ЭКОБИОТЕХ
ISSN 2618-964X http://ecobiotech-journal.ru

АЦИДОФИЛЬНЫЕ МИКРОБНЫЕ СООБЩЕСТВА ПЕЩЕРЫ ШЕКИ-КЬЕХ (СЕВЕРНЫЙ КАВКАЗ, ЧЕЧЕНСКАЯ РЕСПУБЛИКА)

Кузьмина Л.Ю.[1], Галимзянова Н.Ф.[1], Гильванова Е.А.[1], Гуватова З.Г.[2], Кудрявцева А.В.[2], Ясаков Т.Р.[1], Червяцова О.Я.[3], Мусабиров И.И.[4], Джабраилов С.-Э.М.[5], Самохин Г.В.[6], Потапов С.С.[7], Мелентьев А.И.[1]

[1] Уфимский Институт биологии УФИЦ РАН, Уфа, Россия
E-mail: ljkuz@anrb.ru
[2] Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия
[3] Государственный заповедник "Шульган-Таш", д. Иргизлы, Республика Башкортостан, Россия
[4] Институт проблем сверхпластичности металлов РАН, Уфа, Россия
[5] Чеченский государственный университет, Грозный, Россия
[6] Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского, Симферополь, Россия
[7] Южно-Уральский ФНЦ минералогии и геоэкологии УрО РАН, Миасс, Россия

Впервые в России изучен состав микробных сообществ, образующих кислые биопленки (снотиты) в пещере сернокислотного спелеогенеза Шеки-Кьех. Показано, что основу микробного сообщества составляют серокисляющие ацидофильные бактерии рода *Acidithiobacillus* (55.9%), кроме того в составе обнаружены представители бактериальных родов *Acidimicrobium*, *Saccharopolyspora*, *Ferrimicrobium*, *Methylophaga*, *Francisella*, археи порядка *Thermoplasmatales* (род *Thermogymnomonas)*, а также микроскопические грибы, принадлежащие к виду *Acidomyces acidophilus.*

Ключевые слова: ацидофильные микроорганизмы, биопленки, хемоавтотрофы, серная пещера

ACIDOPHILE MICROBIAL COMMUNITIES OF SHEKI-CHIEH CAVE (NORTH CAUCASUS, CHECHEN REPUBLIC)

Kuzmina L.Yu.[1], Galimzyanova N.F.[1], Gilvanova E.A.[1], Guvatova Z.G.[2], Kudryavtseva A.V.[2], Yasakov T.R.[1], Chervyatsova O.Ya.[3], Musabirov I.I.[4], Jabrailov S. E.M.[5], Samohin G.V.[6], Potapov S.S.[7], Melentiev A.I.[1]

[1] Ufa Institute of Biology of Ufa Research Center of RAS, Ufa, Russia
E-mail: ljkuz@anrb.ru
[2] Engelhardt Institute of Molecular Biology of RAS, Moscow, Russia
[3] State reserve Shulgan-Tash, Irgizly village, Republic of Bashkortostan, Russia
[4] Institute for Metals Superplasticity Problems of RAS, Ufa, Russia
[5] Chechen State University, Grozny, Russia
[6] V.I. Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Russia
[7] South Ural Federal Research Center of Mineralogy and Geo-ecology, Ural Brunch of RAS, Miass, Russia

For the first time in Russia, the composition of microbial communities forming acidophilic biofilms (snottites) in Sheki-Chieh cave of sulfuric-acid speleogenesis was explored. It is found that sulfur-oxidizing acidophilic bacteria belonging to genus of Acidithiobacillus comprise the main portion (55.9%) of the microbial community, other its microbial inhabitants were presented by bacteria of Acidimicrobium, Saccharopolyspora, Ferrimicrobium, Methylophaga, Francisella genera and archaea of Thermoplasmatales order (genus Thermogymnomonas) as well as microscopic fungi belonging to Acidomyces acidophilus species.

Keywords: acidophilic microorganisms, biofilms, chemoautotrophy, sulfur cave

Поступила в редакцию: 10.09.2019

DOI: 10.31163/2618-964X-2019-2-4-520-524

ВВЕДЕНИЕ

В подземных полостях, образованных при участии сернокислотного спелеогенеза (sulfuric acid speleogenesis – SAS) пещерные микроорганизмы осуществляют химические окислительно-восстановительные реакции, являясь первичными продуцентами за счет хемосинтеза. Окисление сероводорода ($H_2S + 2O_2 \rightarrow H_2SO_4$) происходит при фиксации CO_2^- хемоавтотрофными микроорганизмами, пещеры, в которых происходят такие процессы, как

правило, заселены бактериями [Sarbu et al., 1996; Jones, Macalady, 2016]. В некоторых таких пещерах на субаэральной поверхности стен развиваются слизистые, кислые (pH 0-2), биопленки – snottite (сноттит) [Johnson, 1998; Vlasceanu et al., 2000; Engel et al., 2001]. До настоящего времени интенсивное развитие хемолитотрофных микроорганизмов в виде сноттитов было описано только в некоторых пещерах Италии [Macalady et al., 2007; Jones et al., 2010, 2012; Vlasceanu et al., 2000] и Мексики [Hose 1999; Jones et al., 2012]. Впервые в 2017 году в Чеченской республике (Россия) в пещере Шеки-Хьех была выявлена стадия развития активного сернокислотного спелеогенеза, где обнаружены зоны развития сноттитов [Потапов и др., 2017].

Цель работы изучить состав и строение кислых микробных биопленок (snottite) в пещере Шеки-Хьех.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Описание района исследования. Пещера Шеки-Хьех находятся в нижнем течении реки Шаро-Аргун, правого притока р. Аргун, в Шатойском районе Чеченской республики. Пещера заложена в верхнемеловых известняках туронского или датского ярусов (K_2t-d). Пещера располагается на северном склоне Чёрного (Лесистого) хребта, её длина 137 метров. В одном из залов пещеры находится линейный рифтовый канал (фидер) с восходящим питанием сероводородных вод, которые затем проходят по единственному залу следующей пещеры Магомет-Хьех и далее выходит на поверхность.

Объектом исследований служили микробные биопленки пещеры Шеки-Хьех. Отбор проб производили в мае 2017 и 2018 годов. Кислотность сноттитов измеряли на месте с помощью прибора Hanna HI 9125.

Микроскопические исследования. Микробные биопленки изучали методами световой и сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). Для световой микроскопии использовали микроскоп Leica DM 1000 с камерой DFC-290 (Германия). При изучении методом сканирующей электронной микроскопии производили фиксацию образцов раствором глутарового альдегида (5%), при 5ºС в течение 4 часов. Препарат обезвоживали в серии разведений этилового спирта в возрастающей концентрации (10-96%), затем в смеси этилового спирта и ацетона до 100% ацетона. Сухие препараты напыляли золотом. Электронно-микроскопические исследования образцов и изучение элементного состава производили на микроскопе TESCAN Vega 3 SBH с ЭДС X-ACT Oxford Instruments.

Микробиологические посевы. Изучение численности экологических групп микроорганизмов в биопленках производили методом посева разведений на плотные и жидкие питательные среды. На плотных средах изучали бактерии - гетеротрофные (среда мясопептонный агар, МПА) и олиготрофные (голодный агар), микроскопические грибы (среда Чапека), сероокисляющие литотрофные бактерии цикла серы на следующих средах - Ваксмана при pH 4.5, Лондона (pH 7.0), Бейеринка (pH 9), денитрифицирующие при окислении соединений серы - Тейлора, ацидофильно окисляющие закись железа – Летена [Кузнецов, Дубинина, 1989]. Инкубацию посевов производили при температурах 22 и 28°С в течение 7-14 суток. Количество выросших микроорганизмов выражали в колонии образующих единицах (КОЕ) на 1 г влажного образца (КОЕ/г). Статистическую обработку результатов проводили, используя критерий Стьюдента на 5% уровне значимости.

Метагеномный анализ снottитов был проведен в соответствии с протоколом 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation (Illumina, США), рекомендованном Illumina для секвенатора MiSeq.

Для установления таксономического положения выделенного гриба применяли метод баркодинга ДНК, включающего секвенирование транскрибируемых спейсерных участков ITS1 и ITS2.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В пещере Шеки-Кьех в зале с рифтовым каналом и в частях с высокой концентрацией сероводорода в атмосфере на поверхностях полости локально обнаруживаются микробные биопленки. Стены и потолок пещеры покрыты толстой корой мелкозернистых кристаллов грязно-белого цвета, с включениями элементарной серы. Кристаллы по элементному составу и морфологии были идентифицированы как гипс ($CaSO_4 \cdot 2H_2O$) (рис. в). Между кристаллами гипса находились кислые (pH 1-1.8), коричнево-красные биопленки, развивающиеся в виде толстого слоя вязкой слизи с подвешенными каплями прозрачной жидкости (рис. а). Под действием силы тяжести микробные биопленки и капли жидкости частично отсоединялись от стен и потолков, стекая вниз на горизонтальные поверхности. Такой тип развития биопленок характерен для всех известных снottитов. Подвешенные структуры, отделяющие снottиты от известняка и гипса, позволяют поддерживать низкую кислотность (pH < 2) в биопленке необходимую для осуществления хемосинтеза [Jones et al., 2012].

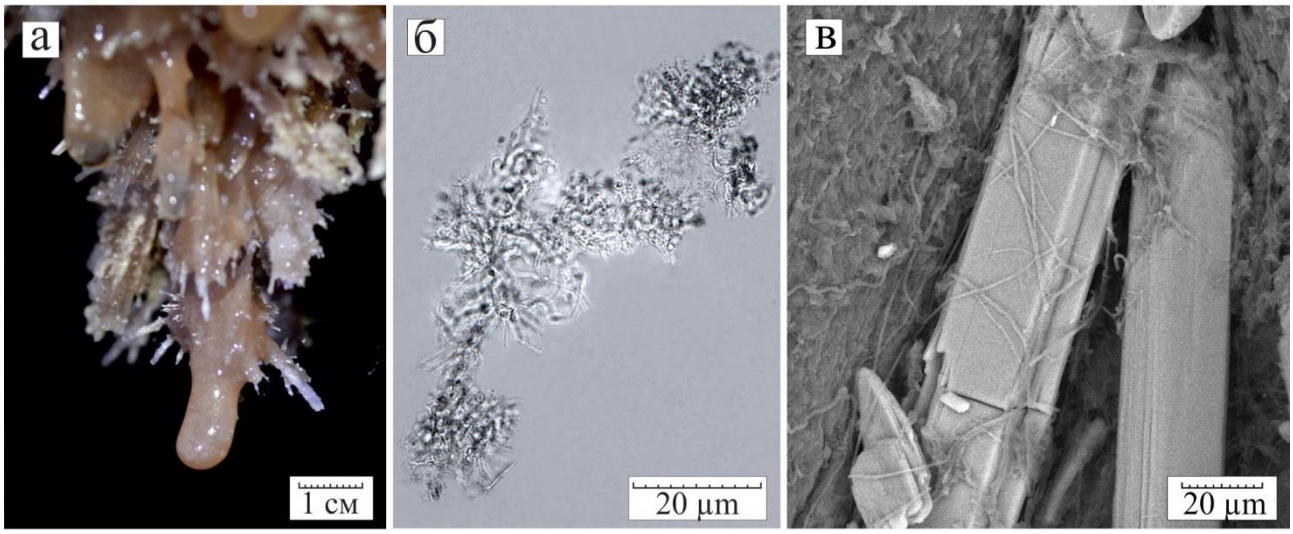

Рисунок. Ацидофильные микробные биопленки - snottite (снottиты) пещеры Шеки-Хьех (а- макросъемка (С.С. Потапов), микрофотографии биопленки: б- световая микроскопия, с - сканирующая электронная микроскопия)

Световая микроскопия микробных биопленок показала, что они состоят из тонких (до 0.5 мкм), длинных, слабо спутанных, неподвижных нитей (рис. б). СЭМ и ЭДС исследование биопленок на кристаллах выявило наличие гипса и многочисленных микробных нитей на их поверхности (рис. в).

Микробиологический анализ состава снottитов пещеры Шеки-Кьех выявил, что основную его часть ($1.7 \cdot 10^7$ КОЕ/г) составляют сероокисляющие ацидофильные бактерии, растущие в диапазоне pH < 3.5. В составе кислых биопленок также обнаружен

темноокрашенный микроскопический гриб, не образующий органов размножения на среде Чапека, численность которого составляла $2 \cdot 10^4$ КОЕ/г. На основании анализа ITS региона рДНК (ITS1-5.8-ITS2) с высокой степенью достоверности (99.26%) показано, что гриб является представителем вида *Acidomyces acidophilus* (Sidler & J.W.Carmich.) Selbmann, de Hooge & De Leo. Кроме того, в сноттитах выявлены актинобактерии (160 КОЕ/г) растущие как на богатых, так и на бедных средах (МПА и ГА), которые были выделены при нейтральном значении кислотности среды.

Результаты, полученные методами посева, были подтверждены данными метагеномного анализа. Выявлено, что основу сноттитов составляют бактерии трех видов рода *Acidithiobacillus* (55.9%), кроме того, в составе сноттитов обнаружены представители еще пяти родов бактерий *Acidimicrobium, Saccharopolyspora, Ferrimicrobium, Methylophaga, Francisella,* археи порядка *Thermoplasmatales* (род *Thermogymnomonas)*. Полученные нами результаты свидетельствуют о сложном составе биопленок, формирующихся в природных экосистемах. Исследования, проведенные в пещерах сернокислотного спелеогенеза, расположенных в географически удаленных друг от друга районах (Италия, Мексика), показали, что филогенетический состав сноттитов, формирующихся в них, сходен [Macalady et al., 2007, Jones et al., 2012, 2016]. Ключевым компонентом во всех исследованных сноттитах являлись бактерии вида *Acidithiobacillus thiooxidans.* Кроме того, в сноттитах обнаруживают темноокрашенные гифы грибов [Macalady et al., 2007]. Проведенные нами исследования также подтверждают эти выводы. Авторы, исследовавшие сноттиты предполагают, что именно бактерии рода *Acidithiobacillus* выполняют роль первичных продуцентов поскольку обладают способностью к фиксации CO_2 через пентозофосфатный цикл, получая энергию путем окисления восстановленных соединений серы [Jones et al., 2012].

Таким образом, впервые в России проведен анализ состава сноттитов пещеры Шеки-Кьех. Показано, что их микробный состав во многом сходен с изученными ранее сноттитами, развивающимися в пещерах, сернокислотного спелеогенеза, расположенных в различных частях света

При проведении исследований использовали оборудование ЦКП "Агидель" УФИЦ РАН.Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России № 075-00326-19-00 по теме № АААА-А18-118022190098.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кузнецов С.И., Дубинина Г.А. Методы изучения водных микроорганизмов. М.: Наука, 1989. 288 с.
2. Потапов С.С., Червяцова О.Я., Паршина Н.В., Ракин В.И., Леонова Л.В., Самохин Г.В., Далдаев М.А., Джабраилов С.-Э. М. К минералогии пещеры Шеки-Хьех (Шатойский район, Чеченская Республика) // Минералогия техногенеза-2017. С. 17-32.
3. Engel A.S., Porter M.L., Kinkle B.K., Kane T.C. Ecological assessment and geological significance of microbial communities from Cesspool Cave, Virginia // Geomicrobiology J. 2001. V. 18. P. 259–274.
4. Hose LD, Pisarowicz JA Cueva de Villa Luz, Tabasco, Mexico: Reconnaissance study of an active sulfur spring cave and ecosystem // J. Cave Karst Stud. 1999. 61(1). P. 13–21.

5. Johnson D.B. Biodiversity and ecology of acidophilic microorganisms // FEMS Microbiology Ecology. 1998. V. 27. P. 307–317.
6. Jones D.S, Albrecht H.L., Dawson K.S., Schaperdoth I., Freeman K.H., Pi Y., Pearson A., Macalady J.L. Community genomic analysis of an extremely acidophilic sulfur-oxidizing biofilm // Int. Society for Microbial Ecol. J. 2012. (6). P. 158–170.
7. Jones D.S., Macalady J.L. The Snotty and the Stringy: Energy for Subsurface Life in Caves Chapter 5 A Diversity of Microbial Environments, Advances in Environmental Microbiology C.J. Hurst (ed.), © Springer International Publishing Switzerland. 2016. DOI: 10.1007/978-3-319-28071-4_5
8. Macalady J.L., Jones D.S., Ezra H. Lyon Extremely acidic, pendulous cave wall biofilms from the Frasassi cave system, Italy // Environmental Microbiology. 2007. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2007.01256.x
9. Sarbu S., Kinkle B., Vlasceanu L., Kane T., Popa R. Microbiological characterization of a sulfide rich groundwater ecosystem. // Geomicrobiol J. 1994. 12(3). P. 175–182.
10. Vlasceanu L., Sabru M., Ensel A.S., Kinkle B.K. Acidic Cave-Wall Bio. lms Located in the Frasassi Gorge, Italy // Geomicrobiology J. 2000. 17. P. 125–139.