

На правах рукописи

ЗЕЛЕНКИНА Татьяна Савельевна

**Разнообразие и функциональная активность
метилотрофного сообщества гидротерм восточного
побережья озера Байкал**

03.00.16 – экология
03.00.07– микробиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Улан-Удэ
2009

Работа выполнена в Институте общей и экспериментальной биологии
СО РАН

Научный руководитель: кандидат биологических наук
Дагурова Ольга Павловна

Научный консультант: доктор биологических наук, профессор
Троценко Юрий Александрович

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Ивановский Руслан Николаевич

кандидат биологических наук
Матюгина Евгения Борисовна

Ведущая организация: Институт микробиологии
им. С.Н. Виноградского РАН

Защита состоится «14» мая 2009 г. в 11.00 на заседании
Диссертационного совета Д 212.022.03 в Бурятском государственном
университете по адресу: 670000, Улан-Удэ, ул. Смолина, 24а, биолого-
географический факультет, конференц-зал
Факс: (3012) 211593, E-mail: d21202203@mail.ru
tatjana-zelenkina@rambler.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеках Бурятского
научного центра СО РАН и Бурятского государственного
университета.

Автореферат разослан «14» апреля 2009 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Н.А. Шорноева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Метанотрофы и метиловобактерии – физиологически и биохимически специализированные подгруппы аэробных прокариот, использующих C_1 -субстраты в качестве источников углерода и энергии. Метанотрофы и метиловобактерии образуют биофильтр, препятствующий поступлению C_1 -соединений в окружающую среду (Гальченко, 2001). В последние полвека весьма основательно исследованы процессы метаноокисления и состав метилотрофных сообществ пресноводных, почвенных и морских экосистем (Hanson, Hanson, 1996; Doronina et al., 2000; Гальченко, 2001; Кравченко и др., 2005; Пименов и др., 2006). Менее изучены метанотрофы и метиловобактерии биотопов с высокими значениями температуры (Троценко, Хмеленина, 2008).

Термальные источники являются экстремальными экосистемами, микробные сообщества которых представляют значительный интерес, как для фундаментальных исследований, так и для практического применения (Brock et al., 1971). Ранее из термальных источников Венгрии и Японии были выделены термофильные метанотрофы и изучены их свойства (Bodrossy et al., 1995, 1997, 1999; Tsubota et al., 2005). В Байкальской рифтовой зоне активность и состав метанотрофного сообщества были исследованы эпизодически (Цыренжапова и др., 2007). Разнообразие и биология метиловобактерий в гидротермальных экосистемах до сих пор не изучались. В связи с этим актуален анализ состава и активности метилотрофного сообщества гидротерм восточного побережья озера Байкал.

Цель и задачи исследования. Цель работы – исследование разнообразия и активности аэробных метанотрофов и метиловобактерий в гидротермах восточного побережья озера Байкал. Для достижения этой цели были поставлены и решались следующие **задачи**:

1. Охарактеризовать условия среды обитания микроорганизмов;
2. Определить общую численность бактерий в грунтах гидротерм;
3. Определить скорости потребления метана в грунтах гидротерм;
4. Изучить разнообразие метилотрофных сообществ исследуемых гидротерм;
5. Выделить чистые культуры метиловобактерий и определить их филогенетическое положение.

Научная новизна. Впервые в гидротермах Бурятии исследовано разнообразие и активность аэробных метилотрофных сообществ. На основе сравнительного анализа гена *pmoA*, методом денатурирующего гель-градиент электрофореза, а также методом флуоресцентной *in situ* гибридизации установлено, что культивируемое метилотрофное сообщество представлено преимущественно метанотрофами II типа, среди которых преобладают представители рода *Methylocystis* и *Methylosinus*. Кроме того, выделены и таксономически охарактеризованы чистые культуры метиловобактерий. Установлено, что метиловобактерии изученных гидротерм относятся в основном к алкалофильным и нейтрофильным мезофилам рода *Bacillus*.

Практическая значимость. Полученные данные расширяют наши знания о таксономическом составе метилотрофных сообществ термальных экосистем и создают основу для сравнительных исследований микробных сообществ. Способность выделенных метиловобактерий использовать широкий спектр органических соединений может найти применение в биологических способах очистки вод. Результаты данной работы могут быть использованы для оценки экологического состояния гидротерм, а также в учебном процессе при изучении микробиологии и экологии водоемов.

Апробация работы. Результаты работы были представлены на X Пушинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2007); конференции «Экология в современном мире: взгляд научной молодежи» (Улан-Удэ, 2007), II Летнем симпозиуме "НОЦ "Байкал" – стратегия развития"; международной конференции молодых ученых «Современные проблемы микробиологии и биотехнологии» (Одесса, 2007), IV Верещагинской Байкальской конференции (Иркутск, 2007), молодежной конференции «Актуальные аспекты современной микробиологии» (Москва, 2008).

Публикации. По результатам исследования опубликованы 2 статьи и 7 тезисов, 2 статьи находятся в печати.

Объем и структура диссертации. Материалы диссертации изложены на 109 страницах, включая 13 таблиц и 21 рисунок. Диссертация состоит из разделов “Введение”, «Обзор литературы», «Методы исследований», «Результаты исследований и их обсуждение», “Заключение”, “Выводы” и “Список литературы”(123 наименований).

Место проведения работы. Работа выполнена в лаборатории микробиологии Института общей и экспериментальной биологии СО РАН и в лаборатории радиоактивных изотопов Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН.

Благодарности. Автор выражает глубокую благодарность научному руководителю - к.б.н. О.П. Дагуровой, научному консультанту - зав. лабораторией метилотрофии, д.б.н., проф. Ю.А. Троценко, зав. лабораторией микробиологии ИОЭБ СО РАН, д.б.н., проф. Б.Б. Намсараеву.

Автор признателен сотрудникам лаборатории метилотрофии ИБФМ РАН к.б.н Б.Ц. Ешинмаеву, д.б.н. В.Н. Хмелениной, к.б.н Н.Е. Сузиной за помощь в работе и доброжелательное отношение. Автор благодарен к.б.н. С.П. Бурюхаеву за помощь в работе, а также всем сотрудникам лаборатории микробиологии ИОЭБ СО РАН.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ 08-04-98018 и 07-04-90814 моб_ст, Программы Президиума СО РАН № 17.9, Минобразования РФ № РНП 2.1.1/2165 и НОЦ «Байкал».

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ



Рис.1. Местоположение исследованных гидротерм восточного побережья озера Байкал

Объекты исследования. Объектами исследования являлись гидротермы Змеиная, Горячинск и Сухая, расположенные на восточном побережье озера Байкал (рис.1). Выходы этих гидротерм приурочены к тектоническим разломам Байкальской рифтовой зоны. Они относятся к низкоминерализованным щелочным термам. В газовом составе гидротерм Змеиная и Горячинск преобладает азот, в гидротерме Сухая - метан.

Изученные гидротермы характеризуются наличием минеральных ручьев, изливающихся на выходах источников и впадающих в Байкал. Пробы грунтов для исследования отбирали по течению ручья каждого источника в летние периоды 2006 – 2008 гг.

Методы исследования. В местах отбора проб температуру воды измеряли с помощью сенсорного электротермометра Prima (Португалия). рН среды определяли потенциометрически при помощи полевого рН-метра рНер (Португалия). Значение общей минерализации воды определяли портативным тестер-кондуктометром TDS-4 (Сингапур). Концентрацию гидрокарбонатов и карбонатов определяли титриметрическими методами. Содержание сульфатов в воде определяли турбидиметрически, сульфидов – колориметрически (Алекин, 1973; Кузнецов, Дубинина, 1989).

Общую численность микроорганизмов в грунтах определяли путем подсчета бактерий на мембранных фильтрах (Романенко, Кузнецов, 1974) с диаметром пор 0,22 мкм («Millipore»).

Потенциальную скорость потребления метана в грунтах определяли радиоизотопным методом. В стерильные флаконы вносили по 1 см³ грунтов, заливали 2 мл среды “П” (Гальченко, 2001), разбавленной в два раза («0.5П»), и вносили ¹⁴СН₄ (0.5-2.0 мКи, В/О “Изотоп”). Флаконы инкубировали 10 суток при температуре, близкой к температуре *in situ*. Процесс останавливали добавлением 0.5 мл 10% NaOH. Дальнейшую обработку проб проводили согласно известной методике (Беляев и др., 1975; Sokolov, Trotsenko, 1995).

Численность метанотрофов определяли методом десятикратных разведений, высевая пробы грунтов в жидкую среду «0.5П», с последующей инкубацией с радиоактивно меченным метаном в течение 6-10 дней. О наличии и активности метанотрофов судили по потреблению ¹⁴СН₄.

Метанотрофные бактерии выращивали на минеральной среде «0.5 П» следующего состава (в г/л): Na₂HPO₄ – 0.3; KH₂PO₄ – 0.14; KNO₃ – 1.0; MgSO₄·7 H₂O - 0.2; CaCl₂ – 0.02; (в мг/л): ЭДТА Na₂ - 5; FeSO₄·7H₂O - 2; (в мкг/л): ZnSO₄·7H₂O - 100; MnCl₂·4H₂O - 30; CuCl₂·5H₂O - 10; CoCl₂·6H₂O - 200; NiCl₂·6 H₂O - 20; Na₂MoO₄ - 30; H₃B₃O₃ - 30; вода дистиллированная. Культуры выращивали при 29°C, 37°C и 45°C.

Культуры метанотрофов выделяли методом истощающего посева. Чистоту культур контролировали микроскопически.

Для получения накопительных культур аэробных метиловобактерий использовали среду «М» (Doronina, Darmaeva, 2003) с добавлением 0.2-0.5% NaCl, содержащую (г/л): KH_2PO_4 – 1.0; KNO_3 – 1.0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.2 и 1 мл/л раствора микроэлементов (мг): FeNH_4 -цитрат – 300; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 300; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 50; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 50; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 5; H_2O – 100 мл. После стерилизации в среды вносили 0.5% (об./об.) метанола как источник углерода и 0.05% (об./об.) дрожжевого автолизата в качестве источника витаминов. Культивирование проводили при 29°C, 37°C и 45°C в течение 1-2 недель.

ДНК экстрагировали по методу Мармура (Marmur, 1961), дальнейшую фенольную очистку ДНК проводили, как описано Маниатисом с соавт. (1984). ПЦР-амплификацию проводили на ДНК термоциклере Hybaid (Великобритания) в режиме: 1 цикл – 95°C, 2 мин; 25 циклов – 94°C, 40 с; 56°C (*pmoA*) и 60°C (16S рДНК), 40 с; 72°C, 40 с; последний цикл – 72°C, 4 мин. Полученные ПЦР-продукты гена *pmoA* разделяли в полиакриламидном геле с градиентом 35-80% на приборе Dcode, Bio-Rad (США). Нуклеотидные последовательности ПЦР-продуктов определяли на автоматическом секвенаторе CEQ 2000XL Beckman Coulter (США) с использованием набора BigDye Terminator Cycle Sequencing kit («Perkin Elmer», США), согласно инструкциям фирмы-производителя. Транслированные аминокислотные последовательности участков генов *pmoA* (460 п.н.) и 16S рРНК сравнивали с последовательностями из GenBank, используя программы NCBI BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>), для выравнивания последовательностей использовали программу Clustal W (версия 1.6). Филогенетическое дерево было построено с использованием программы Treecon W (версия 1.3).

Статистическая обработка данных произведена с помощью программы Microsoft Excel 2003.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Характеристика исследуемых гидротерм

Температура воды уменьшалась по течению ручьев гидротерм: в Змеиной – от 45°C на изливе до 19°C, в Горячинске – от 51°C на изливе до 16°C, в Сухой – от 41°C на изливе до 19°C (табл.1).

Воды гидротерм имеют щелочную реакцию. Значения рН на изливах составляли 9.0-9.4. Окислительно-восстановительный потенциал воды на изливах гидротерм характеризовался отрицательными значениями. Во всех исследованных гидротермах вниз по течению ручья значение рН уменьшалось, тогда как значение Eh увеличивалось.

Таблица 1

Места отбора проб и физико-химическая характеристика гидротерм

Гидротерма	Станция и место отбора проб	t, °C	pH	Общая минерализация, г/дм ³	Eh, мВ
Змеиная	Z1 (излив)	45	9.4	0.3	-100
	Z3 (5 м от излива)	40	8.1	0.3	-22
	Z6 (зона смешения с водами озера)	19	7.6	0.1	+32
Горячинск	G1(излив)	51	9.1	0.4	-0.63
	G4 (пруд)	19	8.0	0.3	+35
	G6 (зона смешения с водами озера)	16	7.5	0.2	+103
Сухая	C3 (излив)	41	9.0	0.6	-95
	C4 (2 м от излива)	38	8.9	0.5	-66
	C5 (пруд)	19	8.8	0.5	+137

Термальные воды являются слабоминерализованными (≤ 0.6 г/л). Минимальные концентрации минеральных солей отмечены в источнике Змеиная (0.3 г/л).

По газовому составу гидротермы Горячинск и Змеиная являются азотными термами, а гидротерма Сухая относится к метановым термам (Борисенко, Замана, 1978; Пиннекер, 1980).

В исследованных гидротермах преобладали гидрокарбонаты, максимальное содержание которых отмечено на выходе источника Сухая – 396.2 мг/дм³, минимальное – на выходе гидротермы Горячинск – 88.5 мг/дм³ (табл. 2). Преобладающее содержание гидрокарбонат-ионов характерно для сульфидных вод (Борисенко, Замана, 1978). Содержание карбонат-иона в источниках Змеиная и

Горячинск уменьшалось по течению ручья, а в гидротерме Сухая – увеличивалось.

Таблица 2

Гидрохимический состав воды гидротерм

Гидротерма	Место отбора проб	HCO_3^- , мг/дм ³	CO_3^{2-} , мг/дм ³	S^{2-} , мг/дм ³	SO_4^{2-} , мг/дм ³	CH_4 , мл/дм ³ , растворенный
Змеиная	Z1	91.5	66	45.5	59.7	0.02
	Z3	85.4	48	35.4	31.4	0.03
	Z6	61.4	24	15.8	11.3	0.05
Горячинск	G1	88.5	6	5.9	83.6	0.009
	G4	76.3	6	1.1	24.7	0.07
	G6	54.9	0	0.7	8.1	0.04
Сухая	C3	396.5	36	40.9	37.3	3.5
	C4	375.1	39	37.2	42.5	3.2
	C5	286.7	72	6.3	44.5	0.8

Во всех гидротермах отмечено присутствие растворенного сероводорода, содержание которого варьировало на разливах от 5.9 до 45.5 мг/дм³. Максимальное количество сероводорода выявлено в гидротерме Змеиная. Концентрация сульфатов в гидротермах варьировала от 37.3 до 59.7 мг/дм³. Максимальное содержание сульфатов (83.6 мг/дм³) отмечено в гидротерме Горячинск. По ручью концентрация сероводорода и сульфатов в гидротермах Змеиная и Горячинск снижалась. В гидротерме Сухая по течению ручья отмечено снижение содержания сероводорода и увеличение концентрации сульфатов.

Концентрация растворенного метана в гидротермах Горячинск и Змеиная составляла 0.009 мл/дм³ и 0.02 мл/дм³ соответственно. В гидротермах Горячинск и Змеиная по течению ручья с понижением температуры увеличивается концентрация метана, что связано с повышением растворимости CH_4 . В гидротерме Горячинск наибольшая концентрация метана отмечена на станции G4.

Грунты из гидротермы Сухая характеризовались высоким содержанием растворенного метана, которое составляло 3.5 мл/дм³ на выходе источника (на два порядка выше, чем в других гидротермах),

что обусловлено поступлением метана с вулканогенными флюидами на изливе источника. По течению ручья данного источника концентрация CH_4 уменьшалась до 0.8 мл/дм^3 , так как по руслу ручья не происходит глубинного подтока CH_4 и, вероятно, часть метана потребляется метанотрофным сообществом.

Общее содержание органического углерода в грунтах исследованных гидротерм варьировало в пределах от 0.3% до 19.6% и зависело от типа грунта. Максимальные значения (15.4 и 19.6%) были отмечены в черных илах гидротермы Сухая, минимальные (0.3 и 0.6%) – в песках станций Z6 и G6 соответственно, где происходит смешение вод источников с водами Байкала. В гидротермах Змеиная и Горячинск наблюдалось снижение содержания $\text{C}_{\text{орг}}$ по течению ручья. В гидротерме Сухая содержание $\text{C}_{\text{орг}}$ увеличивалось по изливу, что, вероятно, связано с продукционной деятельностью высших растений в пруду источника.

2. Численность микроорганизмов в грунтах исследованных гидротерм

В грунтах гидротерм была определена общая численность микроорганизмов и численность жизнеспособных микроорганизмов различных физиологических групп, входящих в гетеротрофное микробное сообщество.

Общая численность микроорганизмов в грунтах изученных источников была одного порядка (10^9 клеток в см^3). Максимальное количество бактерий было обнаружено в грунтах гидротермы Горячинск и составляло $3.7 \cdot 10^9$ клеток/ см^3 .

Примечательно, что общая численность микроорганизмов в грунтах исследованных гидротерм на порядок выше, чем в грунтах других гидротерм Байкальской рифтовой зоны, где максимальное количество бактерий достигало $7.5 \cdot 10^7$ клеток/ см^3 (Бабасанова, 2007). Полученные нами значения сопоставимы с общей численностью микроорганизмов в донных отложениях Южного Байкала (Максимова и др., 1991). По нашим данным, в донных осадках глубоководных районов озера Байкал численность бактерий достигала $1.6 \cdot 10^8$ клеток/ см^3 , что на порядок ниже их численности в гидротермах.

Определена динамика общей численности микроорганизмов в грунтах гидротерм по течению минеральных ручьев (рис. 2).

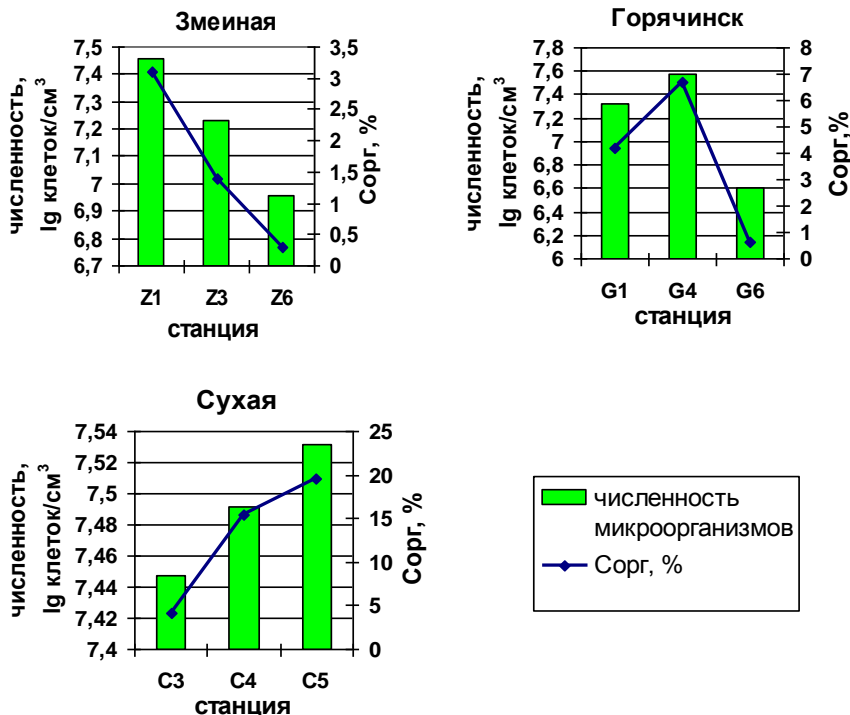


Рис.2. Изменение общей численности микроорганизмов по течению ручьев в грунтах гидротерм

Общая численность микроорганизмов во всех гидротермах коррелирует с содержанием органического вещества ($r=0.9$). В грунтах гидротермы Змеиная эти показатели снижались по течению ручья. В гидротерме Горячинск максимальная численность микроорганизмов была обнаружена на станции G4, где образуется пруд. В источнике Сухая количество микроорганизмов увеличивалось по течению ручья. Таким образом, динамика изменения численности микроорганизмов по течению ручьев изученных гидротерм была различной и зависела от литологии грунта и содержания органического вещества.

3. Потенциальная скорость потребления метана

Аэробные метанотрофы обнаружены нами во всех образцах грунтов, в большинстве из которых численность составляла 10^3 - 10^4 клеток/см³ (табл. 3). Наибольшая численность метанотрофов (10^8 клеток/см³) отмечена в источнике Сухая. Полученные значения численности метанотрофов значительно выше, чем в глубоководных осадках озера Байкал, которые составляют 10^2 - 10^3 клеток/см³ (Гайнутдинова и др., 2005).

Потенциальная скорость потребления метана в грунтах изученных источников варьировала от 0.6 до 7.7 нмоль СН₄/(см³сут) (табл. 3).

Таблица 3

Численность метанотрофных бактерий и потенциальная скорость потребления метана в грунтах гидротерм

Гидротермы	Станция	Численность метанотрофов, клеток/см ³	Потребление ¹⁴ СН ₄ , нмоль/(см ³ сут)	Ассимиляция в БЭ*, %
Змеиная	Z1	10 ³	0.84	25
	Z3	10 ³	0.83	50
	Z6	10 ⁴	1.0	60
Горячинск	G1	10 ³	0.62	33
	G4	10 ⁴	0.84	43
	G6	10 ³	0.71	37
Сухая	C3	10 ⁴	0.87	37
	C4	10 ⁸	7.73	56
	C5	10 ⁵	0.75	86

*- биомасса и экзометаболиты

Наибольшая скорость потребления метана, как и численность метанотрофов, была отмечена в гидротерме Сухая. Потребление метана было одного порядка с интенсивностью процесса в других гидротермах Бурятии (Алла, Кучигер, Сея), но превышало метаноокисление в глубоководных донных осадках озера Байкал (Гайнутдинова и др., 2005; Цыренжапова и др., 2007). В гидротермах Камчатки, характеризующихся более высокими значениями температуры (до 92°C), интенсивность потребления метана ниже (Цыренжапова и др., 2007).

При включении ¹⁴СН₄ значительная часть радиоуглерода (от 25 до 86%) переходила в биомассу клеток и внеклеточные метаболиты. В

глубоководных донных осадках озера Байкал метан в основном окислялся до CO_2 . В местах дополнительной разгрузки метана и подтока минерализованных вод, где создавались более благоприятные условия для развития метанотрофов, доля радиоуглерода в биомассе и метаболитах увеличивалась (Гайнутдинова и др., 2005). Можно заключить, что обстановка в термальных источниках довольно благоприятна для существования метанотрофов.

Исследовали динамику численности метанотрофов и потребления метана по течению ручьев гидротерм (рис. 3).

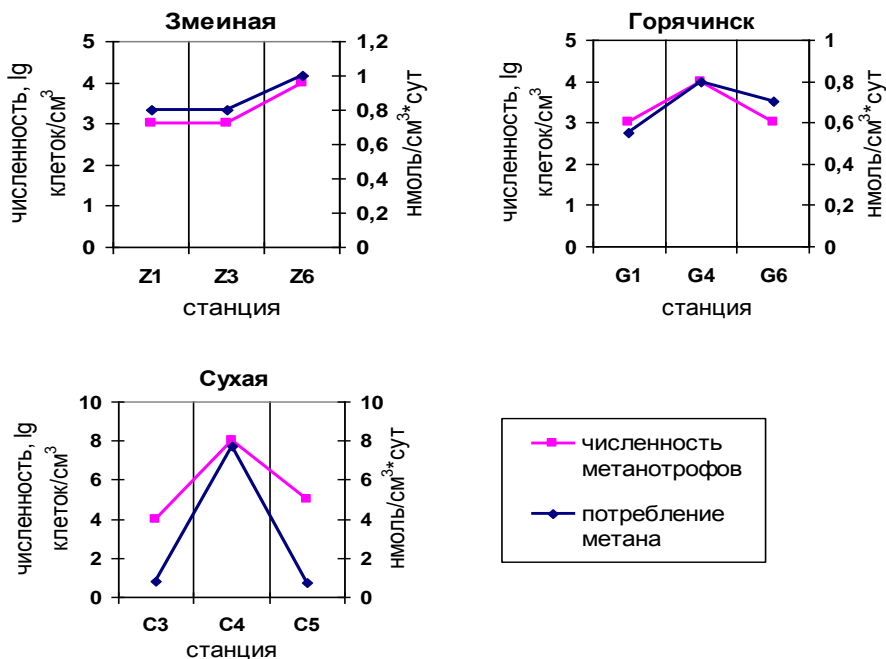


Рис. 3. Динамика численности метанотрофов и потребления метана по течению ручьев гидротерм

На изливах гидротерм Горячинск и Змеиная, где отмечены высокие температуры, наблюдали небольшие значения численности метанотрофов и потребления метана, что, вероятно, лимитируется невысокой концентрацией метана в этих точках и обусловлено низкой растворимостью метана при высоких температурах. Далее, по

течению термальных ручьев, с понижением температуры эти показатели увеличивались.

На изливе гидротермы Змеиная, где наблюдается высокая концентрация сероводорода, метанотрофное сообщество проявляет невысокую активность, а значения общей численности микроорганизмов, напротив, высоки. Численность и активность метанотрофов зависят от концентрации метана ($r = 0.9$) и сероводорода ($r = -0.8$), в отличие от общей численности микроорганизмов, которая зависит от концентрации органического вещества в грунтах ($r = 0.9$). Максимальные значения численности и активности метанотрофов наблюдались в зоне смешения с водами Байкала, где увеличивалась концентрация метана, и сероводород не оказывал ингибирующего действия.

В гидротерме Горячинск максимальная численность метанотрофов и интенсивность потребления метана были обнаружены в илах станции G4, богатых органическим веществом, где выявлена повышенная концентрация метана.

Гидротерма Сухая является метановой и характеризуется высокими концентрациями метана, а также сероводорода. Неудивительно, что на изливе гидротермы Сухая отмечены низкая численность бактерий и интенсивность потребления метана, так как рост метанотрофов подавлялся высокими уровнями CH_4 и H_2S . Максимальное количество метанотрофов и интенсивности потребления метана были обнаружены на станции С4, где образуется заводь с илом, богатым органическим веществом. Концентрация метана (3.2 мл/дм^3) оказалась оптимальной для развития метанотрофов и, хотя концентрация сероводорода оставалась довольно высокой, метанотрофное сообщество активно функционировало.

Таким образом, развитие метанотрофных сообществ гидротерм зависит от конкретной экологической обстановки. Выявлено, что на их функционирование существенное влияние оказывают концентрация CH_4 , H_2S , температура и, в первую очередь, содержание метана.

4. Культивируемые метанотрофные сообщества грунтов прибрежных гидротерм

Для характеристики метанотрофных сообществ из проб грунтов прибрежных гидротерм было выделено 9 первичных накопительных культур. Все культуры представляли собой трудноразделимые

ассоциации метанотрофов и их гетеротрофных спутников. При микроскопировании наблюдали в основном изогнутые формы.

На ультратонких срезах клеток накопительных культур выявлены периферические внутрицитоплазматические мембраны (ВЦМ), характерные для метанотрофов II морфотипа. В накопительных культурах, выделенных из источников Горячинск и Змеиная, преобладали метанотрофы II типа, близкие по ультраструктурной организации *Methylocystis echinoides* 2 (рис. 4).

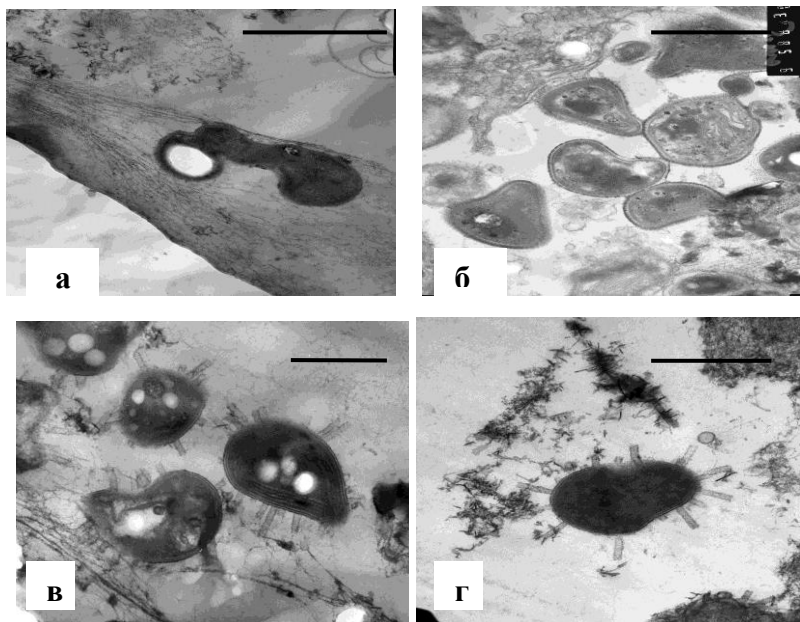


Рис.4. Ультраструктура клеток некоторых накопительных культур метанотрофов: а - С5, б - С4, в - G1, г - Z3. Длина шкалы 1 мкм.

Выделенные культуры были проанализированы на наличие генов мембрансвязанной метанмонооксигеназы. ПЦР-амплификация гена *pmoA*, кодирующего α -субъединицу мембрансвязанной метанмонооксигеназы, дала положительный результат в ДНК всех накопительных культур. Полученные ампликоны анализировали методом денатурирующего гель-градиент электрофореза (ДГГЭ).

Сравнение секвенированных продуктов с последовательностями из Genbank выявило доминирование представителей метанотрофов II типа. Построенное филогенетическое дерево транслированных аминокислотных последовательностей гена *pmoA* указывает на близость метанотрофов в накопительных культурах к родам *Methylocystis* и *Methylosinus* (рис. 5).

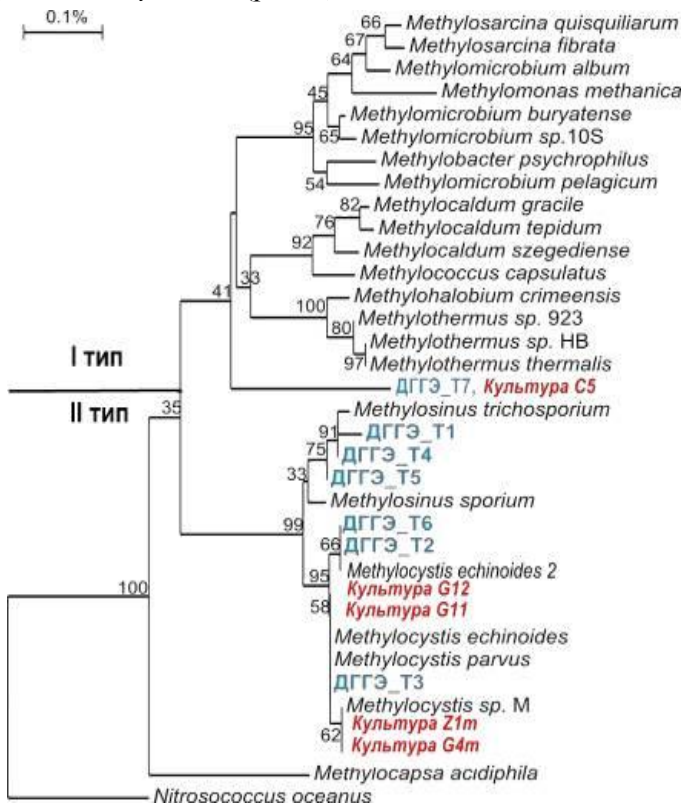


Рис.5. Филогенетическое дерево, построенное на основании транслированных аминокислотных последовательностей фрагмента гена *pmoA* монокультур метанотрофов и последовательностей, полученных для первичных накопительных культур методом ДГГЭ.

Напротив, в накопительной культуре, выделенной из источника Сухая, был обнаружен метанотроф, уровень сходства которого с

Methylococcus capsulatus Bath при сравнении 140 аминокислот составлял не более 80%, что косвенно свидетельствует о принадлежности изолята к новому таксону метанотрофов.

Гибридизация клеток из накопительных культур с флуоресцентно - меченными группоспецифичными олигонуклеотидными зондами (метод FISH) выявила в составе метанотрофных сообществ гидротерм Змеиная, Сухая и Горячинск доминирование представителей трех родов метанотрофов II типа: *Methylocystis*, *Methylosinus* и *Methylocapsa*.

Наибольший процент (до 99%) от общей численности метанотрофов II типа составляли представители рода *Methylocystis*. Меньшее количество клеток приходилось на долю метанотрофов рода *Methylosinus* (до 8%). Наименьшим количеством были представлены метанотрофы рода *Methylocapsa* (до 5%) (табл. 4).

Таблица 4

Соотношение метанотрофов в накопительных культурах, выявленных методом флуоресцентной *in situ* гибридизации

№	% клеток				
	<i>Methylosinus trichosporium</i> (зонд Msint-1268)	<i>Methylocystis</i> sp. (зонд Mcyst-1432)	<i>Methylocapsa</i> sp. (зонд Mcaps-1032)	<i>Methylocella</i> sp. (зонд Mcell-1026)	I тип (зонд M84)
Z1	0	99	1	0	0
Z6	0	0	0	0	0
C4	7	92	1	0	0
C5	5	92	1	0	2
G1	2	90	5	0	1
G6	8	65	2	0	0

Метанотрофы I типа были найдены только в двух культурах, выделенных из источников Горячинск и Сухая, где их численность не превышала 2% от общей численности метанотрофных бактерий, обнаруженных в накопительных культурах.

В дальнейшем из первичных накопительных культур удалось выделить 5 монокультур, каждая из которых состояла из одного вида метанотрофов, ассоциированного с гетеротрофными спутниками (табл. 5).

Таблица 5

Характеристика монокультур метанотрофов из грунтов гидротерм восточного побережья озера Байкал

Культуры	Источник выделения	Окраска колонии	Преобладающий морфотип	Тип метанотрофа
C5	Сухая	желтая	вибриониды	I
G11	Горячинск	розовая	бобовидные клетки	II
G12	Горячинск	розовая	округлые клетки	II
G4m	Горячинск	желтая	вибриониды	II
Z1m	Змеиный	желтая	вибриониды	II

Филогенетический анализ гена *pmoA* в ДНК четырех монокультур показал их принадлежность к роду *Methylocystis*. Одна монокультура C5, выделенная из гидротермы Сухая, отнесена к метанотрофам I типа.

Таким образом, для исследования накопительных и монокультур метанотрофов были использованы 3 различных метода молекулярной экологии (ДГГЭ, FISH, анализ гена *pmoA*). Всеми этими методами было показано преобладание во всех культурах метанотрофов II типа. Методом ДГГЭ в первичных накопительных культурах был обнаружен метанотроф I типа, в последующем идентифицированный и в монокультуре с использованием ПЦР-анализа гена *pmoA*. Состав метанотрофных сообществ, определенный методом ДГГЭ, включал бактерии родов *Methylosinus* и *Methylocystis*. Методом FISH, помимо перечисленных родов, в накопительных культурах был обнаружен род *Methylocapsa*. При анализе разнообразия монокультур метанотрофов на основании последовательностей гена *pmoA* был детектирован только род *Methylocystis*. Полученные данные позволяют судить об эффективности применения метода ДГГЭ для оценки разнообразия метанотрофного сообщества в накопительных культурах, без трудоемкого выделения чистых культур. Использование нескольких методов позволяет получить более достоверную информацию о разнообразии метанотрофных сообществ, что также было показано на примере сравнения серологических и молекулярных методов (Слободова и др., 2006).

6. Культивируемые сообщества метиловобактерий грунтов гидротерм

Из проб грунтов исследуемых источников нами выделены 6 штаммов аэробных факультативных метиловобактерий, 5 из которых представлены грамположительными подвижными спорообразующими палочками, а штамм G6 – подвижными грамположительными палочками, не образующими спор (табл. 6).

Таблица 6

Характеристика выделенных штаммов аэробных метиловобактерий

Штамм	Гидротерма	Спорообразо вание	Подвижность	Окраска по Граму
C2	Сухая	+	+	+
Z1	Змеиный	+	+	+
Z3	Змеиный	+	+	+
G1	Горячинск	+	+	+
G4b	Горячинск	+	+	+
G6	Горячинск	-	+	+

Исследование экофизиологии метиловобактерий, выделенных из гидротерм, показало, что они способны расти в диапазоне от 4°C до 54°C. Оптимальный рост наблюдался при 29°C – 37°C. Все штаммы являются мезофилами. Рост наблюдали в широком диапазоне значений pH – от 6.0 до 10.0, наиболее активный – при pH 7.5-9.0. Штаммы C2, Z1 и G1 являются алкалофильными мезофилами, штаммы Z3, G4b, G6 – нейтрофильными мезофилами. Все культуры растут при содержании NaCl от 0 до 5%, наилучший рост наблюдался при 2% NaCl. Для роста культур G1 и Z1 оптимум солености составляет 2% и 5%, соответственно.

Все изоляты способны утилизировать многие органические соединения, наиболее активно использовались углеводы группы гексоз, особенно сахароза и мальтоза. Рост отсутствовал на дульците, саркозине и глицерине. Все штаммы использовали широкий спектр трудноразлагаемых ароматических соединений, только штаммы G6 и G4b не разлагали фенол.

Филогенетический анализ 16S рДНК показал, что штаммы Z1 и Z3 наиболее близки к *Bacillus cohnii* (94 и 100% сходства соответственно), штаммы G1 и C5 отнесены к *Bacillus halodurans*

(100% сходства) (рис. 6). Известна способность представителей этого рода к метилотрофии. Наиболее детально изучен термотолерантный метилотроф *Bacillus methanolicus* (Arfman et al., 2006).

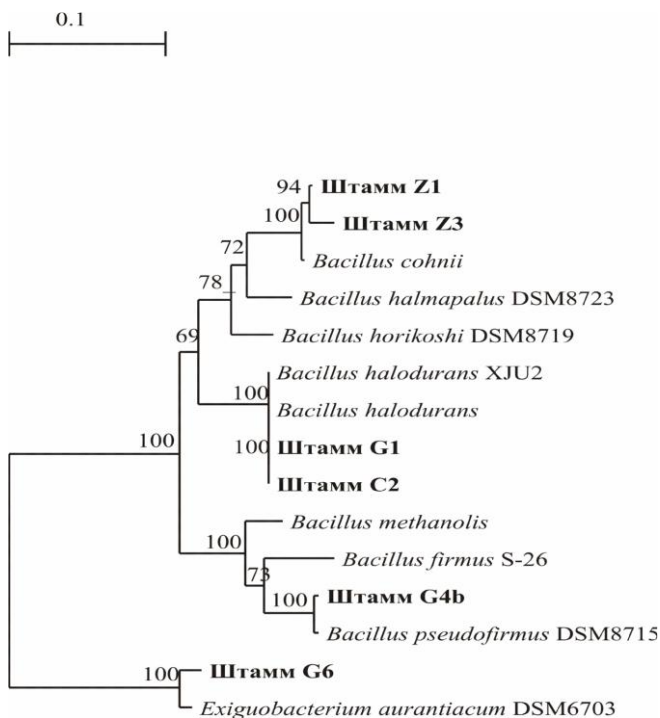


Рис. 6. Филогенетическое дерево, построенное на основании нуклеотидных последовательностей фрагментов гена 16S рРНК.

Изолят G6 был идентифицирован как *Exiguobacterium aurantiacum* (100% сходства). Важно отметить, что нами впервые установлена способность данного вида к метилотрофии.

Таким образом, выделенные из грунтов гидротерм Бурятии метиловобактерии представлены алкалофильными и нейтрофильными мезофилами и в основном относятся к роду *Bacillus*. Они являются факультативными метиловобактериями, использующими широкий спектр субстратов, что представляет интерес для биоремедиации загрязненных экосистем.

ВЫВОДЫ

1. Общая численность микроорганизмов в грунтах гидротерм восточного побережья озера Байкал колеблется от $0.4 \cdot 10^9$ до $3.7 \cdot 10^9$ клеток/см³. Численность микроорганизмов зависит от литологии грунта и содержания органического вещества.
2. В грунтах изученных гидротерм потенциальные скорости потребления метана варьируют от 0.6 до 7.7 нмоль СН₄/(см³*сут) и коррелируют с численностью метанотрофов. Наиболее интенсивное потребление метана выявлено в метановой гидротерме Сухая.
3. На функционирование метанотрофных сообществ гидротерм существенное влияние оказывают концентрация СН₄, Н₂S, температура и, в первую очередь, содержание метана.
4. Методами молекулярной экологии (ДГГЭ, FISH, анализ фрагмента гена *pmoA*) в накопительных культурах и монокультурах показано преобладание метанотрофов II типа, относящихся к родам *Methylocystis* и *Methylosinus*.
5. Выделено 6 штаммов факультативно-аэробных метиловобактерий. Выделенные метиловобактерии относятся к алкалофильным и нейтрофильным мезофилам и в основном принадлежат к роду *Bacillus*. Один штамм был идентифицирован как *Exiguobacterium aurantiacum*. Впервые установлена способность этого вида к росту на метаноле.

Список публикаций по теме диссертации:**Статьи:**

1. Зеленкина Т.С., Дагурова О.П. Общая численность микроорганизмов в донных осадках озера Байкал // Вестник БГУ. Серия 2. «Биология» - Вып.8. - Улан-Удэ, 2006. - С.88-89.
2. Зеленкина Т.С., Гайнутдинова Е.А., Дагурова О.П. Прибрежные гидротермы как геохимическая барьерная зона озера Байкал // Вестник БГУ. Серия «Химия, физика». - Вып.3. - Улан-Удэ, 2008. - С.32-36.
3. Зеленкина Т.С., Ешинимаев Б.Ц., Дагурова О.П., Намсараев Б.Б., Троценко Ю.А. Аэробные метанотрофы прибрежных гидротерм озера Байкал // Микробиология. - 2009. - Т.78. - №4 (в печати).
4. Зеленкина Т.С., Ешинимаев Б.Ц., Дагурова О.П. Аэробные метиловобактерии прибрежных гидротерм озера Байкал // Вестник БГУ. Серия «Биология» - Улан-Удэ, 2009 (в печати).

Тезисы:

1. Зеленкина Т.С., Дагурова О.П. Бактериальное окисление метана в прибрежных гидротермах озера Байкал // Тезисы конференции «Биоразнообразие экосистем внутренней Азии». Т.2. - Улан-Удэ, 2006. - С.46.
2. Зеленкина Т.С., Дагурова О.П. Распространение микроорганизмов в прибрежных гидротермах озера Байкал // Материалы X Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века». – Пущино, 2006. - С. 29-30.
3. Зеленкина Т.С., Ешинимаев Б.Ц., Дагурова О.П. Потребление метана в грунтах прибрежных гидротерм озера Байкал// Материалы конференции «Экология в современном мире: взгляд научной молодежи». - Улан-Удэ, 2007. - С.161.
4. Зеленкина Т.С., Ешинимаев Б.Ц., Разнообразие метанотрофов и метиловобактерий в грунтах прибрежных гидротерм озера Байкал. Материалы международной конференции молодых ученых «Современные проблемы микробиологии и биотехнологии». - Одесса, 2007. - С.37.
5. Зеленкина Т.С., Ешинимаев Б.Ц. Разнообразие метанотрофов и метиловобактерий в грунтах прибрежных гидротерм озера Байкал // Тезисы международной школы-конференции «Актуальные аспекты современной биологии» – Москва, ИНМИ РАН, 2007. - С.37.

6. Зеленкина Т.С, Ешинимаев Б.Ц, Дагурова О.П. Аэробные метанотрофы и метиловобактерии прибрежных гидротерм озера Байкал // Тезисы IV Верецагинской конференции. – Иркутск, 2007. - С. 15-17.
7. Зеленкина Т.С, Ешинимаев Б.Ц. Метилловобактерии в гидротермах Бурятии // Материалы IV Молодежной школа-конференции «Актуальные аспекты современной микробиологии» - Москва, ИНМИ РАН, 2008. - С.34.