

УДК 579.26 (579.68)
DOI 10.18101/2587-7148-2020-2-21-29

**ОСОБЕННОСТИ СОСТАВА МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ
НИЗКОТЕМПЕРАТУРНЫХ МИНЕРАЛЬНЫХ ИСТОЧНИКОВ
ХОНГОР-УУЛА (ТУНКИНСКАЯ ДОЛИНА, РЕСПУБЛИКА БУРЯТИЯ)**

Е. С. Кашкак, Н. Л. Белькова, О. П. Дагурова, Е. Б. Матюгина, Э. В. Данилова

© Кашкак Елена Сергеевна

кандидат биологических наук, старший преподаватель,
ФГБОУ ВО «Тувинский государственный университет», Россия,
667000, г. Кызыл, ул. Ленина, д. 36,
E-mail: kslslena@yandex.ru

© Белькова Наталья Леонидовна

кандидат биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник,
лаборатория микробиома и микроэкологии,
ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», Россия,
664003, г. Иркутск, ул. Тимирязева, д. 16
E-mail: nlbelkova@gmail.com

© Дагурова Ольга Павловна

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник,
лаборатория микробиологии,
Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН, Россия,
670047, Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6
E-mail: dagur-ol@mail.ru

© Матюгина Евгения Борисовна

кандидат биологических наук, ученый секретарь
Институт природных ресурсов, экологии и криологии СО РАН
672002, г. Чита, ул. Недорезова, 16а
E-mail: evgenia48@mail.ru

© Данилова Эржена Викторовна

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник,
лаборатория микробиологии,
Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН, Россия,
670047, Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6
E-mail: erzhenan_danilova@mail.ru

В данной статье представлены результаты гидрохимических и микробиологических исследований воды, осадений и микробных матов минеральных источников Хонгор-Уула. Вода источников относится к холодным железистым сульфатно-карбонатным, натриево-кальциево-магниевым водам с невысокой минерализацией и слабощелочными значениями рН. В нативных образцах выявлена ферментативная протеолитическая активность, указывающая на деструкцию легкоокисляемого органического вещества микробными сообществами. Наибольшие значения внеклеточной пептидазной актив-

ностина изученных субстратах обнаружена в «желудочном» источнике. В микробных сообществах исследуемого источника Хонгор-Уула методами молекулярно-генетического анализа определено разнообразие доминирующих генотипов. Обнаружены представители различных филогенетических линий с доминированием филума *Proteobacteria*.

Ключевые слова: низкотемпературные источники, микробное сообщество, протеолитическая активность, *Proteobacteria*, Хонгор-Уула, Республика Бурятия

Для цитирования

Кашик Е. С., Белькова Н. Л., Дагурова О. П., Матюгина Е. Б., Данилова Э. В. Особенности состава микробных сообществ низкотемпературных минеральных источников Хонгор-Уула (Тункинская долина, Республика Бурятия) // Вестник Бурятского государственного университета. Биология, география. 2020. № 2. С. 21–29.

Холодные железистые источники Хонгор-Уула расположены в долине р. Харагун в предгорной части Гурби-Дабанского хребта, окаймляющего с юга Тункинскую котловину (Восточный Саян). В данной местности насчитывается 10 выходов минеральных вод. Выходы железистых вод выявлены на террасах по обоим берегам реки (рис. 1).



Рис. 1. Карта-схема расположения выходов источника Хонгор-Уула

Нижняя группа выходов воды находится на правобережной пойменной террасе в пределах расширения долины, восточной и западной границей которой являются крутые, местами отвесно падающие, скальные склоны хребта. С южной стороны по центру террасы, занимая примерно до 1/3 ее площади, углом надвинут отрог хребта. Вторая группа источников вытекает из-под края склона хребта на левом берегу реки в 1,5 км от подвесного моста (Геохимическая ..., 2011).

Целью работы было изучение физико-химических условий и состава микробного сообщества источников Хонгор-Уула.

Объекты и методы исследования

Объектами исследования являлись вода, донные отложения и микробные маты источников Хонгор-Уула. На месте отбора проб определяли температуру, pH и минерализацию воды портативными приборами. При исследовании физико-химического состава воды использовались потенциометрический, титриметрический и фотометрический методы анализа согласно нормативным документам. Всего было проанализировано 6 проб воды из шести разных источника (таблица 1).

Внеклеточную протеолитическую активность из полученных супернатантов определяли согласно методу Эрлангера (Erlanger et al., 1961). В работе использовали следующие паранитроанилидные субстраты, специфичные для эндопептидаз (рабочая концентрация 5 мМ): GlpAALpNA — субтилизин-подобных пептидаз; VzRpNA (ВАРА) — трипсин-подобных пептидаз; GlpFpNA — химотрипсин-подобных пептидаз; LpNA (L-лейцил-паранитроанилид) и FpNA (L-фенилаланил-паранитроанилид) — аминопептидаз.

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)). Целевые ампликоны лигировали в векторе из коммерческого набора GeneJET™ PCR CloningKit (Fermentas, Литва), все реакции проводили по протоколу фирмы-производителя. Полученной лигазной смесью трансформировали компетентные клетки *E. coli* (штамм XL-1) по стандартной методике (Sambrook et al., 1989). Анализ выросших колоний проводили методом ПЦР на плазмидных праймерах с использованием грубого лизата бактериальных клеток в качестве матрицы. Нуклеотидные последовательности определяли на автоматическом секвенаторе ABI 3130×1 (Genetic Analyzer, США). Сравнительный анализ нуклеотидных данных выполнен с использованием пакета программ FASTA (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/fasta/nucleotide.html>).

Результаты исследования и их обсуждение

Источники Хонгор-Уулы — холодные железистые сульфатно-карбонатные, натриево-кальциево-магниевые с невысокой минерализацией. Вода источников имеет слабощелочные значения рН. Температура воды не поднимается выше 5,0°C, суммарный дебит составляет 250 м³ в сутки (табл. 1). В водах источника Хонгор-Уулы обнаружено достаточно высокое содержание общего железа (11 мг/л).

Таблица 1

Физико-химические показатели воды минеральных источников Хонгор-Уулы

№	Обозначение пробы	Наименование источника	t, °C	рН	Минерализация, мг/л
1	ХУ1	Печеночный	4,6	7,6	219
2	ХУ2	Почечный	4,7	7,5	153
3	ХУ3	Нервный	4,6	7,8	180
4	ХУ4	Женский	4,7	7,7	181
5	ХУ5	Желудочный	3,9	7,4	90
6	ХУ6	Глазной	5,0	7,7	130

Внеклеточная протеолитическая активность в нативных образцах

Протеолитические бактерии являются инициаторами процесса разложения белоксодержащих веществ в микробных сообществах. В зависимости от экологических факторов активность протеолитических ферментов может проявляться в разной степени — активироваться, либо инактивироваться. В пробах микробных матов, ила и воды была изучена внеклеточная протеолитическая активность.

В результате анализа в исследуемых образцах была обнаружена различная внеклеточная активность фермента по всем субстратам (таблица 2). Максимальную активность наблюдали в нативном образце ХУ5 (источник «желудочный») по отношению к субстратам для аминопептидаз LpNa (0,742 ед.) и FpNA (0,681 ед.), а также для субтилизин-подобных пептидаз GlpAALpNA (0,530 ед.).

Таблица 2

Пептидазная активность в нативных образцах источника Хонгор-Уула

Обозначение пробы	Наименование источника	Субстраты				
		GlpAALpNA	BzRpNA (BAPA)	GlpFpNA	LpNa	FpNA
ХУ1	печеночный	0,094	0,062	0,049	0,198	0,206
ХУ2	почечный	0,040	0,039	0,001	0,173	0,081
ХУ3	нервный	0,056	0,028	0,009	0,091	0,036
ХУ4	женский	0,040	0,037	0,013	0,089	0,070
ХУ5	желудочный	0,530	0,111	0,006	0,742	0,681

Активность на трипсин подобном субстрате BzRpNA (BAPA) варьировала от 0,028 до 0,111 ед., при этом максимальная активность обнаружена в образце ХУ5. Химотрипсин-подобная активность (GlpFpNA) была достаточно низкая во всех исследуемых образцах и достигала 0,049 ед. в образце источника ХУ1. В нативных образцах ХУ2, ХУ3 и ХУ4 наблюдали низкие значения активности по всем субстратам.

Таким образом, в разных выходах низкотемпературного источника Хонгор-Уулы наблюдали протеолитическую активность, что указывает на деструкцию легко окисляемого органического вещества микробными сообществами. Отмечено, что наибольшая внеклеточная пептидазная активность по всем субстратам обнаружена в образце источника «желудочный» (ХУ5).

Идентификация доминирующих генотипов в микробных сообществах. В микробных сообществах воды, взвеси, осадка и микробного мата минерального источника Хонгор-Уулы было определено разнообразие доминирующих генотипов *in situ* методами молекулярно-генетического анализа.

В результате определения таксономического разнообразия прокариот в образцах воды, взвеси, микробного мата и ила из исследуемых источников Хонгор-Уулы были выявлены флотипы, принадлежащие домену *Bacteria*. В микробных сообществах обнаружены представители 5 филогенетических линий с доминированием *Proteobacteria* (таблица 3).

Таксономическое разнообразие прокариот в низкотемпературных источниках Хонгор-Уулы

Идентификация на основании рибосомной филогении	Легочный			Желудочный	Филогения
	вода	взвесь	осаждения	микробный мат	
Proteobacteria					
<i>Devosia</i> sp.			1		Alphaproteobacteria, Rhizobiales, Hyphomicrobiaceae
<i>Phyllobacterium</i> sp.			1		Alphaproteobacteria, Rhizobiales, Phyllobacteriaceae
<i>Mesorhizobium</i> sp.	1				Alphaproteobacteria, Rhizobiales, Phyllobacteriaceae
<i>Sphingobium</i> sp.	2				Alphaproteobacteria, Sphingomonadales, Sphingomonadaceae
<i>Sphingomonas</i> sp.		1			Alphaproteobacteria, Sphingomonadales, Sphingomonadaceae
<i>Novosphingobium</i> sp.			1		Alphaproteobacteria, Sphingomonadales, Sphingomonadaceae
<i>Sideroxydans</i> sp.			1		Betaproteobacteria, Gallionellales, Gallionellaceae
<i>Gallionella</i> sp.		7	1		Betaproteobacteria, Gallionellales, Gallionellaceae
<i>Leptothrix</i> sp.				1	Betaproteobacteria, Burkholderiales, Burkholderiales genera incertae sedis
<i>Acinetobacter</i> sp.	3				Gammaproteobacteria, Pseudomonadales, Moraxellaceae
<i>Pseudomonas</i> sp.	1	1			Gammaproteobacteria, Pseudomonadales, Pseudomonadaceae
<i>Geobacter</i> sp.				2	Deltaproteobacteria, Desulfuromonadales, Geobacteraceae
Bacteroidetes					
<i>Flavobacterium</i> sp.		1			Flavobacteriia, Flavobacteriales, Flavobacteriaceae

Actinobacteria					
<i>Propionibacterium</i> sp.	1				Actinobacteridae, Actinomycetales, Propionibacteriineae, Propionibacteriaceae
<i>Leifsonia</i> sp.	1				Actinobacteridae, Actinomycetales, Micrococcineae, Microbacteriaceae
Verrucomicrobia					
<i>Luteolibacter</i> sp.			1		Verrucomicrobiae, Verrucomicrobiales, Verrucomicrobiaceae
<i>Opitutus</i> sp.			1		Opitutae, Opitutales, Opitutaceae
Cyanobacteria					
<i>Symploca</i> sp.				7	Oscillatoriophyceidae, Oscillatoriales

Тип и лечебные качества воды источника «желудочный» определяются доминирующим содержанием железа (более 10 мг/л). В «желудочном» источнике были обнаружены нити микробных матов светло-коричневого цвета. В микробном мате данного источника были выявлены представители цианобактерии рода *Symploca*, анаэробных бактерий рода *Geobacter*, окисляющих органические вещества и железа, а также бактерии рода *Leptothrix*, доминирующих во многих железоокисляющих пресноводных сообществах (Emerson, Ghiorse, 1992, Schmidt et al., 2014). Бактерии рода *Geobacter* в последнее время становятся объектом пристального внимания со стороны ученых. Данные бактерии способны строить биологические структуры, отличающиеся электропроводностью, производить «микробную нанопроволоку» (Sun et al., 2014).

В «легочном» источнике в воде была обнаружена видимая взвесь, которую отфильтровали на крупнопористый, поликарбонатный фильтр с диаметром пор 5 мкм и проанализировали отдельно — фильтрат в качестве фракции свободноживущих бактериальных клеток, взвесь — как ассоциированные с минеральными частицами бактериальные клетки, а также осадения — сформированный минеральный осадок, так называемые современные минеральные осадения. В осадках и взвеси легочного источника идентифицированы микроорганизмы, участвующие в окислении железа — *Gallionella* sp., *Acinetobacter* sp., *Pseudomonas* sp., *Flavobacterim* sp.

В составе микробных сообществ низкотемпературных источников Хонгор-Уула отмечены особенности, связанные с экологической специализацией близких видов для реализации сходных метаболических путей в одном месте обитания. Наиболее ярко это отмечено для представителей альфапротеобактерий — разные представители порядка *Rhizobiales* детектировались в воде и современных минеральных осадениях. Они были представлены бактериями, относящимися к разным видам — *Devosia* sp.,

Е. С. Кашкак, Н. Л. Белькова, О. П. Дагурова, Е. Б. Матюгина, Э. В. Данилова Особенности состава микробных сообществ низкотемпературных минеральных источников...

Phyllobacterium sp., *Mesorhizobium* sp., представители которых примечательны своей способностью устанавливать симбиотические отношения с бобовыми растениями (Mantelin et al., 2006, Balachandar et al., 2007, Yoon et al., 2007, Degefu et al., 2013). Еще один пример — в воде, взвеси и осадках обнаружены разные виды семейства *Sphingomonadaceae*.

Также экологическая специализация отмечена на уровне разных мест обитания. В современных минеральных осадках источника «легочный» и бактериальных матах источника «желудочный» идентифицированы бактерии, биогеохимическая деятельность которых способствует формированию разного вида современных минеральных осадков. В источнике «желудочный» за счет деятельности *Gallionella* sp., *Leptothrix* sp., *Geobacter* sp. происходит трансформация растворимых соединений, получение взвешенного вещества и формирование минерального осадка.

Таким образом, результаты нашего исследования выявили разнообразие и широкое распространение представителей 5 филогенетических линий с доминированием *Proteobacteria*. Идентифицированные протеобактерии в исследуемых образцах являются преимущественно гетеротрофами, которые проводят деструкцию органического вещества в кислородных или микроаэрофильных условиях.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18–34–00552.

Литература

1. Геохимическая деятельность микроорганизмов гидротерм Байкальской рифтовой зоны / Б. Б. Намсараев, Д. Д. Бархутова, Э. В. Данилова и др. — Новосибирск: Академическое изд-во «Гео», 2011. — 302 с.
2. Balachandar D., Raja P., Kumar K., Sundaram SP. Non-rhizobial nodulation in legumes // *Biotechnology and Molecular Biology Review* 2007. Vol. 2 (2). P. 49–57: doi: 10.13140/2.1.1775.2960.
3. Degefu T., Wolde-meskel E., Liu B., Cleenwerck I., Willems A., Frostegård Å. *Mesorhizobium shonense* sp. nov., *Mesorhizobium hawassense* sp. nov. and *Mesorhizobium abyssinicae* sp. nov., isolated from root nodules of different agroforestry legume trees Free // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2013. V.63 (5). P. 1746–1753: <https://doi.org/10.1099/ijs.0.044032-0>.
4. Emerson D., Ghiorse W.C. Isolation, cultural maintenance and taxonomy of a sheath-forming strain of *Leptothrixdiscophora* and characterization of manganese-oxidizing activity associated with the sheath // *Appl. Environ. Microbiol.* 1992. V. 58. P. 4001–4010.
5. Erlanger B.F., Kokowsky N., Cohen W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin // *Arch. Biochem. Biophys.* 1961. V. 95. (2). P. 271–278.
6. Mantelin S., Saux M.F., Zakhia F., Cleyet-Marel J. Emended description of the genus *Phyllobacterium* and description of four novel species associated with plant roots: *Phyllobacterium bourgogense* sp. nov., *Phyllobacterium ifriqiyense* sp. nov., *Phyllobacterium leguminum*

sp. nov., and *Phyllobacterium brassicacearum* sp. nov. // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2006. Vol. 56. P. 827–839: doi: 10.1099/ijs.0.63911–0.

7. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual* // Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. Vol. 1, 2, 3.

8. Schmidt B., Sánchez L. A., Fretschner T., Kreps G., Ferrero M. A., Siñeriz F., Szewzyk U. Isolation of *Sphaerotilus–Leptothrix* strains from iron bacteria communities in Tierra del Fuego wetlands // FEMS Microbiology Ecology. 2014. Vol. 90(2). P. 454–466. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12406>

9. Sun D., Wang A., Cheng S., Yetes M. D., Logan B. E. *Geobacteranodireducens* sp. nov., an exoelectrogenic microbe in bioelectrochemical systems // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2014. Vol. 64 (Pt. 10). P. 3485–3491. doi: 10.1099/ijs.0.061598–0.

10. Yoon J.-H., Kang S.-J., Park S., Oh T.-K. *Devosiainsulae* sp. nov., isolated from soil, and emended description of the genus *Devosia* // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2007. Vol. 57 (Pt 6). P. 1310–1314: doi: 10.1099/ijs.0.65028–0.

FEATURES OF THE COMPOSITION OF MICROBIAL COMMUNITIES
OF LOW-TEMPERATURE MINERAL SPRINGS KHONGOR-UULA
(TUNKA VALLEY, REPUBLIC OF BURYATIA)

E. S. Kashkak, N. L. Belkova, O. P. Dagurova, E. B. Matugina, E. V. Danilova

Kashkak Elena S.

Cand. Sci. (Bio),
Tuvan State University
36, Lenina str., Kyzyl, 667000 Russia
E-mail: kslslena@yandex.ru

Belkova Natalia L.

Cand. Sci. (Bio),
Leader Research Scientist, Laboratory of Microbiome and Microevolution
Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems
16, Timiryazeva str., Irkutsk, 664003, Russia
E-mail: nlbelkova@gmail.com

Dagurova Olga P.

Cand. Sci. (Bio),
Senior researcher, Laboratory of Microbiology,
Institute of General and Experimental Biology SB RAS
6, Sakhyanovoy str., Ulan-Ude, Russia, 670047
E-mail: dagur-ol@mail.ru

Matugina Evgenia B.

Cand. Sci. (Bio),
Institute of Natural Resources, Ecology and Cryology SB RAS
16a, Nedorezova str., Chita, Russia, 672002,
E-mail: evgenia48@mail.ru

Е. С. Кашкак, Н. Л. Белькова, О. П. Дагурова, Е. Б. Матюгина, Э. В. Данилова Особенности состава микробных сообществ низкотемпературных минеральных источников...

Danilova Erzhena V.

Cand. Sci. (Bio),

Senior researcher, Laboratory of Microbiology,
Institute of General and Experimental Biology SB RAS
6, Sakhyanovoy str., Ulan-Ude, Russia, 670047
E-mail: erzhen_a_danilova@mail.ru

This article presents the results of hydrochemical and microbiological studies of water, sedimentations and microbial mats of Khongor-Uula mineral springs. The waters of the springs belongs to cold ferrous sulfate-carbonate, sodium-calcium-magnesium type of waters. It characterized by low salinity and slightly alkaline pH values. In native samples enzymatic proteolytic activity was detected. It indicate the destruction of labile organic matter by microbial communities. The high values of extracellular peptidase activity in the “gastric” spring weremeasured. The diversity of dominant genotypes was determined using molecular methods in microbial communities of samples from the Khongor-Uula. In the microbial community, the representatives of various phylogenetic lines were found, the representatives of Proteobacteriadominate.

Keywords: low-temperature springs, microbial community, proteolytic activity, Proteobacteria, Hongor-Uula, Buryatia

The reported study was funded by RFBR according to the research project № 18–34–00552.