Syntrophobacterales; Syntrophobacteraceae <i>Syntrophobacter</i>	—
J-3	<i>Curvibacter</i> sp., 97,3 %	Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Comamonadaceae; <i>Curvibacter</i>	—
J-1	Бетапротеобактерия, 95,1 %	Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria	Пресноводный бактериопланктон
J-3	<i>Steroidobacter</i> sp., 93,5 %	Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Xanthomonadales; Sinobacteraceae; <i>Steroidobacter</i>	Мелководные при- брежные районы Японского моря (Япония)

Окончание табл. 2

Станция	Название гомолога, процент сходства	Описание	
		Классификация организма	Экотоп гомолога
J-3	Гаммапротеобактерия, 97,4 %	Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria	Микробные сообщества из высокогорных ледников Арктики (Канада)
J-8	<i>Longilinea arvoryzae</i> , 92,5 %	Bacteria; Chloroflexi; Anaerolineae; Anaerolinaeales; Anaerolinaceae; <i>Longilinea</i>	—
J-3	<i>Anaerolinea thermolimsa</i> , 95,8 %	Bacteria; Chloroflexi; Anaerolineae; Anaerolinaeales; Anaerolinaceae; <i>Anaerolinea</i>	—

Среди протеобактерий доминировали представители класса дельта-протеобактерии, остальные классы представлены в равных соотношениях. Идентифицированные протеобактерии являются преимущественно гетеротрофами, которые проводят деструкцию органического вещества в кислородных или микроаэрофильных условиях.

Детекция зелёных серных и несерных бактерий, являющихся облигатными фотолитотрофами, так же как и гетеротрофных верукомикробий, которые обладают анаэробным метаболизмом, говорит о формировании в бактериальных матах микрозон с резко различающимися физико-химическими характеристиками, по крайней мере, по отношению к кислороду.

Таким образом, в бактериальных матах минеральных источников Жойган определены в качестве доминирующих генотипы микроорганизмов, осуществляющих процессы окисленного и аноксигенного фотосинтеза, деструкции органического вещества как в аэробных, так и анаэробных условиях, а также имеющих хемолитотрофный метаболизм.

Работа выполнена при финансовой поддержке Интеграционных проектов СО РАН № 5 и № 94, гранта ФЦП 8116.

Список литературы

1. Биоразнообразие бактерий на различных глубинах южной котловины озера Байкал, выявленное по последовательностям 16S рРНК / Л. Я. Денисова [и др.] // Микробиология. – 1999. – Т. 68, № 4. – С. 475–483.
2. Борисенко И. М. Минеральные воды Бурятской АССР / И. М. Борисенко, Л. В. Замана. – Улан-Удэ : Бурят. кн. изд-во, 1978. – 162 с.
3. Заварзин Г. А. Бактерии и состав атмосферы / Г. А. Заварзин. – М. : Наука, 1984. – 199 с.

4. Заварзин Г. А. Микробный геохимический цикл кальция / Г. А. Заварзин // Микробиология. – 2002. – Т. 71. – С. 5–22.
5. Крайнов С. Р. Основы геохимии подземных вод / С. Р. Крайнов, В. Швец. – М. : Недра, 1980. – 285 с.
6. Особенности формирования травертинов из углекислых и азотных термальных вод в зоне Байкальского рифта / А. М. Плюснин [и др.] // Геология и геофизика. – 2000. – Т. 41, № 4. – С. 564–570.
7. Перельман А. И. Геохимия природных вод / А. И. Перельман. – М. : Наука, 1982. – 200 с.
8. Посохов Е. В. Общая гидрогеохимия / Е. В. Посохов. – Л. : Недра, 1975. – 208 с.
9. Роль микроорганизмов в гипергенном преобразовании полиметаллических руд и формировании биогеохимических аномалий благородных металлов на месторождениях Забайкалья / А. В. Татаринов [и др.] // Докл. Акад. наук. – 2007. – Т. 414, № 5. – С. 1–5.
10. Участие микроорганизмов в образовании травертинов и сапропелитового керогена в отложениях термальных углекислых вод Байкальской рифтовой зоны / А. В. Татаринов [и др.] // Докл. Акад. наук. – 2006. – Т. 411, № 4. – С. 514–518.
11. Distribution of crenarchaeota representatives in terrestrial hot springs of Russia and Iceland / A. A. Perevalova [et al] // Appl. Environ. Microbiol. – 2008. – Vol. 74, N 24. – P. 7620–7628.
12. Sambrook J. Molecular cloning. A laboratory manual / J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis. – Cold Spring Harbor : Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989. – Vol. 1–3.

Identification of Dominated Genotypes in the Microbial Communities of Carbonated Mineral Springs Zhoygan (East Sayan)

E. S. Kashkak¹, N. L. Bel'kova^{2,3}, E. V. Danilova⁴

¹*Buryat State University, Ulan-Ude*

²*Limnological Institute SB RAS, Irkutsk*

³*Irkutsk State University, Irkutsk*

⁴*Institute of General and Experimental Biology SB RAS, Ulan-Ude*

Abstract. A molecular analysis of natural cyanobacterial communities on travertine platforms of carbonated springs Zhoygan (East Sayan mountains) was carried out. The phylum of bacteria: Cyanobacteria, Verrucomicrobia, Proteobacteria, Chloroflexi and archaeans Euryarchaeota were identified. The analysis of clone library of has shown the prevalence of the bacterial domain. Cyanobacteria are dominant (35 %), and representatives of the class δ -Proteobacteria mainly determined among the Proteobacteria (17 %). Analysis of the functional characteristics of dominant genotypes microorganisms in bacterial mats showed that they carry out the processes of oxygenic and anoxic photosynthesis, destruction of organic matter, both aerobic and anaerobic conditions, and possess chemolithotrophic metabolism.

Keywords: mineral springs, microbial communities, genotypical variety, molecular genetic methods.

Кашкак Елена Сергеевна
аспирант
Бурятский государственный университет
672000, г. Улан-Удэ, ул. Смолина, 24а
тел.: (3012)43-49-02
e-mail: klslena@yandex.ru

Kashkak Elena Sergeevna
Postgraduate
Buryat State University
24a, Smolin st., Ulan-Ude, 672000
tel.: (3012)43-49-02
e-mail: klslena@yandex.ru

Белькова Наталья Леонидовна
кандидат биологических наук
старший научный сотрудник
Лимнологический институт СО РАН
664033, г. Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3
Иркутский государственный университет
664003, г. Иркутск, ул. К. Маркса
тел.: (3952)42-54-15
e-mail: belkovan@mail.ru, belkova@lin.irk.ru

Bel'kova Natalia Leonidovna
Candidate of Sciences (Biology)
Senior Research Scientist
Limnological Institute SB RAS
3, Ulan-Batorskaya st., Irkutsk, 664033
Irkutsk State University
1, K. Marx st., Irkutsk, 664003
tel.: (3952)42-54-15
e-mail: belkovan@mail.ru, belkova@lin.irk.ru

Данилова Эржена Викторовна
кандидат биологических наук
старший научный сотрудник
Институт общей и экспериментальной
биологии СО РАН
670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6
тел.: (3012)43-49-02
e-mail: erzhena_danilova@mail.ru

Danilova Erzhena Victorovna
Candidate of Sciences (Biology)
Senior Research Scientist
Institute of General and Experimental
Biology SB RAS
6, Sakhyanova st., Ulan-Ude, 670047
tel.: (3012)43-49-02
e-mail: erzhena_danilova@mail.ru