

Научная статья
УДК 579.26
DOI: 10.18101/2542-0623-2022-4-50-58

**СТРУКТУРА И РАЗНООБРАЗИЕ МИКРОБНОЙ СОЛЕВОЙ КОРКИ
В СУЛЬФАТНОМ ОЗЕРЕ ГУДЖИРГАНСКОЕ
БАРГУЗИНСКОЙ КОТЛОВИНЫ (БУРЯТИЯ)**

**Е. В. Лаврентьева, Л. Б. Буянтуева, Е. Э. Валова,
Т. Г. Банзаракцаева, В. Б. Дамбаев, В. Л. Иванов**

© **Лаврентьева Елена Владимировна**
кандидат биологических наук,
Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН
Россия, 670011, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6
lena_1@mail.ru
Бурятский государственный университет имени Доржи Банзарова
Россия, 670000, г. Улан-Удэ, ул. Смолина, 24а

© **Буянтуева Любовь Батомункуевна**
кандидат биологических наук,
Бурятский государственный университет имени Доржи Банзарова
Россия, 670000, г. Улан-Удэ, ул. Смолина, 24а
blb62@mail.ru

© **Валова Елена Эрдэмовна**
кандидат биологических наук,
Бурятский государственный университет имени Доржи Банзарова
Россия, 670000, г. Улан-Удэ, ул. Смолина, 24а
elena-valova@yandex.ru

© **Банзаракцаева Туяна Геннадьевна**
кандидат биологических наук,
Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН
Россия, 670011, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6

© **Дамбаев Вячеслав Борисович**
кандидат биологических наук,
Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН
Россия, 670011, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6
slavadmb@rambler.ru

© **Иванов Владимир Львович**
аспирант,
Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН
Россия, 670011, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6

Аннотация. Озеро Гуджирганское — это уникальный природный комплекс экстремальных экологических условий, где резкие сезонные и суточные перепады температуры,

нестабильный водный режим, значительные колебания солености и температуры воды, выпадение солей на поверхности озера, в свою очередь, определяют структуру микробного сообщества в озере.

С использованием технологий высокопроизводительного секвенирования изучено разнообразие прокариот в солевых корках. Основу микробного сообщества составили представители γ -Proteobacteria; α -Proteobacteria, Firmicutes и Bacteroidetes. На родовом уровне представлены галофильные и умеренно галофильные алкалофильные бактерии, а также обнаружены последовательности генов 16S рРНК, которые не могут быть классифицированы на уровне родов, что указывает на потенциально новых представителей Bacteria, присутствующих в этой экстремальной экосистеме.

Ключевые слова: сульфатное озеро, микробное сообщество, солевые корки, разнообразие, высокопроизводительное секвенирование, ген 16S рРНК.

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта ФГБОУ ВО БГУ № 22-03-0502 и бюджетной темы ФГБУН ИОЭБ СО РАН № 121030100229-1

Для цитирования

Структура и разнообразие микробной солевой корки в сульфатном озере Гуджирганское Баргузинской котловины (Бурятия) / Е. В. Лаврентьева, Л. Б. Буянтуева, Е. Э. Валова [и др.] // Природа Внутренней Азии. Nature of Inner Asia. 2022. № 4(22). С. 50–58.
DOI: 10.18101/2542-0623-2022-4-50-58

Введение

Микробные сообщества обладают удивительной способностью выживать в экстремальных условиях. Соленые озера являются одним из таких примеров и представляют собой одни из самых обширных биомов нашей планеты. В настоящее время в соленых озерах существует значительный интерес к микробным сообществам, колонизирующим солевую корку на поверхности эвапоритовых отложений [Wierzchos et al., 2006]). Известно, что среды, которые когда-то считались безжизненными, теперь содержат организмы, приспособленные к различным физическим и химическим воздействиям [Ротшильд и Манчинелли, 2001].

Соленое озеро Гуджирганское, расположенное в Баргузинской котловине, относится к группе Алгинских озер. Эти озера образуются в результате разгрузки термальных трещинно-жильных вод, относящихся к сульфатному натриевому химическому типу [Плюснин и др., 2019]. Сульфатное озеро Гуджирганское характеризуется нестабильным водным режимом, полным промерзанием в зимний период и значительными колебаниями солености и температуры воды. В течение сухого сезона большая часть озера покрыта солевыми корками и при понижении температуры наблюдается осаждение мирабилита.

Цель данного исследования — установить структуру микробного сообщества в солевой корке озера Гуджирганское.

Объекты и методы исследования

Исследуемое соленое озеро Гуджирганское (54°01'890" с. ш. 110°16'537" в. д., высота 493 м. над уровнем моря) входит в группу Алгинских озер, мелководное и имеет относительно малые площади — 0,3 км².

На момент отбора проб (август 2019 г.) площадь озера Гуджирганское была покрыта сухой солевой коркой толщиной от 0,5 до 5 см. На ее поверхности наблюдалось выпадение кристаллов тенардита (Na_2SO_4). В небольших углублениях была обнаружена вода.

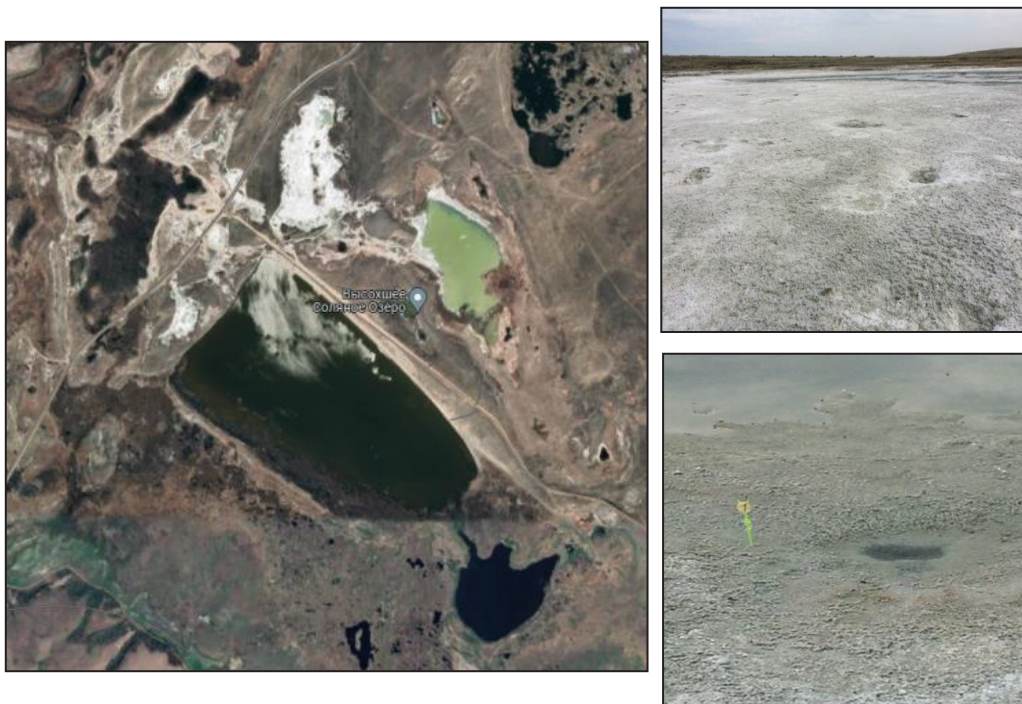


Рис. 1. Район расположения группы Алгинских озер и места отбора образцов в озере Гуджирганское

Для исследований были отобраны образцы солевых корок на станциях (Gudzh-1 и Gudzh-2). На станции Gudzh-1 была отобрана плотная сухая корка белого цвета с толщиной до 1 см, на станции Gudzh-2 образец был представлен сухим зеленым микробным матом с толщиной не более 0,5 см.

В воде на месте отбора проб были измерены pH и температура с помощью портативного pH метра pH-200 HM Digital (Южная Корея) с сенсорным термометром. Минерализацию определяли при помощи тест-кондуктометра TDS-4 (Сингапур). Для химического анализа воду отбирали в стерильную пластиковую бутылку. Макрокомпонентный состав воды определяли с помощью гидрохимических методов в ЦКП ГИН СО РАН (г. Улан-Удэ).

Для молекулярно-генетического анализа пробы осадков и микробных образований отбирали в стерильные пластиковые 15 мл пробирки типа Falcon и фиксировали этанолом до конечной концентрации 50% (об./об.). Пробу воды фильтровали через стерильный мембранный фильтр с порами размером 0,22 мкм. Фильтр затем помещали в стерильную пластиковую микропробирку и фиксировали этанолом. Пробы до выделения ДНК находились в холодильнике при + 4° С.

Выделение ДНК из соляных корок проводили с помощью набора DNeasy-PowerSoil Kit (Qiagen, США) по протоколу производителя. Качественную и количественную оценку полученных препаратов ДНК проводили с помощью спектрофотометра Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, США). Регион V3-V4 гена 16S рРНК был амплифицирован с помощью праймеров 343F (5'-CTCCTACG-GRRSGCAGCAG-3') и 806R (5'-GGACTACNVGGGTWTCTAAT-3'), содержащих адаптерные последовательности (Illumina), линкер и баркод (Fadroshetal., 2014). Амплификацию проводили в условиях описанных ранее (Brouchkovetal., 2017). Ампликоны смешивали по 200 нг каждый и чистили в 1% агарозном геле с помощью набора MinEluteGelExtraction Kit (Qiagen). Секвенирование проводили в ЦКП "Биоспарк" (г. Москва) на секвенаторе MiSeq (Illumina), используя набор Reagent Kit v3 (2x300, Illumina).

Полученные парные последовательности анализировались с помощью UPARSE скриптов при использовании Usearch v11.0 [Edgar, 2013]. Биоинформатическая обработка включала перекрывание парных ридов, фильтрацию по качеству и длине, учет одинаковых последовательностей, отбрасывание синглетонов, удаление химер и получение ОТЕ (Операционные Таксономические Единицы) с помощью алгоритма кластеризации UPARSE. Таксономическая принадлежность последовательностей OTU определялась с помощью SINTAX [Edgar, 2016] и референсной базы 16SRDPtrainingsetv16 [Wangetal., 2007]. Альфа разнообразие анализировали Usearch.

Референсные и ОТЕ последовательности выравнивались с помощью Clustal W. Филогенетический анализ проводили с использованием метода максимального правдоподобия (maximum likelihood phylogeny) в MEGA 6 [Tamura et al., 2013] (бутстреп 1000 альтернативных деревьев, модель Tamura-Nei).

Результаты и обсуждение

Вода озера Гуджирганское в летний период (август 2019 г.) характеризовалась высокими значениями pH 9,2–9,3, значения минерализации воды в период исследований составили от 132 до 136 г/дм³. В период отбора проб значения температуры воды в озере составили + 19,2 – +23,1 °С. Исследуемое озеро характеризуется восстановленными условиями, окислительно-восстановительный потенциал был в пределах -0,76 мВ. Исследование ионно-солевого состава воды озера показало преобладание ионов натрия — 42 578,5–43 856,9 мг/дм³, что свойственно высокоминерализованным водам. В условиях сухого климата натрия — характерный элемент испарительной концентрации и определяет многие геохимические особенности степных районов. Содержание ионов магния составило 231–243 мг/дм³. В анионном составе доминирующим ионом являлся сульфат-ион. В воде озера обнаружено значительное содержание сульфатов (86 127–83 820 мг/дм³), содержание карбонатов не превышает 510 мг/дм³, гидрокарбонатов — 3 051 мг/дм³. Хлориды — постоянный компонент воды, его содержание в озере составило 2 570 мг/дм³. В воде озера Гуджирганское определены фториды, ионы кремния.

Прокариотические сообщества в озере Гуджирганское

Наши анализы показали, что большинство последовательностей генов 16S рРНК были отнесены к домену Bacteria (до 98%) и сгруппированы в 4 449 OTU.

В образце солевой корки Gudzh-1 было показано, что основу микробного сообщества составляют представители следующих филумов: *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Acidobacteria* и *Deinococci*. В образце солевой корки Gudzh-2 доминировали представители *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Cyanobacteria*, *Actinobacteria*, *Verrucomicrobiae*, *Gemmatimonadetes* и *Mollicutes*. Для архей все последовательности были классифицированы на *Euryarchaeota*, *Asgardaeota* (Gudzh-1) и *Euryarchaeota* и *Nanoarchaeaeota* (Gudzh-2).

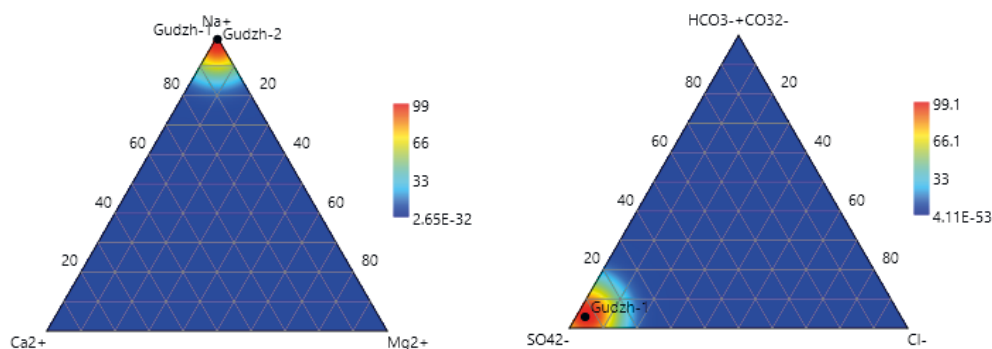


Рис. 2. Диаграмма катионного и анионного состава воды в озере Гуджирганское

Proteobacteria являлись наиболее распространенным бактериальным таксоном в изученных образцах. В нашем наборе данных 81% последовательностей Gudzh-1 были отнесены к представителям этого филума. Представители класса γ -*Proteobacteriam* доминировали, на их долю приходилось 56% всех обнаруженных последовательностей. Большинство последовательностей были отнесены к уже известному роду *Halomonas*. Доля α -*Proteobacteria* составила 24% общего числа всех последовательностей и представлена родами *Rhodobaca*, *Rhodobaculum*, *Actibacterium* и др. Представители δ -*Proteobacteria* составили 0,7% общего числа всех последовательностей и были представлены следующими родами: *Desulfonatronovibrio*, *Bdellovibrio*, *Desulfomicrobium* и др.

В образце Gudzh-2 доля класса γ -*Proteobacteria* составила 24% общего числа всех последовательностей и состояла из представителей различных родов, относящихся к *Halomonas*, *Marinospirillum*, *Nitrincola*, *Wenzhouxiangella*, *Methylnatronum* и др. Класс α -*Proteobacteria* представлен многочисленными родами *Salinarimonas*, *Rhodobaca*, *Roseinatronobacter*, *Marispirillum* и др.

ϵ -*Proteobacteria* в образце Gudzh-1 представлена хемолитотрофными *Sulfuricurvum* и *Sulfurimonas*. Представители ϵ -*Proteobacteria* обнаружены в различных наземных и морских средах, включая глубоководные гидротермальные источники.

Представители филума *Bacteroidetes* составили от 4 до 26% общего числа всех последовательностей в изученных микробных сообществах. Доминирующими родами были *Planktosalinus*, *Anditalea*, *Cyclobacterium*, *Aquiflexum*, *Mongoliibacter* и *Cyclobacterium*. Следует отметить у *Bacteroidetes* обнаружена большая доля бактерий, отнесенных к некультивируемым формам.

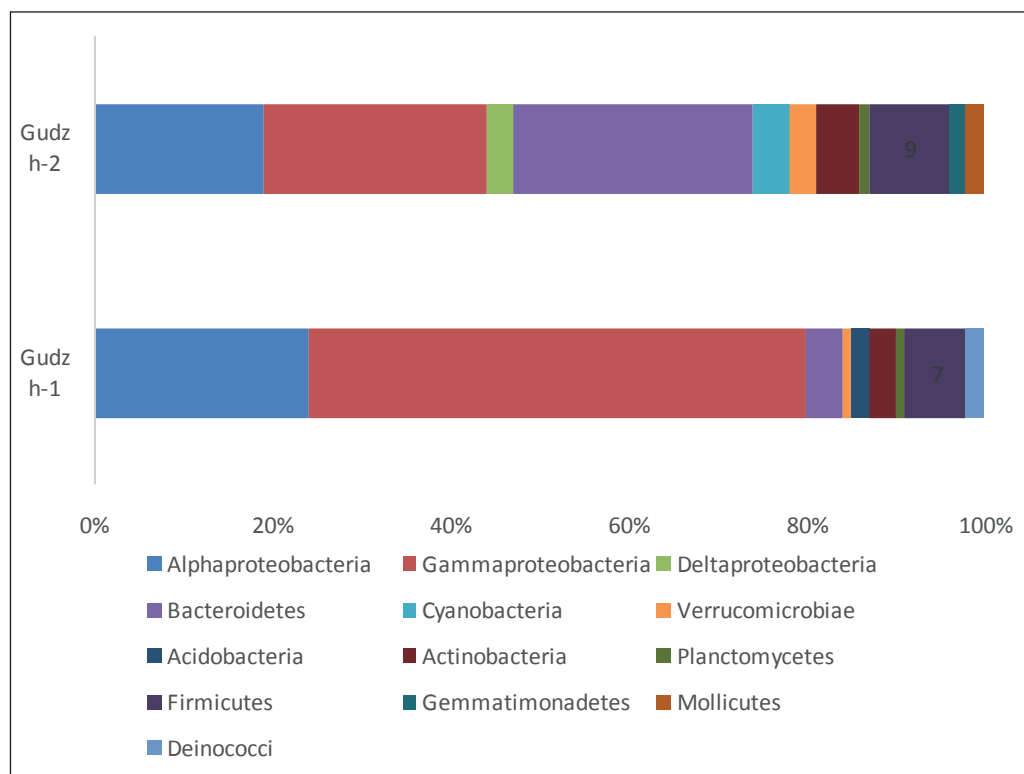


Рис. 3. Таксономическое разнообразие микробного сообщества в солевых корках озера Гуджирганское

Количество последовательностей, отнесенных к филуму *Firmicutes*, составило 7 и 9%. Большинство последовательностей были отнесены к классам *Bacilli* и *Clostridia*. К классу *Bacilli* отнесены алкалофильные бактерии родов *Salipaludibacillus*, *Alkalibacterium* и др. а также сульфатредуцирующий и арсенатредуцирующий *Desulfuribacillus*. Представители этого рода солеустойчивы и алкалофильны. Среди класса *Clostridia* наиболее распространены умеренные алкалофилы *Anoxyanatronum*.

Около 3–5% последовательностей в микробном сообществе соляных корок отнесены к *Actinobacteria*. Последовательности актинобактерий были отнесены к *Nitriliruptoria Actinobacteria*, *Acidimicrobia*. Более половины актинобактериальных последовательностей принадлежали *Nitriliruptoraceae*. Представители актинобактерий отнесены к галотолерантным бактериям из соленых сред обитания со специфическими механизмами адаптации к экстремальным средам, особенно соленым и щелочным местообитаниям [Singh et al., 2012]. В филуме *Actinobacteria* обнаружены последовательности, которые содержат несколько неклассифицированных и ранее некультивируемых форм бактерий.

Представители архей представлены хемоорганотрофными галофильными *Haloferacales*. Также нами обнаружены последовательности нового филума *Nanoarchaeota*, который широко распространен и в высокотемпературных биотопах.

В изученных солевых корках встречаются и другие филумы, такие как *Verrucomicrobia*, *Chloroflexi* и *Deinococci*. Эти результаты согласуются с исследованиями, где эти бактериальные филумы, по-видимому, доминируют в этих экосистемах [Farías et al., 2014]. Все эти группы, как известно, в изобилии присутствуют в морских экосистемах, а также в экстремальных условиях, таких как микробные маты из гиперсоленых озер.

В образце Gudzh-1 обнаружены последовательности, отнесенные к филуму *Deinococci* (2%) и которые представлены родом *Truepera*. Аэробные и хемоорганотрофные *Deinococci* характеризуются высокой устойчивостью к экстремальным факторам окружающей среды — высокой температуре [Theodorakopoulos et al., 2013] и ионизирующему излучению [Asker et al., 2011]. Мы предполагаем, что присутствие бактерий рода *Truepera* в озере Гуджирганское косвенно свидетельствует о разгрузке трещинно-жильных термальных вод сульфатно-натриевого химического типа.

Заключение

В этом исследовании мы использовали высокопроизводительное секвенирование бактериальных ампликонов гена 16S рРНК для изучения разнообразия. *Proteobacteria*, *Firmicutes* и *Bacteroidetes* являются основными филумами, представленными в изученных образцах солевых корок. Показано, что микробные сообщества солевых корок озера Гуджирганское состоят из множества высокоадаптируемых организмов с гетерогенными физиологическими возможностями. На родовом уровне представлены галофильные и умеренно галофильные алкалофильные бактерии, такие как *Halomonas*, *Rhodobaca*, *Rhodobaculum* и др. Интересным моментом является обнаружение большой доли последовательностей генов 16S рРНК, которые не могут быть классифицированы на уровне родов, что указывает на потенциальных новых представителей микробного мира, присутствующих в этой экстремальной экосистеме.

Литература

1. Плюснин А. М., Перязева Е. Г., Чернявский М. К., Жамбалова Д. И., Будаев Р. Ц., Ангахаева Н. А. Генезис воды и растворенных веществ содовых озер Нижнего Куйтуна Баргузинской впадины // География и природные ресурсы. 2020. № 3. С. 89–97. DOI: 10.21782/GIPR0206-1619-2020-3(89-97). Тесст : непосредственный.
2. Asker D., Awad T. S., McLandsborough L., Beppu T., Ueda K. *Deinococcus depolymerans* sp. nov., a gamma- and UV-radiation-resistant bacterium, isolated from a naturally radioactive site. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2011; 61: 1448–1453.
3. Edgar R. C. *SINTAX: a simple non-Bayesian taxonomy classifier for 16S and ITS Sequences*. BioRxiv preprint, 2016, p.20. doi:10.1101/074161.
4. Wang Y.-N., Cai H., Chi C.-Q., Lu A.-H., Lin X.-G., Jiang Z.-F., Wu X.-L. *Halomonas shengliensis* sp. nov., a moderately halophilic, denitrifying, crude-oil-utilizing bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2007; 57(6): 1222–1226. doi: 10.1099/ijms.0.64973-0
5. Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 2013; 30: 2725–2729.
6. Edgar R. C. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nat. Methods.* 2013; 10: 996–998.

7. Fariás M. E., Contreras M., Rasuk M. C., Kurth D., Flores M. R., Poiré D. G., Novoa F., Visscher P. T. Characterization of bacterial diversity associated with microbial mats, gypsum evaporites and carbonate microbialites in thalassic wetlands: Tebenquiche and La Brava, Salar de Atacama Chile. *Extremophiles*. 2014; 18(2): 311–29. doi:10.1007/s00792-013-0617-6

8. Rothschild L. J., and Mancinelli R. L. Life in extreme environments. *Nature*. 2001; 409: 1092–1101. doi: 10.1038/35059215

9. Theodorakopoulos N., Bachar D., Christen R., Alain K., Chapon V. Exploration of Deinococcus-Thermus molecular diversity by novel group-specific PCR primers. *Microbiology Open*. 2013; 2(5): 862–872. doi: 10.1002/mbo3.119ff7.

10. Wierzchos J., Ascaso C., and McKay C. P. Endolithic cyanobacteria in halite rocks from the hyperarid core of the Atacama Desert. *Astrobiology*. 2006; 6: 415–422. doi: 10.1089/ast.2006.6.415.

Статья поступила в редакцию 08.11.2022; одобрена после рецензирования 12.11.2022; принята к публикации 25.11.2022.

STRUCTURE AND DIVERSITY OF MICROBIAL SALT CRUST
IN SULPHATE LAKE GUDZHIRGANSKOYE
OF THE BARGUZIN DEPRESSION (BURYATIA)

E. V. Lavrentieva, L. B. Buyantueva, E. E. Valova,
T. G. Banzaraktsaeva, V. B. Dambaev, V. L. Ivanov

Elena V. Lavrentyeva

Cand. Sci. (Biol.),
Institute for General and Experimental Biology SB RAS
6 Sakhyanovoy St., Ulan-Ude 670011, Russia
Dorzhi Banzarov Buryat State University
24a Smolina St., Ulan-Ude 670000, Russia
lena_1@mail.ru

Lyubov B. Buyantueva

Cand. Sci. (Biol.),
Dorzhi Banzarov Buryat State University
24a Smolina St., Ulan-Ude 670000, Russia
blb62@mail.ru

Elena E. Valova

Cand. Sci. (Biol.),
Dorzhi Banzarov Buryat State University
24a Smolina St., Ulan-Ude 670000, Russia
elena-valova@yandex.ru

Tuyana G. Banzaraktsaeva

Cand. Sci. (Biol.),
Institute for General and Experimental Biology SB RAS
6 Sakhyanovoy St., Ulan-Ude 670011, Russia
tuyana_banz@mail.ru

Vyacheslav B. Dambaev

Cand. Sci. (Biol.),

Institute for General and Experimental Biology SB RAS

6 Sakhyanovoy St., Ulan-Ude 670011, Russia

slavadmb@rambler.ru

Vladimir L. Ivanov

Research Assistant,

Institute for General and Experimental Biology SB RAS

6 Sakhyanovoy St., Ulan-Ude 670011, Russia

vova5631@mail.ru

Abstract. Lake Gudzhirganskoe is a unique natural complex of extreme environmental conditions, where seasonal and daily temperature fluctuations, unstable water regime, significant fluctuations in salinity and water temperature, precipitation of salts on the surface of the lake, in turn, entail a change in the structure of the microbial community in the lake.

In this study, we have used high-throughput sequencing of bacterial 16S rRNA gene amplicons to study diversity. *Proteobacteria*, *Firmicutes* and *Bacteroidetes* are the main phyla present in the studied salt crust samples. It has been shown that the microbial communities of the salt crusts of Lake Gudzhirganskoye consist of many highly adaptable organisms with heterogeneous physiological capabilities. Halophilic and moderately halophilic alkaliphilic bacteria are represented at the generic level, such as *Halomonas*, *Rhodobaca*, *Rhodobaculum*, etc. An interesting point is the discovery of a large proportion of 16S rRNA gene sequences that cannot be classified at the genera level, which indicates the presence of potential new representatives of the microbial world in this extreme ecosystem.

Keywords: sulfate lake, microbial community, salt crusts, diversity, high-throughput sequencing, 16S rRNA gene.

Aknowledgements

The work was financially supported by the grant of Dorzhi Banzarov Buryat State University No. 22-03-0502 and budget agenda of Institute for General and Experimental Biology SB RAS No. 121030100229-1.

For citation

Lavrentieva E. V., Buyantueva L. B., Valova E. E., Banzaraksyaeva T. G., Dambaev V. B., Ivanov V. L. Structure and Diversity of Microbial Salt Crust in Sulphate Lake Gudzhirganskoye of the Barguzin Depression (Buryatia). *Nature of Inner Asia*. 2022; 4(22): 50–58.

DOI: 10.18101/2542-0623-2022-4-50-58

The article was submitted 08.11.2022; approved after reviewing 12.11.2022; accepted for publication 25.11.2022.