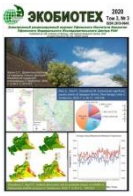
ЭКОБИОТЕХ
ISSN 2618-964X http://ecobiotech-journal.ru



# ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ПРОКАРИОТОВ В МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВАХ СКАЛЬНЫХ ПОВЕРХНОСТЕЙ ПЕЩЕРЫ ШУЛЬГАН-ТАШ (КАПОВА), ЮЖНЫЙ УРАЛ

**Галимзянова Н.Ф.*[1], Гильванова Е.А.[1], Рябова А.С.[1], Гуватова З.Г.[2], Кудрявцева А.В.[2], Мелентьев А.И.[1]**

[1] Уфимский Институт биологии Уфимского федерального исследовательского центра РАН, Уфа
[2] Институт молекулярной биологии им. Энгельгардта РАН, Москва
*E-mail: galnailya@yandex.ru

Впервые проведен метагеномный анализ видимых колоний микроорганизмов со скальных поверхностей пещеры Шульган-Таш. Прокариотические микроорганизмы в колониях представлены в основном эубактериями (90%), доля архей, также обнаруженных во всех колониях, составляет 0,06-0,19%. Бактериальный комплекс сформирован преимущественно представителями филумов *Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes, Nitrospirae, Bacteroidetes, Verrucomicrobia* и *Acidobacteria*. Виды филума *Proteobacteria* с долей от 46,5 до 80,7% доминируют во всех образцах, кроме того, во всех колониях выявлены *Actinobacteria,* составляющие 14,0 – 17,17% от общего числа видов. В двух образцах с арки зала Рисунков обнаружены некультивируемые формы аннамокс-бактерий *Candidatus* "Scalindua brodae", способные к хемолитоавтотрофии. Определено филогенетическое положение трех штаммов псевдомонад, выделенных из различных экотопов пещеры. Все они принадлежат к подгруппе *Pseudomonas mandelii*, группы *P.fluorescens*. Видовой состав изученных сообществ указывает на их высокую адаптацию к экстремальным условиям пещеры, а развитие подобных колоний в непосредственной близости от палеолитических рисунков является потенциальной угрозой сохранности древней живописи, что вызывает необходимость их постоянного мониторинга.

*Ключевые слова:* пещера, микробные биопленки, бактерии, археи, метагеномный анализ

# PHYLOGENETIC DIVERSITY OF PROKARYOTES IN MICROBIAL COMMUNITIES INHABITING ROCK SURFACES OF SHULGAN-TASH (KAPOVA) CAVE, SOUTHERN URALS

**Galimzianova N.F.*[1], Gilvanova E.A.[1], Ryabova A.S.[1], Guvatova Z.G.[2], Kudryavtseva A.V.[2], Melentiev A.I.[1]**

[1] Ufa Institute of Biology of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa
[2] Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow
*E-mail: galnailya@yandex.ru

For the first time, the metagenomic analysis of visible microbial colonies from rock beds of Shulgan-Tash cave was carried out. Prokaryotic microorganisms in these colonies are represented mainly with Eubacteria (90%); portion of Archaea that were also found in the all colonies is equal to 0.06-0.19%. Bacterial community is formed primarily by representatives belonging to *Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes, Nitrospirae, Bacteroidetes, Verrucomicrobia* and *Acidobacteria* phyla. Phylum of *Proteobacteria* is prevalent in all studied samples of colonies under proportions between 46.5-80.7%; in addition, phylum of *Actinobacteria* is also found in all colonies reaching to 14-17.17% of total species number. Non-culturable annamox bacteria belonging to *Candidatus* "Scalindua brodae" that are chemolithoautotrophic were revealed in two samples of microbial colonies inhabiting the arch in Hall of Drawings. Furthermore, three isolates of genus *Pseudomonas* from several ecotopes of the cave were identified on their phylogenetic position according to 16S rRNA gene analysis. All these belong to subgroup species *Pseudomonas mandelii* in group species of *P. fluorescens*. Species composition of explored microbial communities reflects their advanced adaptation to extreme conditions of the cave, and expansion of these colonies in a short distance from paleolithic drawings is potential treat to preservation of prehistoric painting that insist on the importance of their continuous monitoring.

*Keywords:* cave, microbial biofilms, bacteria, archaea, metagenomic analysis

*Поступила в редакцию: 19.02.2020*

DOI: 10.31163/2618-964X-2020-3-3-298-304

## ВВЕДЕНИЕ

Пещеры представляют собой специфические экстремальные экосистемы, условия которых способствуют формированию особых сообществ микроорганизмов.Эти сообщества представлены сложными многовидовыми биопленками, обеспечивающими их выживание при низкой температуре, олиготрофных условиях и других неоптимальных параметрах окружающей среды[Burmølle et al., 2014]. Видимые колонии микроорганизмов обнаружены в некоторых подземных полостях, однако для декорированных пещер развитие микроорганизмов может представлять опасность для древних рисунков [Stomeo et al.,2009]. Ранее нами в пещере Шульган-Таш было проведено картирование и морфологическое описание видимых колоний микроорганизмов, располагающихся как на первом, так и на втором этажах, в том числе и в залах с палеоживописью [Кузьмина и др., 2019].

Целью настоящей работы являлся анализ общего филогенетического разнообразия сообществ микроорганизмов, образующих видимые колонии на стенах пещеры Шульган-Таш.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Образцы микробных колоний для метагеномных и микробиологических исследований отбирали в двух повторах методом соскоба из видимых колоний, отличающихся по морфологии. Отбор производили из Ступенчатой галереи – образец №106 (серые колонии с рыхлой консистенцией), со стен Большого Западного тупика – №123 (серовато-зеленые, многочисленные), с арки зала Рисунков – №109 (кремовые творожистой консистенции), №111 (серые, плотные), №116 (желтоватые рыхлой консистенции), №120 (мелкие белые). Соскобы помещали в стерильные пробирки, которые транспортировали на холоду в термоконтейнере до места анализа.

Определение метагенома образцов видимых колоний производили, используя высокопроизводительное параллельное секвенирование на платформе HiSeq («Illumina»).В настоящее время этот метод признан, как дающий наиболее полное представление о большинстве видов, входящих в состав сообщества, в том числе и о некультивируемых формах [Tetu et al. 2013, Zepeda et al., 2016].

Гетеротрофные бактерии выделяли на мясопептонном агаре (МПА) методом предельных разведений. Культивирование изолятов проводили при 28°С. В дальнейшем из двух морфотипов микробных колоний (мелкие белые образец № 120 и серые, рыхлые № 106) отбирали по одному варианту, руководствуясь критерием доминантности выбранного морфотипа в изучаемых образцах. Идентификацию изолятов, получивших номера IB-St-B-119 и IB-St-B10, проводили на основании анализа гена 16SрРНК. Секвенирование ПЦР-амплификатов гена 16S рРНК производили на секвенаторе Avant 3150 (Applied Biosystems, США) со стандартным набором реактивов в прямом и обратном направлениях, согласно рекомендациям производителя. Сравнительный анализ последовательности 16S рРНК проводили с использованием баз данных Ribosomal Database Project (RDP) и GenBank [Tamura et al., 2004, Cole et al., 2014]. Бескорневые деревья строили методом Neighbor-Joining в программе MEGA-X [Kumar et al., 2018]. Показатель bootstrap-анализа рассчитывали из заданных 500 альтернативных деревьев [Felsenstein, 1985]. Расчет эволюционных расстояний проводили с помощью метода Maximum Composite Likelihood [Tamura et al., 2004].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как показали результаты метагеномного анализа, основу всех колоний составляли эубактерии (более 99%), наряду с которыми во всех образцах были обнаружены археи, однако их доля составляла от 0,06% (образец № 106) до 0,19% (образец № 123). В образцах 111 и 120 обнаружены вирусы, а в образцах 123, 106 – тенерикуты (*Tenericutes*), бактерии, имеющие только цитоплазматическую мембрану (микоплазмы) [Skennerton et al., 2016]. Бактериальный комплекс исследованных микробиомов образцов по полученным данным сформирован преимущественно представителями семи филумов: *Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes, Nitrospirae, Bacteroidetes, Verrucomicrobia* и *Acidobacteria*. Доминирующими филумами во всех микробиомах являются *Proteobacteria* с долей от 46,5 до 80,7%, включающие основные классы этого филума (α, β, γ, δ и ε) и *Actinobacteria*(14,0 – 17,17%). Доля остальных филумов варьирует от 1,3 до 9,7% от общего состава сообщества в разных образцах. Состав классов бактерий изученных образцов представлен на рис.1. Топ семейств бактерий, входящих в микробиомы анализируемых образцов, включает следующие таксоны: *Rhodospirillaceae* (3-12,3%), *Xanthobacteraceae* (2,7-6,8%), *Sphingomonadaceae* (2,75-9,56%), *Ectothiorhodospiraceae* (3,8-6,7%), *Hyphomicrobiaceae* (2,8-6%), *Nitrospiraceae* (0,6-16%). При сравнении качественного состава семейств и обнаруженных видов бактерий, полученного в результате метагеномного анализа всех образцов, заметен их высокий уровень ревалентности. Во всех образцах обнаружено значительное количество видов бактерий от 236 (№ 123) до 577 (№ 120), что свидетельствует о сложном многовидовом составе видимых колоний. Большинство видов имело незначительное обилие – до 2%, виды, имеющие относительно высокое обилие (2-11%) представлены следующими таксонами: *Methylonatrum kenyense*(гаммапротеобактерии), *Steroidobacter denitrificans*(гамма-протеобактерии), *Bifidobacterium bombi* (актинобактерии) и *Runella limosa* (бактероиды). В двух образцах с арки зала Рисунков выявлены некультивируемые формы – *Candidatus*"Scalindua brodae"[Schmid et al., 2003]. Эти организмы в настоящее время не выделены в чистую культуру, являются представителями филума *Planctomycetes*. Они принадлежат к группе анаммокс-бактерий – анаэробных хемолитоавтотрофных микроорганизмов, осуществляющих процесс окисления аммония нитритом с образованием молекулярного азота. Единственный валидный вид этого рода был выделен из шельфовых вод Намибии [Ножевникова и др., 2017]. Обнаруженные археи относятся к таумархеотам (*Crenarchaeota*) и являются микроорганизмами, участвующими в процессе нитрификации (лимитирующего этапа цикла азота) [Brochier-Armanet et al., 2008]. Таумархеоты растут хемолитотрофно и способны аэробно окислять аммоний до нитрита в олиготрофных условиях, при низкой температуре. *Nitrospirae* – нитрифицирующие бактерии, часто присутствующие в небольших количествах (десятых долей процента от общего состава сообщества) в большинстве почвенных микробиомов. В наших образцах бактерии семейства *Nitrospiraceae* составляют довольно существенную часть (1,45-3,74%) сообщества, которая на порядок выше их доли в обычных почвенных микробиомах, что увеличивает вероятность активного участия этих бактерий в процессе окисления аммония до нитритов и нитратов. Таким образом, обнаружены потенциальные звенья-участники этапа нитрификации в цикле азота.

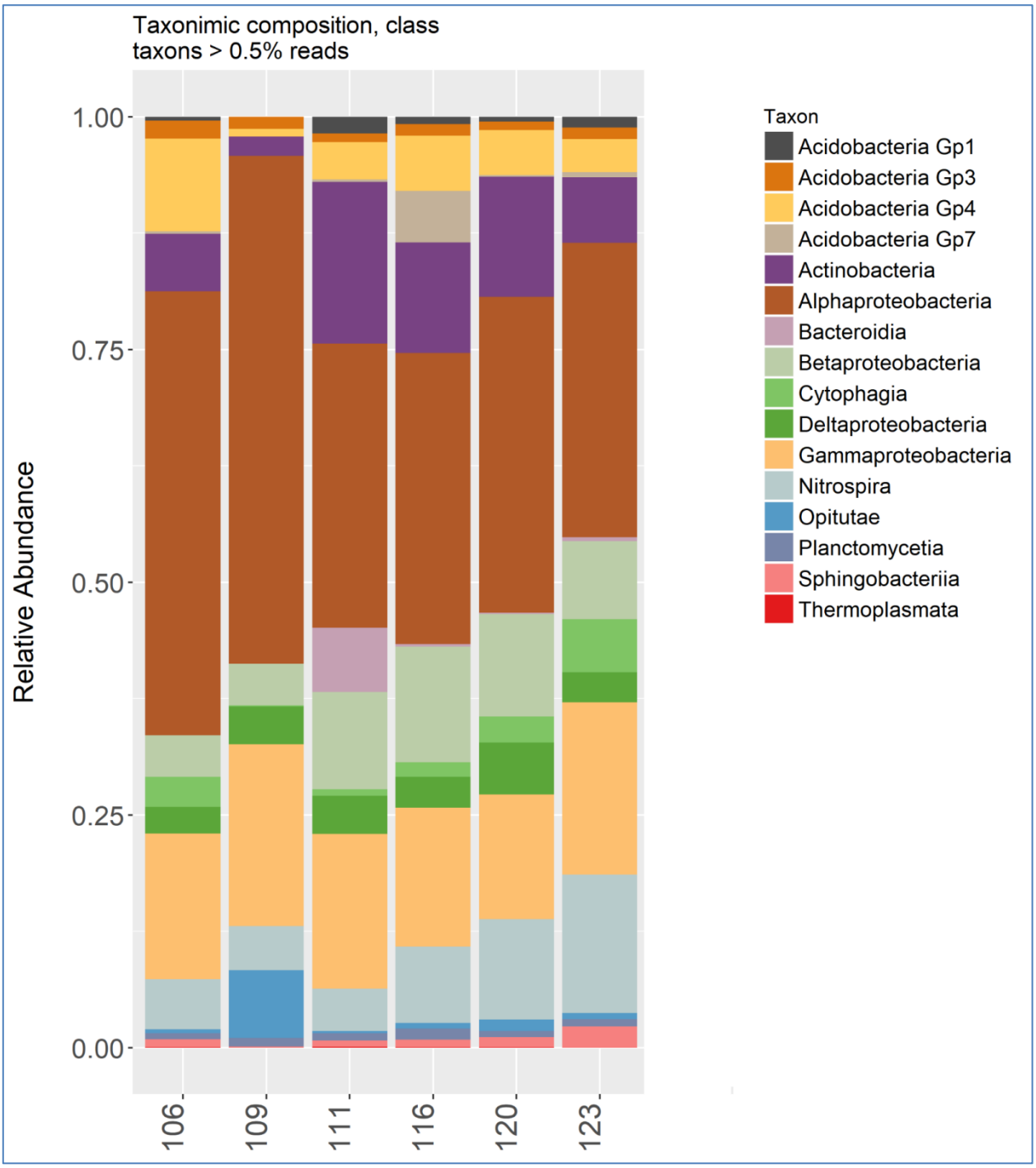



**Рис. 1. Таксономический состав прокариот по результатам метагеномного анализа микробных колоний, развивающихся на поверхности стен в пещере Шульган-Таш, относительное обилие, %. Места отбора проб и номера образцов: Ступенчатая галерея (106), арка зала Рисунков (109, 111, 116, 120), Большой Западный тупик (123).**

Интересным фактом является обнаружение в составе колоний образцов 106 (Ступенчатая галерея образец), 116 (Зал Рисунков) и 123 (Большой западный тупик) вида *Bifidobacterium bombi,* входящего в состав микробиома кишечного тракта шмелей [Killer et al., 2009]. Если в составе микробиома колоний со стен Ступенчатой галереи (№106) этот вид мог оказаться вследствие хорошей связи этой части пещеры с поверхностью, то его обнаружение в колониях стен второго этажа на сегодняшний день не имеет логичного объяснения.

Вследствие многочисленных методических трудностей полученные данные носят предварительный характер и должны быть уточнены при последующих исследованиях.

Из видимых колоний Ступенчатой галереи (образец № 106) и арки зала Рисунков (образец № 120) были выделены два штамма бактерий (IB-St-B-119 и IB-St-B10). Ранее нами из спелеотемы (субаквальные сталактоиды) был выделен также штамм *Pseudomonas*sp. IB-St-1-2a, изменяющий кислотность среды до pH 8-9 при росте в присутствии кальциевых солей органических кислот [Рябова и др., 2019]. Филогенетическое положение выделенных штаммов в указанной подгруппе и среди других ближайших псевдомонад представлено на рис.2.

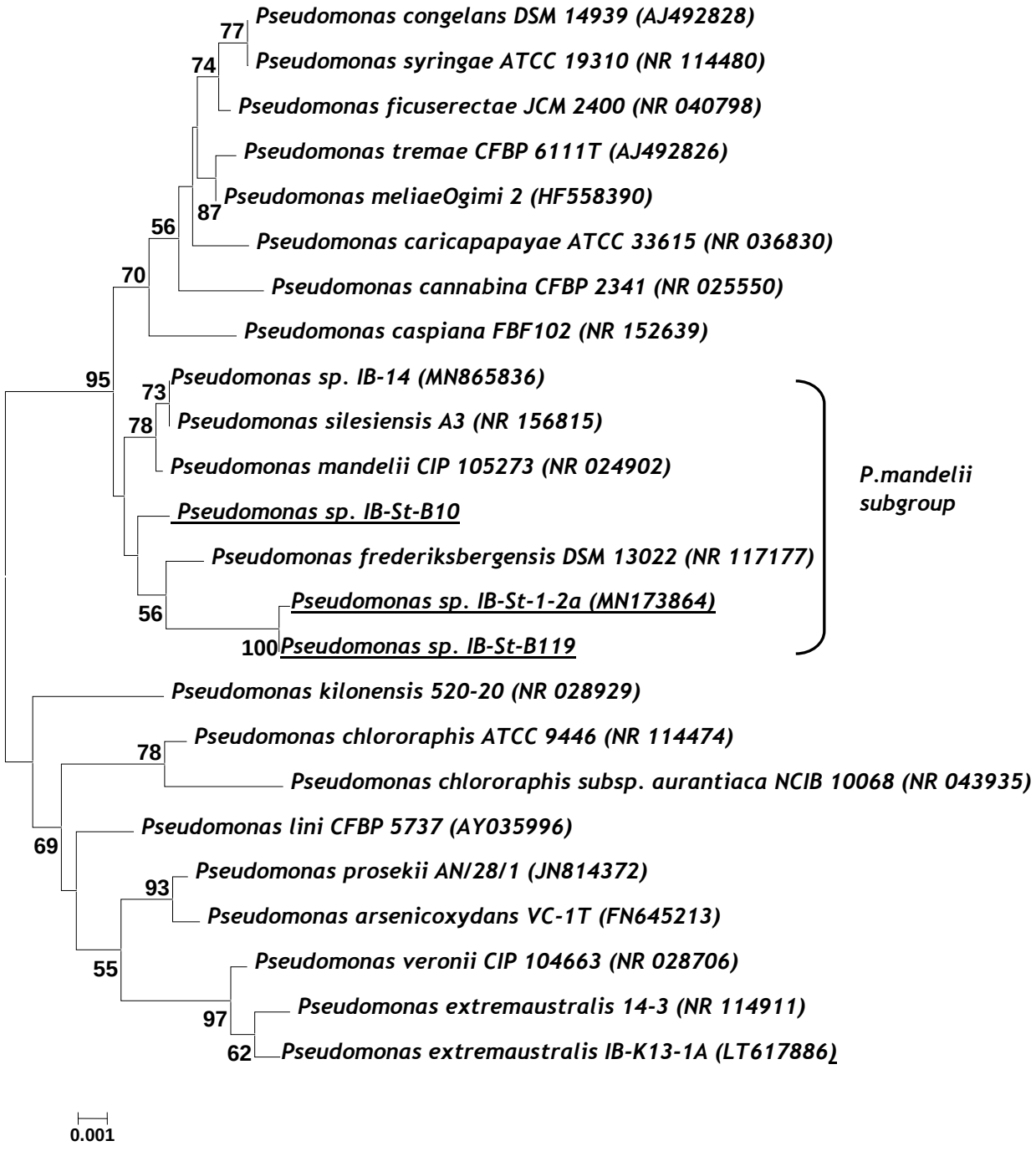



**Рис. 2. Филогенетическое дерево новых изолятов рода *Pseudomonas* (подчеркнуты), выделенных из спелеотемы и видимых микробных колоний пещеры Шульган-Таш.**

Выделенные бактерии были отнесены к представителям рода *Pseudomonas*, подгруппе *P.mandelii*, группы *P.fluorescens* с гомологией гена 16S рРНК [Mulet et al., 2010] на уровне

сходства 98,9-99,7%. Интересен тот факт, что представленные на дендрограмме штаммы IB-St-1-2a и IB-St-B-119 были выделены из разных мест пещеры, но филогенетически они объединены в один кластер с высокой степенью достоверности (100%).

Третий штамм, IB-St-B10, образующий отдельную ветвь внутри подгруппы *P.mandelii*,филогенетичсеки близок к трем типовым видам *P.mandelii* CIP 105273, *P.frederiksbergensis* DSM 13022, *P. silesiensis* с уровнем сходства последовательностей гена 16S рРНК 99,8%. Следует отметить, что при метагеномном анализе представители рода *Pseudomanas* были выявлены в половине анализируемых образцов (106, 111 и 123).

Таким образом, в результате проведенных исследований определено общее филогенетическое разнообразие бактерий из видимых микробных колоний, развивающихся на стенах различных частей пещеры. Данные метагеномного анализа микробных колоний коррелируют с результатами идентификации (на основе анализа гена 16S рРНК) бактериальных изолятов широко распространенных культивируемых видов бактерий, относящихся к родам *Pseudomonas, Streptomyces, Rhodococcus*.

Впервые для пещеры Шульган-Таш был выполнен метагеномный анализ некоторых видимых колоний микроорганизмов (Ступенчатая галерея, Большой Западный тупик, арка зала Рисунков). В результате анализа показано, что они представляют собой сложные сообщества из 250-570 видов, включающие бактерии, археи (в том числе хемолитоавтотрофные), ряд некультивируемых форм, а также, как было показано ранее, микроскопические грибы [Кузьмина и др., 2019]. Видовой состав таких сообществ указывает на их высокую адаптированность к экстремальным условиям пещеры (отсутствие света, постоянная низкая температура, олиготрофность). Как показали эксперименты *in vitro* и *in situ*, микроорганизмы способны развиваться за счет крайне низких концентраций органических веществ, содержащихся в инфильтрационной воде, проникающей в полость, а также образовывать биопленки, включающие в себя не только бактерии, но и микроскопические грибы [Галимзянова и др., 2019]. Развитие колоний микроорганизмов в непосредственной близости от палеолитических рисунков является потенциальной угрозой их сохранности, что вызывает необходимость постоянного мониторинга их развития.

При проведении исследований использовали оборудование ЦКП "Агидель" УФИЦРАН. Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России № 075-00326-19-00 по теме № АААА-А18-118022190098 при частичной финансовой поддержке гранта РФФИ-17-44-020091 р_а.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Галимзянова Н.Ф., Кузьмина Л.Ю., Рябова А.С., Актуганов Г.Э., Гильванова Е.А., Бойко Т.Ф., Мелентьев А.И. Развитие микроскопических грибов при культивировании в инфильтрационной воде пещеры Шульган-Таш// Экобиотех. 2019. Т.3. №3. С. 219-222. DOI: 10.31163/2618-964X-2019-2-3-219-222
2. Кузьмина Л. Ю., Галимзянова Н. Ф., Червяцова О.Я., Сайфуллина Н.М., Капралов С.А., Рябова А.С. Биогенные обрастания в пещере Шульган-Таш (Капова, Южный Урал) и факторы, влияющие на их распространение // Экобиотех. 2019. Т. 2. № 2. С. 128-142. DOI: 10.31163/2618-964X-2019-2-2-128-142
3. Ножевникова А.Н. Аннамокс-бактерии в природе и экобиотехнологии: коллективная монография / А.Н. Ножевникова, Ю.В. Литти, Е.А. Бочкова, Г.М. Зубов, М.Г. Зубов. М.: Университетская книга, 2017. 280 с.

4. Рябова А.С., Червяцова О.Я., Леонова Л.В., Ясаков Т.Р., Галимзянова Н.Ф, Кузьмина Л.Ю.Штаммы бактерий, выделенные из спелеотемы пещеры Шульган-Таш (Каповой, Южный Урал), способные к отложению минералов карбоната кальция //Экобиотех. 2019. Т. 2. № 4. С. 406-409. DOI: 10.31163/2618-964X-2019-2-4-406-409
5. Brochier-Armanet C., Boussau B., Gribaldo S., Forterre P. Mesophilic *Crenarchaeota*: proposal for a third archaeal phylum, the *Thaumarchaeota*. Nature Reviews Microbiology. 2008. V.6 (3). P. 245–52.DOI: 10.1038/nrmicro1852
6. Burmølle M., Ren D., Bjarnsholt T., Sørensen S. J. Interactions in multispecies biofilms: do they actually matter? // Trends in Microbiology. 2014. Vol. 22 (2). P. 84-91. DOI: 10.1016/j.tim.2013.12.004.
7. Cole J. R. Q., Wang J.A., Fish B., Chai D.M. , McGarrell Y., Sun C.T., Brown A. ,Porras-Alfaro C.R., Kuske J.M., Tiedje. Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. Nucleic Acids Research. 2014. V. 42. P. 633–642.
8. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. Evolution. 1985. V. 39. P. 783-791.
9. Killer J., Kopecny J., Mrazek J., Rada V., Benada O., Koppova I., Havlik J., Straka J. "*Bifidobacterium bombi* sp. nov., from the bumblebee digestive tract // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2009. V. 59. P.2020-2024.
10. Mulet M., Lalucat J., García-Valdés E. DNA sequence-based analysis of the *Pseudomonas* species. // Environ. Microbiol. 2010. V. 12 (6). P. 1513–1530.
11. Schmid M.., Walsh K., Webb R., Rijpstra W.I., van de Pas-Schoonen K., Verbruggen M.J., Hill T., Moffett B., Fuerst J., Schouten S., Damsté J.S., Harris J., Shaw P., Jetten M, Strous M. *Candidatus* "Scalindua brodae", sp. nov., Candidatus "Scalinduawagneri", sp. nov., two new species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria// Syst.Appl.Microbiol. 2003. 26 (4). P.529 538. DOI: 10.1078/072320203770865837
12. Stomeo F., Portillo M.C., Gonzalez J. M. Assessment of Bacterial and Fungal Growth on Natural Substrates: Consequences for Preserving Caves with Prehistoric Paintings// Curr.Microbiol. 2009. V. 59. P. 321–325.
13. Tetu S.G., Breakwell K., Elbour ne L.D.H, Holmes A.J., Gillings M.R., Paulsen I.T. Life in the dark: metagenomic evidence that a microbial slime community is driven by inorganic nitrogen metabolism // The ISME Journal.2013. V. 7. P. 1227–1236.
14. Zepeda Mendoza M.L., Lundberg J., Ivarsson M., Campos P., Nylander J.A.A., Sallstedt T. Metagenomic Analysis from the Interior of a Speleothem in Tjuv-Ante's Cave, Northern Sweden //PLoS ONE.2016. V. 11 (3): e0151577. DOI: 10.1371/journal.pone.0151577