

На правах рукописи

ТУДУПОВ Аламжи Владимирович

**РАСПРОСТРАНЕНИЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ
АКТИВНОСТЬ СУЛЬФАТРЕДУЦИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ В
ГИДРОТЕРМАХ ЗАПАДНОГО ЗАБАЙКАЛЬЯ**

03.02.08 – экология (биологические науки)

03.02.03– микробиология (биологические науки)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Улан-Удэ – 2012

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте общей и экспериментальной биологии СО РАН (ФГБУН ИОЭБ СО РАН)

Научный руководитель: **Бархутова Дарима Дондоковна**
кандидат биологических наук

Научный консультант: **Намсараев Баир Бадмабазарович**
доктор биологических наук, профессор

Официальные оппоненты: **Данчинова Галина Анатольевна**
доктор биологических наук, старший научный сотрудник Института эпидемиологии и микробиологии НЦ ПЗС РЧ СО РАН

Дмитриева Ольга Михайловна
кандидат биологических наук, старший преподаватель ФГБОУ ВПО БГУ

Ведущая организация: **Институт природных ресурсов, экологии и криологии СО РАН**

Защита диссертации состоится «26» марта 2012 г. в 14⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 212.022.03 в Бурятском государственном университете по адресу: 670000, г. Улан-Удэ, ул. Смолина, 24 а, биолого-географический факультет, конференц-зал.

Факс: (3012) 210588

E-mail: d21202203@mail.ru
talamzhi@yandex.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Бурятского государственного университета.

Автореферат разослан «__» февраля 2012 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Шорноева Н.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Бактериальное восстановление сульфатов является одним из значимых биогеохимических процессов, играющим существенную роль на терминальных этапах анаэробной деструкции органического вещества (ОВ). Бактерии и археи, восстанавливающие сульфат, широко распространены в природе, в том числе и в гидротермах (Burggaf S. et.al., 1990; Hugenholtz et.al., 1998; Pikuta et.al., 2000; Friedrich, 2002; Fishbain et.al., 2003; Соколова, 2010; Герасимчук и др., 2010). Их способность использовать сульфат как акцептор электрона для получения энергии в процессе анаэробного роста является ключевым звеном в глобальном биогеохимическом цикле серы и углерода (Иванов, 1983; Заварзин, 2003; Бонч-Осмоловская, 2011).

В Забайкалье насчитывается большое количество горячих минеральных источников с различными физическими, химическими и газовыми свойствами (Борисенко, Замана, 1978). Многие источники характеризуются как слабоминерализованные горячие воды с температурой от 41 до 90°C и pH от 7,5 до 10. Щелочные азотные термальные воды являются наиболее известными среди них.

Ранее приведенные исследования структуры микробного сообщества и интенсивности биогеохимических процессов в гидротермах Забайкалья показали, что сульфатредукция является одним из доминирующих процессов на терминальных этапах деструкции ОВ (Намсараев и др., 2006). Поэтому представляется важным поиск и идентификация сульфатредуцирующих бактерий (СРБ), обитающих в щелочных гидротермах, изучение их функциональной активности в микробном сообществе.

Микробные сообщества щелочных гидротерм относятся к наиболее древним биоценозам Земли. Их изучение играет важную роль в формировании представлений об эволюции биосферы (Kelley et.al., 2001; Marteinsson et.al., 2001; Lowe, Tice, 2004). Исследование распространения и активности СРБ при высоких значениях температуры и щелочных значений pH актуально для расширения знаний о многообразии микробного мира и понимания их роли в круговороте веществ и энергии в экстремальных местобитаниях.

Цель исследования – изучение распространения, разнообразия и активности сульфатредуцирующих бактерий в донных отложениях и микробных матах гидротерм Западного Забайкалья, получение активных накопительных культур сульфатредуцирующих бактерий.

В задачи исследования входило:

1. Изучить физико-химические условия щелочных гидротерм как среды обитания СРБ.

2. Определить численность СРБ в донных отложениях и микробных матах гидротерм.

3. Определить интенсивность сульфатредукции в донных отложениях и микробных матах гидротерм.

4. Получить активные накопительные культуры СРБ из донных отложений и микробных матов гидротерм и изучить их экофизиологические характеристики.

5. Определить филогенетическое разнообразие сульфатредуцирующих бактерий в микробном сообществе гидротермы Алла.

6. Выявить геохимическую роль сульфатредукторов в микробных сообществах гидротерм.

Научная новизна и теоретическая значимость. Впервые исследовано разнообразие и численность термофильных СРБ в гидротермах Забайкалья с помощью микробиологических методов и методов, основанных на анализе последовательностей 16S рРНК.

Процесс сульфатредукции с наибольшей скоростью протекал в микробных матах. Установлено, что в гидротермах Забайкалья развиваются как термофильные, так и мезофильные СРБ. Это говорит о том, что экологические условия, созданные в термальных источниках, не препятствуют развитию разных температурных групп бактерий.

Впервые исследовано прокариотическое разнообразие в высокотемпературном микробном мате гидротермы Алла (Забайкалье) с помощью метода пиросеквенирования. Разнообразии сульфатредуцирующих бактерий представлено культивируемыми и некультивируемыми бактериями рода *Thermodesulfovibrio*.

Из гидротерм Забайкалья получены и описаны активные накопительные культуры мезофильных и термофильных алкалофильных сульфатредуцирующей бактерий, способных к окислению лактата и ацетата. Количественные данные о численности и активности СРБ дают возможность оценить их значение в процессах анаэробного распада ОВ и синтеза сероводорода.

Практическая значимость работы. Полученные результаты расширяют представление о разнообразии алкалотермофильных сульфатредукторов в природе и могут быть использованы в биотехнологии, бальнеологических исследованиях. Выделенные накопительные культуры СРБ представляют интерес для биотехнологии как продуценты термо- и алкалоустойчивых ферментов. Сульфатредуцирующие бактерии играют важную роль в формировании лечебного фактора иловых вод, в связи с чем изучение процесса сульфатредукции в гидротермах имеет значение для оценки бальнеологического потенциала источников.

Полученный экспериментальный материал может быть использован при чтении курса лекций по предметам «Микробиология», «Экология».

Апробация работы. Результаты исследований были доложены автором на Всероссийской конференции с международным участием «Биоразнообразие экосистем Внутренней Азии», Улан-Удэ, 2006; Всероссийской конференции «Экология Южной Сибири сопредельных территорий», Абакан, 2008; V международной конференции по криопедологии «Разнообразие мерзлотных и сезонно-промерзающих почв и их роль в экосистемах», Улан-Удэ, 2009; Молодежной школе-конференции «Актуальные аспекты современной микробиологии», Москва, 2008; Международной конференции «Экология и геохимическая деятельность микроорганизмов экстремальных местообитаний» (Улан-Удэ – Улаан-Баатар, 2011); Всероссийской конференции «Эволюция биогеохимических систем (факторы, процессы, закономерности) и проблемы природопользования» Геоэкологические, экономические и социальные проблемы природопользования, Чита, 2011.

Публикации. По теме диссертации, включая тезисы, опубликованы 14 работ.

Объем и структура диссертации. Материалы диссертации изложены на ___ страницах, включая ___ таблиц и ___ рисунков. Диссертация состоит из разделов «Введение», «Обзор литературы», «Экспериментальная часть» (включающая главы «Объекты и методы исследования», «Результаты и обсуждение», «Заключение»), «Выводы», «Список литературы», «Приложение».

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объектами исследования служили термальные азотные источники Западного Забайкалья, в которых в рамках комплексных микробиологических исследований в 2007-2010 гг. производился ежегодный отбор проб: Алла, Баунтовский, Гарга, Горячинск, Гусиха, Кучигер, Сеоя, Уро, Сухая, Умхей.

Методы исследования. В полевых условиях определение физико-химических параметров воды в местах отбора проб проводили с помощью портативных приборов. Кислотность среды (рН) измеряли рН-метром рНer2 (Португалия), значения общей минерализации – тестер-кондуктометром TDS-4 (Сингапур), окислительно-восстановительный потенциал (Eh) – измерителем редокс-потенциала ORP (Португалия). Температуру воды и осадков определяли ртутным или сенсорным электротермометром Prіma (Португалия). Концентрацию карбонат- и гидрокарбонат-ионов определяли титриметрическим методом (Резников и др., 1970).

В лабораторных условиях определяли: сульфаты – турбидиметрически с BaSO₄, хлориды – аргентометрическим методом Мора (Аринушкина, 1970), сульфиды – фотометрически с N'N'-диметил-пара-фенилендиамином (ДМП) (Trüper, Schlegel, 1989). Концентрации ионов Na⁺ и K⁺ определены с помощью атомно-абсорбционного спектрометра SOLAAR M6

(США), Ca^{2+} был определен комплексометрическим методом с Трилоном Б в присутствии мурексида, Mg^{2+} – по разнице между результатами титрования суммы Ca^{2+} и Mg^{2+} в присутствии эриохрома и результатов определения Ca^{2+} (Резников и др., 1970).

Органический углерод в осадках анализировали методом мокрого сжигания по Тюрину (Аринушкина, 1961). Оптическую плотность измеряли на фотоэлектрокалориметре КФК-20 (Россия) и спектрофотометре СЕСИL-СЕ1021 (Великобритания). Содержание белка определяли по методу Лоури с использованием реактива Фолина (Практикум по микробиологии, 2005).

Учет численности жизнеспособных клеток микроорганизмов проводили методом предельных разведений на селективных средах (Пушева и др., 1999). Для культивирования сульфатредуцирующих бактерий к вышеописанной среде добавляли (г/л): $\text{Na}_2\text{SO}_4 \times 10\text{H}_2\text{O} - 3$; $\text{Na}_2\text{S} \times 9\text{H}_2\text{O} - 0,05$; натриевые соли молочной или уксусной кислот – 4. В качестве индикатора процесса добавляли 1/3 металлической скрепки или 0,01% раствор FeSO_4 в 1% HCl .

Среду перед посевом кипятили и продували азотом для удаления растворенного кислорода.

Культивирование сульфатредукторов проводили во флаконах, наполненных средой доверху, и закрытых резиновыми пробками. Численность сульфатредукторов оценивали через 14 суток. О росте бактерий судили по почернению скрепки и образованию осадка сульфида железа. Посевы выполняли в 3-х повторностях. Культивирование осуществляли в термостате при 30°C и 55°C. Параллельно ставили химический контроль.

Температурную зависимость роста изучали в области от 10 до 90°C. При исследовании pH-зависимости в диапазоне pH 8,0 – 8,5 использовали раствор по Кларку-Лабсу, для pH 7,0 - фосфатный буфер, а для приготовления высокощелочных сред (pH 9,0 - 11,0) применяли карбонатные буферные растворы (Справочник по биохимии, 1996).

pH среды задавали разными концентрациями растворов NaHCO_3 и Na_2CO_3 , в соответствии с природными значениями pH.

При определении возможных доноров электронов их вносили в конечной концентрации 0,12%. Способность к автотрофному росту наблюдали с молекулярным водородом (100% газовой фазы).

Рост бактерий фиксировали по изменению оптической плотности среды при длине волны 560 нм на фотоколориметре КФК – 3 (Россия), прямым подсчетом клеток и по образованию конечного продукта реакции – сульфида.

Морфологию клеток бактерий изучали с использованием светового микроскопа AxioStar Plus (Германия) с фазово-контрастным устройством и цифровой фотокамерой с увеличением в 1300 раз.

Для изучения отложения минералов микробные маты упаковывались с сохранением структуры, а в лабораторных условиях разделялись на слои и сушились. Изучение качественного состава минеральных фаз проводилось при помощи сканирующего электронного микроскопа Leo Oxford 1430VP (Германия) и светового Axioskop 2 Plus (Германия). Видовую принадлежность цианобактерий определяли по отечественным определителям (Еленкин, 1949; Голлербах и др., 1953).

Для определения световой и темновой продукции использовали $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ (Иванов, 1956; Кузнецов, Романенко, 1963). В пробы вносили радиометку с активностью 25 мкК. Пробы фиксировали 10N раствором NaOH. Диурон (3-(3,4-дихлорофенил)-1,1-диметилмочевина) в конечной концентрации 7 μM применяли для ингибирования оксигенного фотосинтеза. В ряде экспериментов проводилось стимулирование продукционных процессов цитратом железа в конечной концентрации 0-5 г/л железа. Пробы обрабатывали на установке УЗДН-2 с частотой 22 МГц и мощностью 0,4 мА в течение 2 минут. Фильтровали через мембранные фильтры с диаметром пор 0,2 мкм. Фильтры промывали тремя объемами воды с pH 2-3, высушивали и измеряли радиоактивность.

При определении интенсивности сульфатредукции использовали метод Иванова (1956). Для этого в пробу вносили 0,1-0,2 мл $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ с активностью 0,1-1 мкК и инкубировали в течение 0,4-2 суток. Фиксацию интенсивности сульфатредукции производили путем введения в пробу 10-25 % раствора ацетата Cd. Радиоактивность определяли на жидкостном сцинтилляционном счетчике Rackbeta (Швеция).

Измерение содержания стабильных изотопов углерода ^{12}C и ^{13}C в виде газообразной формы CO_2 проводили на масс-спектрометре МИ-1201 (СССР). Результаты приведены в виде величин $\delta^{13}\text{C}$ в промилле по отношению к общепринятым стандартам PDB (Зякун, 2010). Работа выполнена к.б.н Дамбаевым В.Б. в ИБФМ, г. Пушино.

ДНК из биомассы бактерий выделяли с помощью коммерческих наборов ДНК-сорб и РИБО-сорб (ФГУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва). В работе были использованы праймеры, комплементарные наиболее консервативным участкам гена 16S рПНК. Амплификацию фрагмента ДНК, соответствующего гену 16S рПНК, проводили на амплификаторе БИС (Россия). Результаты ПЦР анализировали в 1,5% агрозном геле, продукты нужной длины вырезали и элюировали методом замораживания-оттаивания. Секвенирование проводили в Межинститутском центре секвенирования ДНК (г. Новосибирск) на автоматических секвенаторах: ABI310A и ABI 3130x1 (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer, США). Метагеномный анализ проведен на пиросеквенаторе Roche 454 GS-FLX Titanium (Корея).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

Экологическая характеристика исследованных гидротерм

Физико-химическая характеристика гидротерм

Максимальное значение температуры воды (79°С) зафиксировано в источнике Алла (табл. 1). Наиболее горячими на выходе были воды гидротерм Гарга (74°С) Гусиха (71,5°С), Уро (69,1°С). Температура воды источников Горячинск, Баунтовский и Сеоя была приблизительно одинаковой и составила от 53°С до 55°С. Максимальная температура воды источника Горячинск (53,5°С) зафиксирована зимой. В летнее время температура воды снижается до 44°С.

Таблица 1

Физико-химическая характеристика гидротерм Забайкалья

Источник	Тип воды	T, °С (на изливе)	pH	Eh, мВ	M, г/дм ³	H ₂ S, мг/дм ³
Алла	сульфатно-гидрокарбонатный натриевый	79,0	9,9	-150	0,30	16,5
Баунтовский	гидрокарбонатно-сульфатный натриевый	53,0	8,4	-56	0,20	7,8
Гарга	сульфатно-гидрокарбонатный натриевый	74,0	8,2	+230	0,30	<0,1
Горячинск	сульфатно-гидрокарбонатный натриевый	53,0	9,0	-23	0,53	5,9
Гусиха	сульфатно-гидрокарбонатный натриевый	72,0	8,2	+340	0,93	<0,1
Сеоя	сульфатно-гидрокарбонатный натриевый	49,0	9,7	-94	0,29	1,8
Уро	гидрокарбонатно-сульфатный натриевый	69,1	9,0	-33	0,50	<0,1
Кучигер	сульфатно-гидрокарбонатный натриевый	41,0	9,8	-43	0,30	25,6
Умхей	сульфатно-гидрокарбонатный натриевый	51,0	9,0	-340	0,42	31,0
Сухая	гидрокарбонатный натриевый	49,0	9,1	-10	0,63	27,2

Eh – окислительно-восстановительный потенциал; M – минерализация.

По содержанию сероводорода исследуемые гидротермы подразделяются на сульфидные и бессульфидные, в которых концентрация H₂S варьируется в пределах от 0 до 31,0 мг/дм³.

Изучение минерального состава вод гидротерм показало преобладание щелочных металлов. Содержание ионов магния колеблется от 0,25 до 15,25 мг/дм³. Содержание ионов кальция в водах источников варьирует в пределах 0,37-32,06 мг/дм³. Максимальное содержание кальция отмечено в термальном источнике Алла, наименьшее количество этого катиона определено в гидротерме Сеоя. В воде большинства гидротерм сульфатные ионы преобладают над другими анионами. Их концентрация в воде находилась в пределах 64-480 мг/дм³.

Максимальное количество зольных элементов обнаружено в матах, развивающихся в ручьях гидротерм Гусиха (75,10%) и Уро (68,73%). Наименьшее количество зольных элементов отмечено в матах, развивающихся у излива источника Гусиха (30,34%).

Исследованные донные осадки характеризовались высоким содержанием золы (81,45-99,98%), что свидетельствует о накоплении неорганических соединений.

Сравнительный анализ содержания Сорг микробных матов и донных осадков термальных источников показал, что содержание ОВ выше в микробных матах, что может быть объяснено высокой интенсивностью продукционных процессов в матах в отличие от донных осадков (Горленко и др., 1987; Jorgensen, Nelson, 1988; Navarrete et al., 2000; Намсараев и др., 2000).

Микробные маты как продуценты органического вещества

Ведущая роль в формировании микробных сообществ гидротерм принадлежит оксигенным и аноксигенным фототрофным микроорганизмам, среди которых доминируют цианобактерии. В гидротермах формировались микробные маты при значениях температуры от 24 до 65°C и pH от 8,2 до 9,0. Каждому температурному интервалу соответствовал определенный тип сообщества. Матобразующими организмами в цианобактериальных матах являются нитчатые цианобактерии рода *Phormidium*. Анаэробные фототрофы располагаются под цианобактериями, трофически связанные с сульфатредуцирующими бактериями и приспособленные к использованию водорода и сероводорода. В аноксигенных матах доминировали зеленые бактерии рода *Chloroflexus*, в серных матах – *Thiothrix*.

Интенсивность бактериальной продукции органического вещества

Скорости микробных процессов продукции органического вещества в высокотемпературных выходах гидротерм Западного Забайкалья были определены радиоизотопным методом. Результаты экспериментов с использованием ¹⁴C-бикарбоната показали, что скорость продукции органического вещества в микробных матах за счет фотосинтеза варьирует от 0,6 до 98 мгС/(дм³·сут), при этом вклад аноксигенных фототрофов может достигать 100% от общего фотосинтеза. Интегральный показатель активности микробного сообщества, определяемый скоростью темновой фиксации СО₂, достигает 51,67 мгС/(дм³·сут) (табл. 3).

Таблица 3

Продукционные процессы гидротермах Забайкалья, мгС/(дм³·сут)

Источник	Температура, °С	Фотосинтез		Хемосинтез		Темновая фиксация	
		д.ос	м.м.	д.ос	м.м.	д.ос	м.м.
Алла	70	8,81	45,74	5,04	6,61	5,58	10,51
Уро	56	7,07	32,01	3,81	17,13	6,00	24,10
Гарга	50-74	8,73	98,58	5,04	5,90	6,03	51,67

Примечание: здесь и далее: «д.ос.» - донный осадок; «м.м.» - микробный мат.

Интенсивность сульфатредукции в гидротермах

Процесс бактериальной сульфатредукция является доминирующим процессом в терминальной деструкции ОВ щелочных гидротермах. Через этот терминальный процесс в сутки может минерализоваться до 30-61% органического вещества.

Радиоизотопным методом были изучены скорости сульфатредукции в гидротермах при температуре 55-74°C (табл. 4). В микробных матах и донных осадках образование сероводорода протекает со скоростью 0,014-15,340 и со скоростью 0,009-0,052 мгS/(дм³·сут), соответственно. Процессы восстановления сульфата осуществляются, по-видимому, за счет доноров электронов (Н₂, органическое вещество), поступающих с водой и синтезируемое в процессе бактериальной продукции.

Таблица 4

Сульфатредукция в гидротермах Забайкалья

Источник	Тип пробы	Температура, °С	Скорость, мгS/(дм ³ сут)	Расход углерода, мгC/(дм ³ сут)
Уро	д.ос.	55	0,05	0,039
Уро	м.м.	67	1,33	0,099
Уро	д.ос.	67	0,02	0,016
Гарга	д.ос.	74	4,18	3,135
Гарга	м.м.	57	15,34	11,505
Алла	д.ос.	74	0,01	0,009
Алла	м.м.	65	0,01	0,010

Распространение сульфатредукторов в источниках

В осадках исследуемых источников численность СРБ достигала максимальных значений (10⁶-10⁸ кл/см³ ила) при использовании лактата в качестве единственного источника углерода и донора электронов и инкубации проб при температуре 30°C и 55°C. Высокие численности СРБ, растущих как на лактате, так и на ацетате (10⁷ и 10⁸ кл/см³), выявлены в донных осадках гидротерм Кучигер и Горячинск соответственно. Численность СРБ в осадках из Гарги, Сеюи, Гусихи и Аллы не превышала 10⁶ кл/см³.

Численность мезофильных СРБ в источнике Баунтовский, растущих на лактате, достигала 10⁷ кл/см³, тогда как на ацетате – лишь 10⁵ кл/см³. В то же время численность СРБ, растущих при 55°C, достигала 10⁵ кл/см³, при использовании в качестве источника углерода как лактата, так и ацетата.

Было изучено вертикальное распределение в донных осадках гидротерм Сухая, Горячинск и Умхей. Максимальная численность (10⁷-10⁸ кл/см³) выявлены в подповерхностных слоях (3-8 см).

Характеристика накопительных культур СРБ

Из микробных матов гидротерм Гусиха, Горячинск и Сеюя выделены три накопительных культур СРБ, а из донных осадков гидротерм Уро, Гарга, Горячинск и Умхей получены тринадцать накопительных культур СРБ.

Условия выделения накопительных культур сульфатредукторов

Накопительные культуры сульфатредуцирующих бактерий были получены с использованием лактата в качестве единственного источника углерода. Конечная концентрация субстрата в среде составляла 0,4%. Инкубацию проводили при двух значениях температур – 30°C и 55°C.

Значения pH в среде устанавливались в соответствии с величиной водородного показателя в воде источников.

Шесть из шестнадцати накопительных культур были выделены при температуре 30°C, pH 9,0-9,5. Остальные десять накопительных культур СРБ получены при тех же условиях, однако инкубацию проводили при 55°C. Все накопительные культуры получены после 4-5 пересевов.

Морфология накопительных культур сульфатредукторов

Полученные накопительные культуры СРБ представлены тонкими неподвижными палочками разной длины, тонкими слегка изогнутыми палочками и подвижными вибрионами. Клетки одиночные, реже встречаются сцепленные в цепочки (рис. 2).

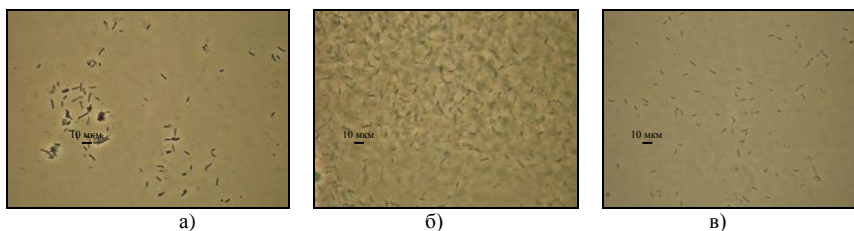


Рисунок 2. Накопительные культуры Ga-1 (а), Se-08-1-2 (б) и UГ51L (в)

Накопительные культуры СРБ, представленные вибрионами, выделены из гидротерм Уро, Горячинск и Гарга. В основном все СРБ, представленные вибриональным морфотипом, являются мезофилами, за исключением накопительных культур Ga-1, Уро-10-ручей, Уро-10-2, у которых температурные оптимумы роста находятся выше 53°C.

СРБ, представленные палочковидными формами, встречаются в гидротермах Горячинск, Гарга, Гусиха, Сеоя. Среди них выявлены как мезофилы (Горячинск), так и термофилы (Гусиха).

Экофизиологические свойства накопительных культур СРБ

Температурные интервалы развития мезофильных накопительных культур СРБ (инкубация при 30°C), составляют 27-55°C, оптимум их роста равен 36°C. Для накопительной культуры Гор-10-1 оптимум зафиксирован при 45°C. Их рост выше 55°C не наблюдался.

Рост СРБ при использовании различных доноров электронов

	лактат	ацетат	фумарат	бутират	пропионат	Д.Э.	этанол	глюкоза	фруктоза	манноза	рамноза	формат	серин	цистеин	метанол	сукцинат	пируват
Se-08-1-2	++	+	-	++	-	++	+	+	-	++	+	-	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
Se-08-2	++	++	+	-	++	++	+	+	++	++	++	++	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
Ga-1	++	+	-	++	-	++	+	-	-	-	+	-	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
Um-09-1	++	-	-	-	+	++	+	-	+	-	-	-	-	н.о.	-	н.о.	н.о.
Um-09-2	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	н.о.	н.о.
Um-09-3	++	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	н.о.	-	н.о.	н.о.
Ur ₅ 1L	++	-	-	н.о.	+	+	-	++	-	-	-	н.о.	-	++	+	+	+
Ur ₅ 3L	++	-	+	н.о.	+	-	-		-	+	-	н.о.	-	+	-	+	++
Уро-10-ручей (30)	++	+	+	н.о.	+		-	+	++	+	-	н.о.	++	++	-	+	+
Гор-10-1 (30)	++	+	+	н.о.	+	+	+	-	-	-	-	н.о.	++	++	-	+	++
Гор-10-3 (30)	++	+	-	н.о.	+	-	+	-	-	-	-	н.о.	-	++	-	н.о.	н.о.
Уро-10-2 (55)	++	+	+	н.о.	+	+	+	-	++	+	+	н.о.	++	+	-	+	++
Уро-10-ручей (55)	++	+	+	н.о.	+	+	+	-	+	+	+	н.о.	-	++	-	+	+
Га-10-3 (55)	++	+	+	н.о.	+	+	-	-	+	-	-	н.о.	++	++	-	+	+
Гор-10-1 (55)	++	+	+	н.о.	+	++	+	+	++	-	+	н.о.	-	++	-	+	+

Примечания: «++» - активный рост; «+» - слабый рост; «-» - нет роста; «н.о.» - рост не определялся.

Температурный оптимум для накопительных культур Уро-10-ручей и Га-1, полученных при инкубации при 50°C, составил 62°C. Для накопительной культуры Уро-10-2 оптимум составил 53°C. Для накопительных культур Se-08-1-2 и Se-08-2 максимальный прирост биомассы клеток зафиксирован при двух значениях температуры – 52°C и 65°C. Температурные интервалы, при которых развивались накопительные культуры СРБ, составляет 40-70°C. Таким образом, выше описанные культуры относятся к термофилам (рис. 3).

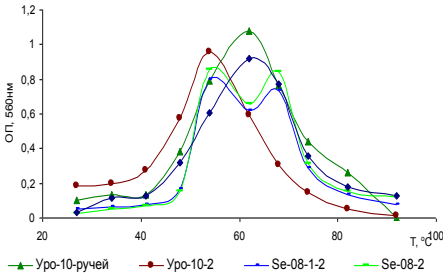


Рисунок 3. Зависимость роста термофильных накопительных культур СРБ от температуры

Рисунок 3. Зависимость роста термофильных накопительных культур СРБ от температуры

Все полученные накопительные культуры СРБ являются облигатными алкалофилами, окисляющими источник углерода в пределах pH от 8,0 до 10,0 с оптимумом pH 9,1 (рис. 4).

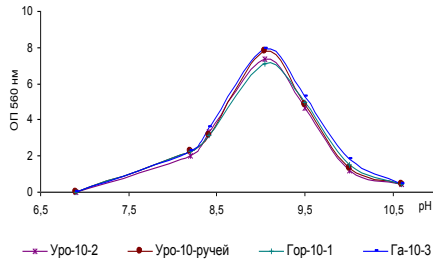


Рисунок 4. Зависимость роста термофильных накопительных культур СРБ от pH

Культуры сульфатредукторов активно используют в качестве источника углерода и донора электронов пируват, сукцинат, цистеин, а также ацетат. Некоторые СРБ для роста также используют сахара. Метанол, глюкозу, рамнозу используют лишь немногие накопительные культуры (табл. 5). Накопительные культуры СРБ проявили способность к автотрофному росту.

В качестве акцепторов электронов СРБ используют сульфит, тиосульфат и нитрат. Диметилсульфоксид используют лишь некоторые культуры СРБ. (рис. 5).

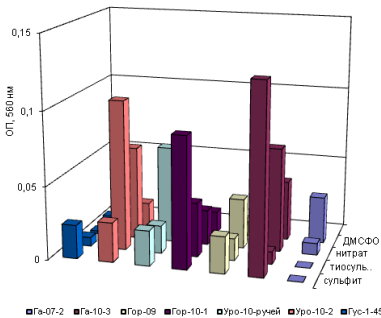


Рисунок 5. Рост термофильных накопительных культур СРБ на акцепторах электронов

Рисунок 5. Рост термофильных накопительных культур СРБ на акцепторах электронов

Для двух накопительных культур СРБ (мезофильной Ur_31L и термофильной Га-10-3) была изучена зависимость роста в градиенте тем-

пература-pH (рис. 6). Эти два параметра являются одними из основных характеристик исследуемых гидротерм. Установлено, что при одновременном воздействии двух факторов пределы и оптимум развития мезофильного сульфатредуктора сужаются и смещаются в сторону более низких температур.

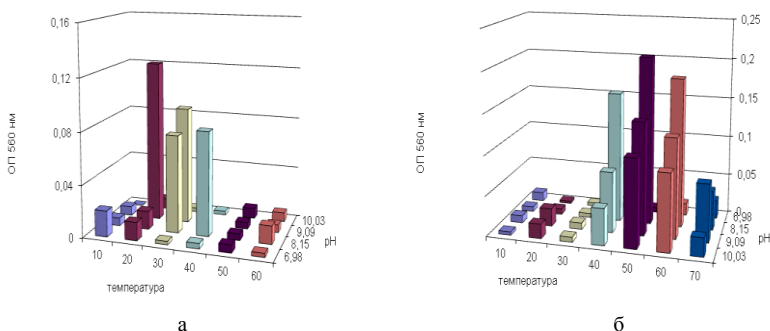


Рисунок 6. Рост культуры *Ur51L* (а) и *Ga-10-3* (б) в градиенте температура-pH

Аналогичная картина наблюдается для термофильного сульфатредуктора *Ga-10-3*.

Таким образом, согласно полученным экофизиологическим характеристикам, накопительные культуры являются облигатными алкалофилами. По отношению к температуре накопительные культуры *Ur51L*, *Ur53L*, *Gor-10-1*, *Gor-10-3* являются мезофилами, остальные накопительные культуры (*Уро-10-2*, *Уро-10-ручей*, *Ga-1*, *Se-08-1-2*, *Se-08-2*) – термофилами.

Разнообразие сульфатредукторов

Из пробы мата высокотемпературной зоны (73-65°C) гидротермы Алла была выделена тотальная ДНК и получен набор последовательностей генов 16S рРНК с помощью метода пиросеквенирования. Набор состоял из 2402 клонов. Наибольшее число полученных последовательностей принадлежит филотипам *Deinococcus-Thermus* (1084) и *Nitrospirae* (869). Последовательности генов сульфатредуцирующих бактерий, способных к диссимиляционной сульфатредукции, выявлены только в фило типе *Nitrospirae*, который представлен последовательностями генов, родственных роду *Thermodesulfovibrio*. В популяции микробного сообщества сульфатредукторы занимают значительную долю и составляют более трети микробного сообщества.

Полученные последовательности образуют два кластера: 1 кластер – *Thermodesulfovibrio_o* (642 клон) и 2 кластер – *Thermodesulfovibrio_o_uc* (227 клонов). В первом кластере выявлено четыре последовательности, близкородственные к культивируемым бактериям *Thermodesulfovibrio yellowstonii* (98-99% гомологии). Остальные последовательности относятся к

некультивируемым представителям *Thermodesulfovibrio* (83-99% гомологии) (рис. 7).

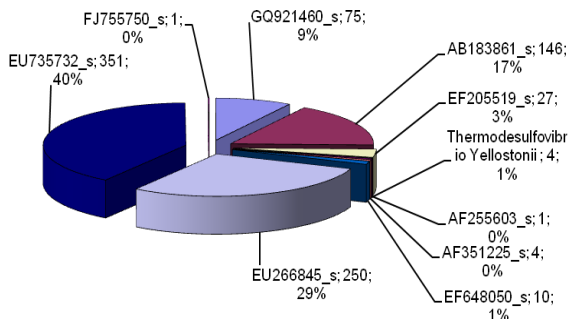


Рисунок 7. Соотношение клонов СРБ в микробном мате гидротермы Алла

Геохимическая роль сульфатредуцирующих бактерий

Геохимическая деятельность сульфатредуцирующих бактерий связана с их участием в минерализации органического вещества в анаэробных условиях с образованием углекислоты и сероводорода. Образующийся сероводород является активным биогеохимическим агентом и участвует в процессах хемолитотрофии, изменении физико-химических условий среды, а также влияет на процессы биогенного образования минералов. За счет окисления сероводорода на границе аэробных и анаэробных зон происходит синтез ОВ в процессе хемосинтеза и накоплении биомассы автотрофных микроорганизмов.

Синтезированный сульфатредукторами сероводород вступает в дальнейший круговорот серы, в котором участвуют аноксигенные фототрофы и хемолитотрофные серобактерии, выявленные в исследованных гидротермах. Бактериальный синтез сероводорода происходит в широком диапазоне температур- от 27 до 70°C.

Микробная продукция CO₂ за счет потребления ОВ приводит к осаждению карбонатных минералов. Этот процесс интенсивно происходит в анаэробных условиях, характеризующимся развитым процессом сульфатредукции, которая сопровождается заметным подщелачиванием воды за счет изъятия иона водорода при образовании сероводорода.

С геохимической деятельностью СРБ связано образование сульфидных минералов, таких как пирит, пирротин, куприт, сфалерит и других (Гамягин, 2010). В природных микробных матах источника Горячинск было обнаружено образование следующих минералов: пирита, кремнезема, сульфата бария с примесями стронция.

В микробных матах гидротермы Горячинск обнаружено отложение пирита внутри водорослевой клетки, размер которого не превышает 1 мкм

(рис. 13). Также среди микробных сообществ обнаружено накопление сферолитов пирита, размер которых не более 5 мкм в поперечнике (рис. 8).

В результате деятельности микробного сообщества гидротерм происходит фракционирование изотопов углерода и серы. Образование изотопно-легких карбонатов происходит при анаэробном окислении ОВ, происходящем при участии сульфатредуцирующих бактерий (Иванов, 1964). Изотопный состав $\delta^{13}\text{C}$ карбонатов в микробных матах исследуемых гидротерм изменялся от $-4,83$ до $-12,37\%$.

Изотопный состав углерода ($\delta^{13}\text{C}$) органического вещества микробных матов щелочных гидротерм варьировал от $-7,17\%$ до $-32,79\%$. Наиболее легкие значения $\delta^{13}\text{C}$ имело органическое вещество мата из гидротермы Кучигер, где температура воды достигала на выходе 41°C . Данные показывают, что для продукции органического вещества кислородные и аноксигенные фототрофы фиксируют вулканогенную и биогенную углекислоту.

Таким образом, в процессе деятельности микробного сообщества в гидротермах идет процесс разделения изотопов углерода. Карбонат кальция, формирующийся в микробном мате, содержит изотопно-легкий $\delta^{13}\text{C}$, в микробном мате происходит утяжеление $\delta^{13}\text{C}$ органического вещества.

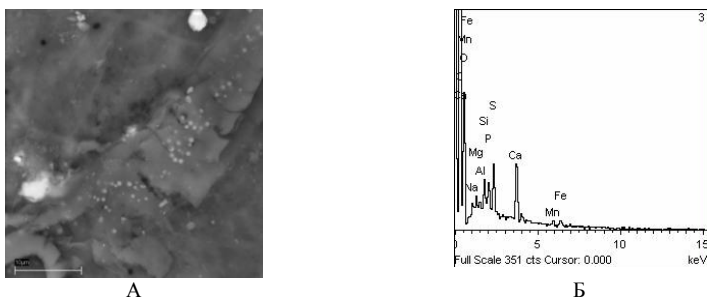


Рисунок 8. Фото (сканирующий микроскоп): А - кристаллы пирита в микробном сообществе ист. Горячинск, ст. 1; Б - элементный состав

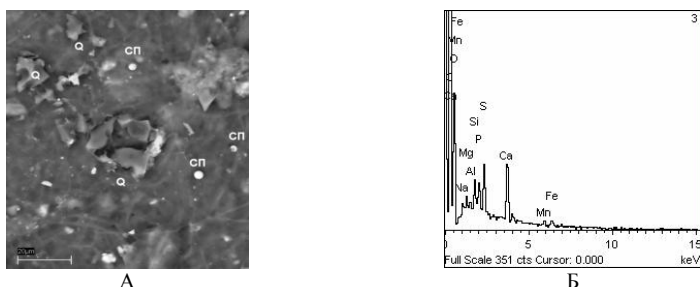


Рисунок 9. Фото (сканирующий микроскоп): А - кристаллы сферолита пирита (СП); Б - элементный состав сферолитов пирита

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Использование комплексных микробиологических, молекулярно-биологических, радиоизотопных и стабильно-изотопных данных позволило количественно оценить распространение СРБ в наземных гидротермах и их деятельность в микробном сообществе.

Исследованные источники характеризуются высоким содержанием сульфатов, лабильного органического вещества, а также низкими значениями ОВП, что является благоприятным для развития СРБ. На конечных этапах деструкции органического вещества в гидротермах Забайкалья сульфатредукторы являются основными деструкторами органического вещества в микробных сообществах гидротерм, в том числе и в бессульфидных. Образованный сероводород создает особые экологические условия для функционирования бактерий круговорота серы – аноксигенных фототрофных и хемотрофных серных и тионовых бактерий.

Анализ генов 16S рРНК из пробы источника Алла, полученных методом пиросеквенирования, позволил обнаружить последовательности, родственные генам 16S рРНК сульфатредуцирующих бактерий рода *Thermodesulfovibrio*. В популяции микробного сообщества гидротерм, микроорганизмы, осуществляющие диссимиляционное восстановление сульфатов, могут составлять более 1/3 микробного сообщества, что показывает существенную роль этой группы прокариот в функционировании микробного сообщества. Сульфатредуцирующие бактерии, могут участвовать в восстановительной фазе цикла серы в щелочных условиях термальных источников в диапазоне рН от 8,4 до 9,9 и температуре от 24 до 70°C.

Сульфидогенное микробное сообщество играет важную геохимическую роль, участвуя в процессе окисления органических веществ в анаэробных условиях и синтезе углекислоты и сероводорода. В результате деятельности в гидротермальных системах сульфатредукторы участвуют в формировании геохимических барьеров, на которых создаются градиенты по концентрациям, растворимости компонентов, рН. Образование геохимических барьеров в микробном мате ведет к осаждению ряда минералов, таких как кальциты и пириты.

ВЫВОДЫ

1. Сульфатредуцирующие бактерии широко распространены в донных осадках и микробных матах гидротерм Западного Забайкалья. Максимальная численность термофильных СРБ достигает 10^8 кл/см³, мезофильных – 10^4 кл/см³.

2. В сероводородных и бессульфидных гидротермах Западного Забайкалья создаются условия для активной деятельности сульфатредуцирующих бактерий, которые играют важную роль в анаэробном окислении ОВ. Скорость сульфатредукции при температуре 57-70°C составляет 0,012-15,340 мгS·дм⁻³·сут⁻¹. При этом максимальные скорости выявлены в мик-

робных матах.

3. Получены десять активных накопительных культур алкалотермофильных СРБ, способных к росту при pH 8,5-10 и температуре 40-70°C, и шесть актиалкаломезофильных СРБ, способных к росту при pH 8,5-10 и температуре 27-55°C.

4. Анализ микробного сообщества гидротермы Алла методом пироквенирования показал присутствие организмов, родственных *Thermodesulfovibrio*. По полученным результатам пироквенирования сульфатредуцирующие бактерии составляют третью часть от микробного сообщества.

5. Геохимическая роль сульфатредуцирующих бактерий в микробных матах и донных осадках гидротерм связана с их участием в минерализации органического вещества с образованием углекислоты и сероводорода, участием в синтезе сульфидных и карбонатных минералов, а также в создании лечебных свойств воды и илов.

Список работ, опубликованных по материалам диссертации

Статьи, опубликованные в рецензируемых изданиях

1. Бархутова Д.Д., Данилова Э.В., Тудупов А.В., Дармаева Б.В. Гидрохимические показатели гидротермы Горячинск // Вестник Бурятского государственного университета. 2008. Вып. 3. С. 14-17.

2. Данилова Э.В., Дагурова О.П., Гаранкина В.П., Тудупов А.В., Ульзетуева А.Д. Гидрохимическая и микробиологическая характеристика некоторых источников Тункинской долины // Вестник Бурятского государственного университета. 2008. Вып. 3. С. 52-54.

3. Тудупов А.В., Потапова З.М., Дашиева Э.П., Бабасанова О.Б. Гидрохимические показатели щелочных гидротерм Прибайкалья // Вестник Бурятского государственного университета. 2008. Вып. 3. С. 42-44.

4. Потапова З.М., Тудупов А.В., Цыренова Д.Д., Бархутова Д.Д. Влияние температуры на содержание хлорофилла «а» в термальных источниках Уро и Горячинск // Вестник Бурятского государственного университета. 2009. Вып. 3. Серия «Химия, Физика». С. 27-31.

5. Тудупов А.В., Дамбаев В.Б., Бархутова Д.Д. Изотопный состав углерода микробных матов щелочных гидротермах Прибайкалья // Вестник Бурятского государственного университета. 2009. Вып. 3. Серия «Химия, Физика». С. 33-35.

6. Тудупов А.В., Калашников А.М., Бархутова Д.Д. Распространение сульфатовосстанавливающих бактерий в щелочных гидротермах Прибайкалья // Вестник Бурятского государственного университета. 2009. Вып. 4. серия «Биология, География». С. 102-105.

7. Калашников А.М., Тудупов А.В., Зайцева С.В., Бархутова Д.Д., Намсараев Б.Б. Разнообразие сульфатредуцирующих бактерий в щелочных гидротермах Прибайкалья // Вестник Бурятского государственного уни-

верситета. 2010. Вып. 4. Серия «Биология, География». С.93-96.

8. Бархутова Д.Д., Тудупов А.В., Намсараев Б.Б. Содержание основных неорганических соединений серы в минеральных источниках Бурятии и Монголии // Вестник Бурятского государственного университета. 2011. Вып. 3. Серия «Химия, Физика». С.74-80.

9. Тудупов А.В., Бархутова Д.Д., Намсараев З.Б., Намсараев Б.Б. Бактериальный синтез сероводорода в азотных гидротермах Прибайкалья // Вестник Бурятского государственного университета. 2011. Вып. 3. Серия «Химия, Физика». С.129-134.

Тезисы

10. Калашников А.М., Тудупов А.В. Сульфатредуцирующие бактерии термального источника Горячинск (Бурятия) // Материалы Всероссийской конференции «Экология Южной Сибири и сопредельных территорий». Абакан: Хакасского государственного университета им. Н.Ф. Катанова, 2008. С.128-129.

11. Тудупов А.В., Бархутова Д.Д. Распространение сульфатредуцирующих бактерий в щелочных гидротермах Прибайкалья // Материалы IV Международной молодежной школы-конференции «Актуальные аспекты современной микробиологии». Москва: ООО «МАКС Пресс», 2008. С. 46-47.

12. Бархутова Д.Д., Тудупов А.В., Данилова Э.В. Процессы сульфатредукции в холодных сероводородных минеральных источниках Байкальской рифтовой зоны // Материалы V Международной конференции по криопедологии «Разнообразии мерзлотных и сезонно-промерзающих почв и их роль в экосистемах». Москва: Институт географии РАН, 2009. С. 109 - 110.

13. Тудупов А.В. Распространение и экофизиологические характеристики сульфатредуцирующих бактерий в бессульфидных гидротермах Уро и Гарга (Прибайкалье) // Материалы Международной конференции «Экология и геохимическая деятельность микроорганизмов экстремальных местообитаний». Улан-Удэ: изд-во Бурятского государственного университета, 2011. С. 167-168.

14. Бархутова Д.Д., Тудупов А.В. Роль сульфатредуцирующих бактерий в биогеохимических процессах гидротерм // Материалы конференции и симпозиума, посвященных 30-летию ИПРЭК СО РАН «Эволюция биогеохимических систем (факторы, процессы, закономерности) и проблемы природопользования; Геоэкологические, экономические и социальные проблемы природопользования». Чита: Забайкальский государственный гуманитарно-педагогический университет, 2011. С. 67-69.