

БИОЛОГИЯ

Микробиология, ботаника, зоология

Научная статья

УДК 579.26

DOI 10.18101/2587-7148-2021-1-3-11

ТАКСОНОМИЧЕСКИЙ СОСТАВ МИКРОБНОГО СООБЩЕСТВА ГОРЯЧЕГО ИСТОЧНИКА АЛЛА (БАЙКАЛЬСКАЯ РИФТОВАЯ ЗОНА)

В. Г. Будагаева, А. А. Раднагуева, А. В. Малыгин, Д. Д. Бархутова

© **Будагаева Валентина Григорьевна**

ассистент,

Бурятская государственная сельскохозяйственная академия им. В. Р. Филиппова

Россия, 670034, Улан-Удэ, ул. Пушкина, 8

valmpa@mail.ru

© **Раднагуева Арюна Арсалановна**

кандидат биологических наук, младший научный сотрудник,

Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН,

Россия, 670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6

aryuna_rg@mail.ru

© **Малыгин Александр Валерьевич**

аспирант, Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН,

Россия, 670047, Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6

malygin_1986@bk.ru

© **Бархутова Дарима Дондоковна**

кандидат биологических наук,

заведующая лабораторией микробиологии,

Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН,

Россия, 670047, Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6

darima_bar@mail.ru

Аннотация. Методом секвенирования гена 16S рРНК изучено разнообразие микробного сообщества в различных биотопах горячего источника Алла. В сообществах воды, микробных матов и осадка выявлены филотипы, принадлежащие к 17 филумам домена Bacteria и 1 — домена Archaea. Видовое богатство и разнообразие микробного сообщества было выше в микробных матах и донных осадках, чем в воде. Особенностью таксономического состава донных осадков является присутствие архей типа *Crenarchaeota*. Показано влияние температуры на таксономический состав микробного сообщества. При температуре 58–64 °С преобладали филогенетически разнообразные группы *Atribacteria*, *Nitrospirae*, *Chloroflexi*. При понижении температуры в микробном сообществе доминировали

Proteobacteria. При температуре 34 °С термофильные бактерии филумов *Atribacteria*, *Nitrospirae*, *Deinococcus-Thermus* в микробном мате не выявлены.

Ключевые слова: таксономическое разнообразие; нуклеотидные последовательности; микробные маты; горячий источник; Байкальская рифтовая зона.

Для цитирования

Таксономический состав микробного сообщества горячего источника Алла (Байкальская рифтовая зона) / В.Г. Будагаева, А.А. Раднагуруева, А.В. Малыгин, Д.Д. Бархутова // Вестник Бурятского государственного университета. Биология. География. 2021. № 1. С. 3–11. DOI 10.18101/2587-7148-2021-1-3-11

Щелочные гидротермы представляют собой уникальные местообитания, характеризующиеся высокой температурой и высокими значениями pH, которые создают благоприятные условия для развития термофильных и алкалофильных бактерий. Изучение распространения бактерий, а также выделение новых видов позволяет глубже понять экологию распространения бактерий, физиологию и биотехнологический потенциал бактерий. Метагеномный анализ показал, что в щелочных термальных источниках с температурой 75 °С и выше, как правило, присутствуют термофильные или гипертермофильные бактерии филумов *Aquificae*, *Deinococcus-Thermus*, *Thermodesulfobacteria*, *Thermotogae* и некоторые термофильные виды филумов *Proteobacteria* и *Firmicutes*. При температуре ниже 75 °С развиваются умеренно термофильные и мезофильные бактерии *Cyanobacteria*, *Chloroflexi* и *Proteobacteria*. Помимо бактерий в геотермальных системах также часто обнаруживаются археи филумов *Crenarchaeota*, *Euryarchaeota* и *Thaumarchaeota* [1–6]. Видовое разнообразие и активность микробного сообщества во многом определяются температурой.

Целью работы была оценка состава и структуры микробного сообщества гидротермы Алла в разных биологических зонах.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами нашего исследования служили микробные сообщества воды, микробных матов, донных осадков гидротермы Алла. Гидротерма Алла изливается в русле одноименной реки, имеет свыше 46 выходов горячей сульфатно-гидрокарбонатно-натриевой сероводородной воды, температура которых в некоторых выходах достигает 75 °С. В зависимости от физико-химических факторов (температура, pH, освещенность, наличие окислителей и восстановителей, содержание газов) происходит дифференциация микробных сообществ в теплых ручьях по изливу и формируются разные биологические зоны.

Образцы отбирали в стерильную посуду. Пробы для молекулярно-генетического анализа пробы фиксировали 70%-ным спиртом.

В местах отбора проб измеряли температуру, pH, окислительно-восстановительный потенциал (Eh), общее количество растворенных веществ (TDS). Температуру измеряли сенсорным электротермометром Prima (Португалия), pH и Eh определяли при помощи портативного pH/ORP-метра (HANNA, Румыния). Выделение ДНК из образцов проводили по методике, описанной К. Wilson [7] с модификациями. Тотальную ДНК выделяли с помощью коммерческих на-

В. Г. Будагаева, А. А. Раднагуруева, А. В. Малыгин, Д. Д. Бархутова. Таксономический состав микробного сообщества горячего источника Алла (Байкальская рифтовая зона)

боров «ДНК-сорб» (АмплиСенс, Россия) и «Bacterial Genomic DNA kit» (Ахуген, США). Метагеномный анализ V3-V4 переменных районов 16S рРНК проведен на секвенаторе «MiSeq» (Illumina, США) в центре коллективного пользования «Геномика» (г. Новосибирск). Полученные последовательности сравнивали с последовательностями базы данных «GenBank» с помощью программы «BLAST»¹. Редактирование и выравнивание последовательностей проводили с помощью программы «BioEdit».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Температура и рН воды при выходе на поверхность в разных биологических зонах варьировала в пределах от 34,4 до 64,4 °С и рН 9,26–9,7 (табл. 1). Значения окислительно-восстановительного потенциала (Eh) изменялись от –250 до –297 мВ. Минерализация (TDS) воды не превышала 270 мг/дм³. Характерной особенностью является присутствие сероводорода, концентрация которого варьировала от 1,25 до 12,75 мг/дм³.

Таблица 1

Физико-химические параметры воды гидротермы Алла

Источник	Станция	Т °С	рН	Eh, мВ	TDS мг/дм ³
Алла	А1-1	64,4	9,7	–297	270
	А1-3	58,1	9,6	–267	238
	А1-5	34,4	9,26	–250	184

С использованием высокопроизводительного параллельного секвенирования (NGS) гена 16S рРНК было получено 3486, 14446 и 14223 нуклеотидных последовательностей в воде, микробном мате и иловых отложениях гидротермы Алла соответственно. Всего выявлено 17 филумов домена Bacteria и 1 — домена Archaea.

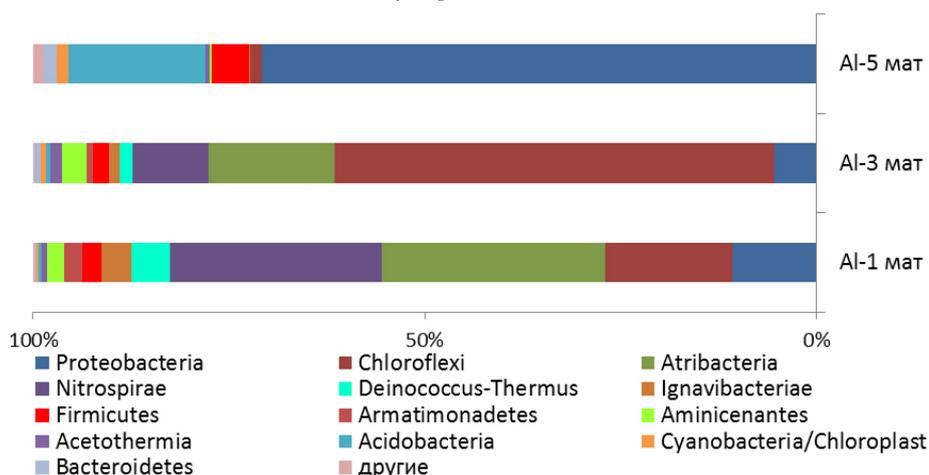


Рис. 1. Таксономическое разнообразие сообщества микробных матов гидротермы Алла (станция 1, станция 3, станция 5)

¹ URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>

Был проведен сравнительный анализ разнообразия микробного сообщества матов трех станций гидротермы Алла, отличающихся физико-химическими характеристиками местообитания и по внешнему виду (окраска, толщина).

Микробное сообщество мата на станции 1 при температуре 64,4 °С и содержанием сероводорода в воде 13,35 мг/л состояло на 99,9% из эубактерий (всего 11 549 последовательностей) (рис. 1).

Наибольшую долю от всех обнаруженных последовательностей составили представители филума *Atribacteria* (28,4%), *Nitrospirae* (27%), фотосинтезирующие *Chloroflexi* (16,3%) и представители *Proteobacteria* (10,7%). Следующими по представленности в сообществе были термофильные *Deinococcus-Thermus* (4,9%), *Ignavibacteriae* (3,8%), *Firmicutes* (2,5%), *Armatimonadetes* (2,3%), *Aminicenantes* (2,2%). Содержание бактерий филумов *Acetothermia*, *Acidobacteria* и *Cyanobacteria* не превышало 0,7% от всех обнаруженных последовательностей.

На станции AI-3 (рис. 1) в сообществе микробного мата, развивающегося при температуре 58,1 °С и концентрации сероводорода в воде 5,5 мг/л, более половины сообщества составляли представители *Chloroflexi* (56% всех обнаруженных последовательностей). Бактерии этого филума были представлены в основном фототрофными бактериями рода *Roseiflexus* (97%), а бактерии рода *Chloroflexus* не превышали 1,3%. В сообществе мата выявлено 16,1% последовательностей типа *Atribacteria*. Бактерии филума *Nitrospirae* (9,7%) представлены только одним родом *Thermodesulfobivrio*. Далее по распространенности были бактерии филумов *Proteobacteria* — 5,6%, *Aminicenantes* (3,2%), *Firmicutes* (2,1%), *Deinococcus-Thermus* (1,6%) и *Acetothermia* (1,5%).

На станции 5 (AI-5) (рис. 1), где происходит смешение термальной воды с речными водами, отмечена более низкая температура, pH и концентрация сульфидных ионов (34,4 °С, pH 9,26, S²⁻ 2,25 мг/дм³). Таксономический анализ показал, что более 2/3 сообщества составляли представители филума *Proteobacteria* (70,8%). Следующими по распространенности были представители филумов *Acidobacteria* (17,5%) и *Firmicutes* (4,8%). *Bacteroidetes* и *Cyanobacteria* были малочисленны и составили 1,7 и 1,4% соответственно. В качестве минорных компонентов выступали *Acetothermia* (0,7%), *Aminicenantes* (0,3%), *Ignavibacteriae* (0,2%), *Verrucomicrobia*. Представители домена *Archaea* не выявлены.

Таблица 2

Видовое богатство и индекс разнообразия в микробных матах

Источник	Образец, станция	Дистанция	Количество последовательностей	Количество OTU	Индекс Шеннона (H)
Алла	AI-1 мат	0.03	11549	396	3,2
	AI-3 мат	0.03	7510	356	3,9
	AI-5 мат	0.03	652	85	3,4

Видовое богатство и разнообразие было наименьшим в микробном мате из высокотемпературной зоны (станции А1-1 при температуре 64 °С) и увеличивалось по мере уменьшения температуры (табл. 2).

На станции 3 (А1-3), где развивался микробный мат, была изучена структура микробного сообщества в различных биотопах (вода, микробный мат, донный осадок) (рис. 2).

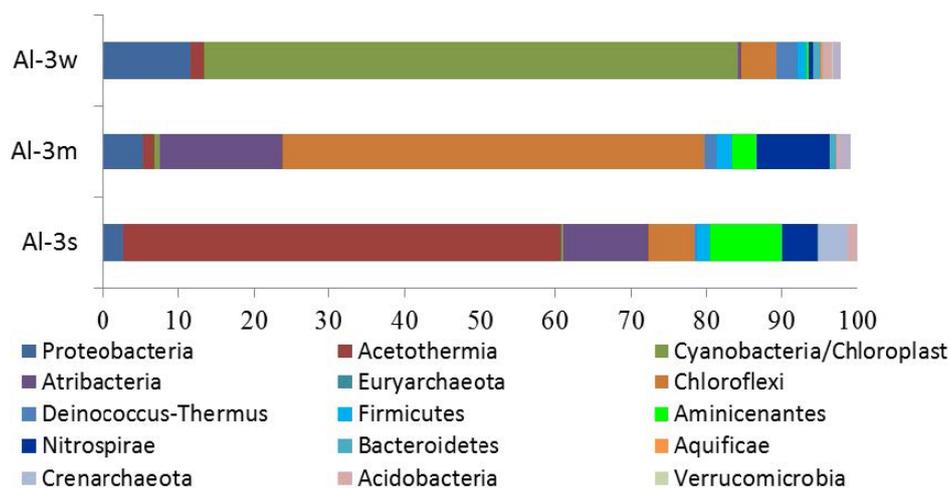


Рис. 2. Таксономическое разнообразие микробного сообщества гидротермы Алла (станции 3) в различных биотопах (А1-3w — вода; А1-3m — микробный мат; А1-3s — донный осадок)

Сообщество водного слоя над микробным матом состояло на 99,9% из эубактерий. В микробном сообществе воды (рис. 2, А1-3w) доминировали фототрофные микроорганизмы *Cyanobacteria*, которые составили 70,8% всех обнаруженных последовательностей. Далее по распространенности были последовательности типа *Proteobacteria* — 11,6%, *Chloroflexi* — 4,6%, *Deinococcus-Thermus* — 2,85%, *Acetothermia* — 1,8%, *Firmicutes* — 1,7%, *Actinobacteria* — 1,6%. Архей выявлено не более 0,1% от всего сообщества.

В осадках под микробным матом 2/3 (рис. 2, А1-3s) сообщества составили некультивируемые представители *Acetothermia* (57,9%). Термофильные хемолитоавтотрофные микроорганизмы этого филума являются одной из наиболее ранних эволюционных ветвей домена *Bacteria* [8]. Следующие по распространенности были представители филумов *Atribacteria* (11,2%), *Aminicenantes* (9,5%), *Chloroflexi* (6,3%), *Nitrospirae* (4,6%). Представители домена *Archaea* (тип *Crenarchaeota*) составили в осадках 4% от полученных последовательностей.

Видовое разнообразие сообщества микробного мата и донных осадков на станции 3 источника Алла было больше, чем в сообществе воды (табл. 3).

Таблица 3

Видовое богатство и индекс разнообразия в источнике Алла

Источник	Образец	Дистанция	Количество последов	Количество OTU	Индекс Шеннона (H)
Алла	А1-3 вода	0.03	2685	267	3,6
	А1-3 мат	0.03	7510	256	3,9
	А1-3 ил	0.03	8159	304	3,9

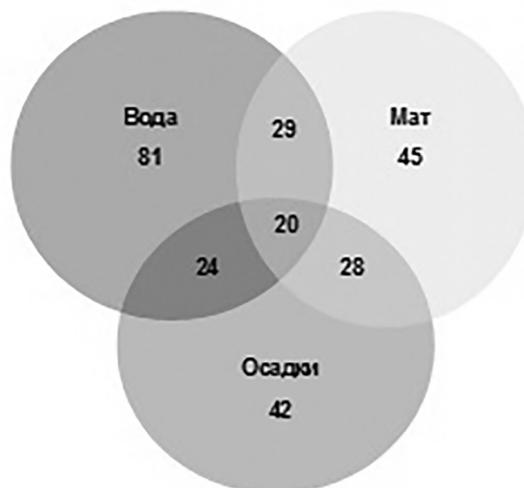


Рис. 3. Диаграмма Венна по данным разнообразия микробных сообществ (вода, мат, осадки) гидротермы Алла на уровне родов

Сравнительный анализ показал, что более половины сообщества осадка и мата составляли общие роды (рис. 3). Следует отметить, что это были бактерии, доминирующие в составе сообществ: роды *Roseiflexus*, *Atribacteria*, *Thermodesulfovibrio*, *Aminicenantes*, *Meiothermus*, *Acetothermia*, *Ignavibacterium* и др.

На станции 3 в верхних освещенных слоях воды гидротермы доминируют фотосинтезирующие микроорганизмы — представители филы *Cyanobacteria*, ответственные за оксигенный фотосинтез. В сообществе микробного мата преобладали *Chloroflexi* (род *Roseiflexus*). Метаболическая гибкость различных представителей филы *Chloroflexi* определяет ее матообразующим компонентом во многих исследованных горячих источниках и способствует ее конкурентноспособности за питательные вещества и физическое пространство [3]. В осадках, куда не проникает свет и температура свыше 64 °С, доминировали представители *Acetothermia*. Термофильные бактерии *Acetothermia* обладают универсальным метаболизмом для выживания в олиготрофных горячих источниках. Отличительной особенностью таксономического состава иловых отложений под микробным матом является достаточно количество архей типа *Crenarchaeota*, которые составляли 4% всех нуклеотидных последовательностей.

Сходство в таксономическом разнообразии заключалось в том, что во всех пробах от поверхности воды до иловых отложений выявлены в достаточном количестве бактерии филума *Proteobacteria*, для которых характерно большое разнообразие и высокая скорость аэробных и анаэробных метаболических путей. Их активность способствует деструкции и быстрому повторному использованию органических веществ. *Firmicutes* и *Acidobacteria* обнаружены во всех пробах.

Представители *Deinococcus-Thermus*, которые осуществляют аэробную деструкцию органического вещества, были характерны для сообщества воды (2,8%) и мата (1,6%), а *Nitrospirae* характерны для микробного мата (9,75%) и осадков (4,6%). Следует отметить присутствие анаэробных фотолитотрофов *Ignavibacteriae* в микробных матах (1,3%) и в воде (0,9%). Они используют восстановленные соединения серы и молекулярный водород в качестве доноров электронов.

ВЫВОДЫ

1. Видовое богатство и разнообразие микробного сообщества горячего источника Алла было выше в микробных матах и донных осадках, чем в воде. С понижением температуры в гидротермах разнообразие бактерий увеличивалось.
2. Микробные сообщества, развивающиеся при более высокой температуре (58–64 °С), были близки по качественному и количественному таксономическому составу. В сообществе преобладали филогенетически разнообразные группы *Atribacteria*, *Nitrospirae*, *Chloroflexi*.
3. При понижении температуры в микробном сообществе доминировали *Proteobacteria*. В низкотемпературном мате (34 °С) не выявлены термофильные представители таких филумов, как *Atribacteria*, *Nitrospirae*, *Deinococcus-Thermus*, характерные для сообщества высокотемпературных матов.
4. Отличительной особенностью таксономического состава иловых отложений является достаточно количество архей типа *Crenarchaeota*.

Благодарности

Исследования выполнены в рамках темы «Микробные сообщества экстремальных природных экосистем Байкальского региона: структурно-функциональная организация и биотехнологический потенциал» и проекта РФФИ 18-44-030028.

Литература

1. Badhai J., Ghosh T. S., Das K. S. Taxonomic and functional characteristics of microbial communities and their correlation with physicochemical properties of four geothermal springs in Odisha, India // *Frontiers in Microbiology*. 2015. V. 6. № 1166.
2. Differences in temperature and water chemistry shape distinct diversity patterns in thermophilic microbial communities / C. M. Chiriac [et al.] // *Appl Environ Microbiol*. 2017. V.83 (21). <https://doi.org/10.1128/AEM.01363-17>.
3. Filamentous anoxygenic phototrophic bacteria from cyanobacterial mats of Alla hot springs (Barguzin Valley, Russia) / V. A. Gaisin [et al.] // *Extremophiles*. 2015. V.19. P. 1067–1076. DOI 10.1007/s00792-015-0777-7
4. Genomic and metagenomic insights into the microbial community of a thermal spring / R. Pedron [et al.] // *Microbiome*. 2019. p. 7:8. <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0625-6>

5. Comparative Analysis of Microbial Diversity Across Temperature Gradients in Hot Springs From Yellowstone and Iceland / P. T. Podar [et al.] // *Front. Microbiol.*, 2020. 14 July. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01625>
6. Ward D. M. Microbial diversity in natural environments: focusing on fundamental questions// *Antonie van Leeuwenhoek*. 2006. V. 90. P. 309–324. DOI 10.1007/s10482-006-9090-x
7. Wilson K. Preparation of Geomic DNA from Bacteria // *Current Protocols in Molecular Biology*. 2001. Chapter 2: Unit 2.4. DOI: 10.1002/0471142727.mb0204s56.
8. Distribution of *Acetothermia*-dominated microbial communities in alkaline hot springs of Baikal Rift Zone / S. V. Zaitseva [et al.] // *PeerJ Preprints*. 2017. <https://doi.org/10.7287/peerj.preprints.3492v1> | CC BY4.0 Open Access | rec: 27 Dec 2017, publ: 28

TAXONOMIC COMPOSITION OF THE MICROBIAL COMMUNITY OF
ALLA HOT SPRING (BAIKAL RIFT ZONE)

V. G. Budagaeva, A. A. Radnagurueva, A. V. Malygin, D. D. Barkhutova

Valentina G. Budagaeva

Assistant,
Filippov Buryat State Agricultural Academy
8 Pushkina St., Ulan-Ude 670034, Russia
valmpa@mail.ru

Aryuna A. Radnagurueva

Cand. Sci. (Biol.), Junior Researcher,
Institute of General and Experimental Biology SB RAS
6 Sakhyanovoy St., Ulan-Ude 670047, Russia
aryuna_rg@mail.ru

Aleksandr V. Malygin

Research Assistant,
Institute of General and Experimental Biology SB RAS
6 Sakhyanovoy St., Ulan-Ude 670047, Russia
malygin_1986@bk.ru

Darima D. Barkhutova

Cand. Sci. (Biol.), Head of Microbiology Laboratory
Institute of General and Experimental Biology SB RAS
6 Sakhyanovoy St., Ulan-Ude 670047, Russia
darima_bar@mail.ru

Abstract. Using the 16S rRNA gene sequencing method we studied the diversity of the microbial community in different biotopes of Alla hot spring. In the communities of water, microbial material, and sediment, we revealed phylotypes belonging to 17 phyla of the Bacteria domain and one type of the Archaea domain. The species richness and diversity of the microbial community was higher in microbial material and bottom sediments than in water. A specific

В. Г. Будагаева, А. А. Раднагуруева, А. В. Малыгин, Д. Д. Бархутова. Таксономический состав микробного сообщества горячего источника Алла (Байкальская рифтовая зона)

feature of the taxonomic composition of bottom sediments is the presence of Crenarchaeota type archaea. The research revealed the influence of temperature on the taxonomic composition of the microbial community.

Keywords: taxonomic diversity; nucleotide sequences; microbial material; hot spring; Baikal rift zone.

Статья поступила в редакцию 13.11.20; одобрена после рецензирования 23.12.20; принята к публикации 25.01.2021.