

УДК 579.8

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ АНАЛИЗ БИОРАЗНООБРАЗИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ В ИСТОЧНИКЕ ЗАВАРЗИНА, КАЛЬДЕРА УЗОН, КАМЧАТКА

© 2011 г. В. М. Гумеров*, А. В. Марданов*, А. В. Белецкий*, Е. А. Бонч-Осмоловская**, Н. В. Равин*,¹

* Центр “Биоинженерия” РАН, Москва

** Учреждение Российской академии наук Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН, Москва

Поступила в редакцию 16.11.2010 г.

Источник Заварзина, расположенный в кальдере вулкана Узон, Камчатка, характеризуется температурой около 60°C, нейтральным pH и высоким содержанием серы. Дно источника покрыто цианобактериальным матом. Структура микробного сообщества воды источника Заварзина была качественно и количественно охарактеризована с помощью пиросеквенирования варибельного участка V3 гена 16S рНК, в результате которого было определено 37654 независимых последовательностей. Микробное сообщество включает около 900 родов бактерий и 89 родов архей. Бактерии составляли около 95% микроорганизмов, на долю архей приходилось менее 5%. Наибольшую долю в сообществе (32.3%) составляли хемолитоавтотрофные бактерии *Aquificae*, родов *Sulfurihydrogenibium* и *Thermosulfidibacter*. Также среди автотрофных микроорганизмов идентифицированы представители *Thermodesulfobacteria* (7.3%), гамма-протеобактерии *Thiofaba* (7.6%), дельта-протеобактерии *Desulfurella* (2.6%), и бета-протеобактерии *Thiomonas* (0.6%). Гетеротрофные бактерии представлены *Calditerrivibrio* (12.1%), *Thermotogae* (6.3%), бета-протеобактериями *Tepidimonas* (6.0%), *Deinococcus-Thermus* (4.4%), *Caldiserica* (1.7%) и *Dictyoglomi* (1.6%). Около 1.9% микроорганизмов относились к типу BRC1, не имеющему культивируемых представителей. Около 0.2% бактерий образуют новую филогенетическую ветвь уровня типа, представители которого были обнаружены только в источнике Заварзина. Среди архей были обнаружены представители всех четырех типов — *Euryarchaeota* (42% архейных последовательностей), *Crenarchaeota* (50%), *Korarchaeota* (7.5%) и *Nanoarchaeota* (0.5%). Таким образом, в источнике Заварзина, помимо фотосинтеза, осуществляемого цианобактериальным матом, покрывающим дно источника, может идти хемолитоавтотрофная продукция органического вещества: в аэробных условиях — за счет окисления серы и ее восстановленных соединений, а в анаэробной зоне — за счет окисления водорода с использованием серы и сульфатов в качестве акцепторов электронов. Образующая автотрофами органика может использоваться разнообразными органотрофными микроорганизмами, в число которых входят как бактерии-броуильщики, так и организмы, осуществляющие анаэробное дыхание с использованием серы или нитрата в качестве акцептора электронов.

Ключевые слова: термофилы, биоразнообразие, пиросеквенирование, 16S рНК, молекулярные методы, источник Заварзина.

Исследование микробных сообществ, ассоциированных с высокотемпературными экологическими нишами, представляет интерес как для фундаментальной микробиологии, в том числе эволюционной, поскольку многие обитающие в этих условиях микроорганизмы относятся к эволюционно древним ветвям термофильных бактерий и архей, так и для решения биотехнологических задач.

Большое число новых термофильных бактерий и архей, в том числе представляющих обособленные филогенетические группы и характеризующихся различными типами метаболизма, было выделено в течение последних 30 лет из термальных источников Камчатки [см. обзоры 1–3]. Однако по сравнению с Йеллоустонским парком США и Исландией, биоразнообразие термофильных микроорганизмов Камчатки изучено значительно менее глубоко. Ис-

точник Заварзина, расположенный на Восточном термальном поле кальдеры вулкана Узон (Кроноцкий государственный природный биосферный заповедник), представляет собой мелкий бассейн размером 4.5 × 2.3 м², наполняемый многочисленными термальными выходами, благодаря которым вода в источнике активно перемешивается. В менее горячих участках, расположенных по краям, дно источника покрыто цианобактериальным матом толщиной несколько миллиметров. Вода имеет умеренно высокую температуру (55–58°C), нейтральный pH (6.3) и высокое содержание взвешенной серы [4]. Содержание отдельных ионов в ней составляет: SO₄²⁻ — 0.355 мМ; NO₃⁻ — 0.5 мМ; NH₄⁺ — 0.84 мМ. Концентрации газов, растворенных в воде источника, составляют: метан — 24 мкМ; водород — 6.47 мкМ; сероводород — 0.12 мкМ (<http://kamchatka.gly.uga.edu/index.php>).

¹ Автор для корреспонденции (e-mail: nravin@biengi.ac.ru).

Традиционно, для характеристики состава микробных сообществ используются микробиологические методы, предполагающие получение чистых культур микроорганизмов с последующей микробиологической и биохимической характеристикой. Позднее стали применяться не требующие культивирования микроорганизмов молекулярные методы, основанные на ПЦР-амплификации фрагментов генов 16S рРНК и их секвенировании. Применение молекулярных методов показало, что в большинстве сообществ, особенно сообществ экстремальных местообитаний, не более 0.1–1% видов микроорганизмов удается культивировать в лабораторных условиях. Эти работы позволили выявить новые филогенетические группы прокариот, в том числе, таксоны высокого уровня, для многих из которых до настоящего времени не получено культивируемых представителей.

Применявшиеся до последнего времени в работах в области экологии микроорганизмов молекулярные методы предполагали клонирование фрагментов генов 16S рРНК и независимое секвенирование отдельных клонов с помощью капиллярного электрофореза, что на практике позволяло проанализировать не более нескольких десятков-сотен последовательностей 16S рРНК. В то же время многие микробные сообщества имеют более сложный состав, насчитывая тысячи различных видов бактерий и архей. Альтернативой традиционным методам секвенирования является метод пиросеквенирования, дающий возможность проведения единовременного определения не нескольких десятков, а нескольких сот тысяч нуклеотидных последовательностей [5]. Применение методов пиросеквенирования позволяет проводить “глубокую” характеристику микробного сообщества, выявляя не только доминирующие микроорганизмы, но и минорные компоненты сообщества, которые, однако, могут играть важную экологическую роль. Появляется возможность достоверного количественного определения долей отдельных групп микроорганизмов, что необходимо для реконструкции метаболических путей сообщества в целом.

Цель данной работы – с помощью пиросеквенирования фрагментов генов 16S рРНК проанализировать состав микробного сообщества воды источника Заварзина.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Отбор биоматериала. Пробы воды источника Заварзина (GPS координаты N54 29.883 E160 00.874) были отобраны в августе 2008 г. Отбор воды проводили в поверхностном слое, чтобы исключить попадание в пробу донных отложений, покрытых цианобактериальным матом. Отобранные образцы (50 мл) фиксировали внесением формальдегида до 5%.

ПЦР-амплификация и секвенирование. Препараты метагеномной ДНК микроорганизмов выделяли методом, разработанным в Центре “Биоинженерия” РАН для образцов почвы [6]. Для ПЦР-амплификации фрагмента гена 16S рРНК, включающего переменный участок V3, использовали “универсальные” праймеры U341F (5'-CCTACGGGGRSG-CAGCAG) и U515R (5'-TTACCGCGGCKGCTGV-CAC). ПЦР проводили в объеме 50 мкл, содержащем 2.5 единицы *Taq*-полимеразы, 0.2 mM MgCl₂, по 0.1 mM каждого дезоксинуклеотид трифосфата и по 1 mM каждого праймера. Реакцию проводили на амплификаторе Eppendorf Mastercycler (“Eppendorf”, Германия) по следующей программе: начальная денатурация в течение 1 мин при 96°C, затем 30 циклов ПЦР (96°C – 40 с, 50°C – 40 с, 72°C – 1 мин), финальная элонгация в течение 5 мин при 72°C.

ПЦР-фрагмент очищали с помощью электрофореза в агарозном геле.

Пиросеквенирование полученного ПЦР-фрагмента осуществляли по протоколу “shotgun library” (“Roche”) с использованием набора GS LR70 Sequencing Kit. В результате пиросеквенирования было определено 37654 последовательности.

Анализ разнообразия и таксономического состава сообщества. Анализ данных проводили с помощью пакета программ RDP Classifier [7]. На первом этапе полученные последовательности разделяли на бактериальные и архейные с помощью доступного на сайте (<http://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp>) классификатора RDP Naive Bayesian rRNA Classifier Version 2.0. В дальнейшем “бактериальные” и “архейные” последовательности анализировали отдельно.

Для определения разнообразия сообщества и характеристики его таксономического состава использовали Pyrosequencing pipeline (<http://pyro.cme.msu.edu/>), входящую в состав RDP Classifier program package [7]. Для этого проводили выравнивание полученных последовательностей и кластерный анализ с использованием программы Complete Linkage Clustering, входящей в состав RDP Classifier. Кластеризацию проводили на разных уровнях, характеризующихся различными расстояниями между кластерами (от 0 до 0.3, с шагом 0.01) и, следовательно, соответствующих разным таксономическим уровням.

Оценку таксономической сложности сообщества проводили с помощью программы Rarefaction, входящей в состав пакета RDP Classifier, анализируя графики, иллюстрирующие зависимость числа детектированных флотипов (т.е. числа кластеров) от числа проанализированных последовательностей для различных кластерных расстояний. Оценку биоразнообразия также проводили, рассчитывая с помощью RDP Classifier индекс Chao1 [8].

Для характеристики таксономического состава сообщества для каждого кластера с помощью про-

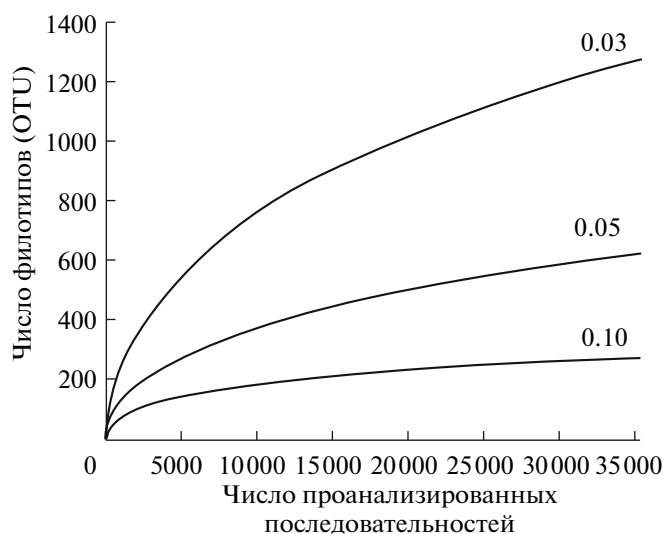


Рис. 1. Оценка разнообразия бактерий микробного сообщества источника Заварзина. Показана зависимость числа фило-типов разного уровня (кластерные расстояния 0.03, 0.05 и 0.1) от числа анализируемых последовательностей V3 районов 16S рРНК.

граммы Dereplicate Request (RDP Classifier) выбирали репрезентативную нуклеотидную последовательность, соответствующую “центру” кластера, т.е. имеющую минимальную сумму квадратов расстояний до других входящих в кластер последовательностей. Такая выборка была сделана для кластеров, полученных при проведении кластерного анализа с параметром расстояния 0.2.

Таксономическую идентификацию представляющих кластер репрезентативных последовательностей проводили в результате их сравнения с базой данных нуклеотидных последовательностей 16S рРНК в GenBank по протоколу BLASTN. При обнаружении последовательности 16S рРНК валидированного микроорганизма, гомологичной анализируемой более чем на 97%, кластер относили к соответствующему роду. При отсутствии такого гомолога таксономическое положение кластера определяли в результате построения филогенетического дерева, включающего репрезентативную последовательность кластера и выборку последовательностей 16S рРНК бактерий или архей. Выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили с помощью программы Clustal X [9]. Филогенетические деревья строили методом neighbour-joining с использованием программы Treeson [10]. Достоверность филогенетических деревьев оценивали методом бутстрапа.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка разнообразия бактерий и архей микробного сообщества источника Заварзина. В результате пиросеквенирования V3 района гена 16S рРНК было определено 37654 последовательности. С помощью

классификатора RDP Naive Bayesian rRNA Classifier Version 2.0 к бактериальным 16S рРНК было отнесено 35702 последовательности, к архейным — 1666, а 286 последовательности не имели гомологии с 16S рРНК и были исключены из анализа. Таким образом, археи составляют лишь около 4.5% микроорганизмов сообщества “Заварзин”. Преобладание бактерий также характерно для нейтральных и слабо-щелочных источников с умеренно-высокой температурой (50–80°C) Йеллоустонского парка [11]; археи могут являться доминирующим компонентом наиболее “экстремальных” местообитаний с высокими температурами (выше 80°C) и/или высокой кислотностью [напр., 12].

Оценку таксономической сложности сообщества проводили, рассчитывая индекс Chao1, а также с помощью построения кривых Rarefaction, иллюстрирующих зависимость числа детектированных фило-типов (т.е. числа кластеров) от числа проанализированных последовательностей для различных уровней сходства нуклеотидных последовательностей. Chao1 индекс разнообразия бактериального сообщества составляет 1816 на уровне вида (кластерное расстояние 0.03) и 877 на уровне рода (кластерное расстояние 0.05). Представленные на рис. 1 кривые показывают, что даже достигнутый в настоящей работе объем секвенирования недостаточен для полной характеристики разнообразия сообщества, поскольку при увеличении числа анализируемых последовательностей кривая rarefaction не выходит на плато, по крайней мере, на уровне вида и рода. Наблюдаемое разнообразие бактерий источника Заварзина сопоставимо с оценками сложности бактериальных сообществ морских гидротерм [5] и почвы [13] и в несколько раз превышает значения, определенные в работе [14] для щелочных термальных источников Йеллоустонского парка. Археи составляют меньшую часть сообщества и менее разнообразны — значение индекса Chao1 составляет 167 на уровне вида и 89 — на уровне рода.

Состав бактериального сообщества характеризовали в результате таксономической классификации “репрезентативных” последовательностей кластеров (табл. 1). Примерно половина последовательностей имела гомологию на уровне выше 97% с 16S рРНК культивируемых микроорганизмов; в этом случае кластер относили к соответствующему роду. При отсутствии такого гомолога таксономическую классификацию проводили в результате построения филогенетического дерева, включающего выборку последовательностей 16S рРНК бактерий.

Наибольшую долю в сообществе (32.3% всех последовательностей 16S рРНК микроорганизмов) составляли представители типа *Aquificae* (рис. 2), относящиеся к двум родам — *Sulfurihydrogenibium* (21.6%) и *Thermosulfidibacter* (10.7%), табл. 1. *Aquificae* обычно доминируют в высокотемпературных источниках с нейтральным рН, что было показано, например, для

Таблица 1. Состав бактериального сообщества источника Заварзина

Тип	Число последовательностей	Доля (%)*	Ближайший гомолог по 16S рРНК**	Идентичность (%)
<i>Aquificae</i>	8076	21.61	<i>Sulfurihydrogenibium</i> sp. UZ3-5	98
	3894	10.42	<i>Thermosulfidibacter takaii</i>	96
	90	0.24	<i>Thermosulfidibacter takaii</i>	96
<i>Deferribacteres</i>	3003	8.04	<i>Calditerrivibrio nitroreducens</i>	98
	1535	4.11	<i>Calditerrivibrio nitroreducens</i>	96
<i>Gamma proteobacteria</i>	1954	5.23	<i>Thiofaba tepidiphila</i>	99
	876	2.34	<i>Thiofaba tepidiphila</i>	98
	998	2.67	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	99
	200	0.54	<i>Yersinia kristensenii</i>	98
	77	0.21	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	96
<i>Thermodesulfobacteria</i>	1802	4.82	<i>Caldimicrobium rimae</i>	99
	936	2.50	<i>Caldimicrobium rimae</i>	96
<i>Beta proteobacteria</i>	2243	6.00	<i>Tepidimonas</i> sp. AA2	98
	212	0.57	<i>Thiomonas</i> sp. ML2-96	96
<i>Thermotogae</i>	2343	6.27	<i>Fervidobacterium</i> sp. CBS-4	99
<i>Deinococcus-Thermus</i>	1627	4.35	<i>Thermus</i> sp. BXW	98
<i>Delta proteobacteria</i>	982	2.63	<i>Desulfurella multipotens</i>	98
	142	0.38	<i>Desulfobulbus mediterraneus</i>	90
BRC1	719	1.92	Uncultured bacterium clone ZB_P13_D08	97
<i>Caldiserica</i>	643	1.72	<i>Caldisericum exile</i>	97
<i>Dictyoglomi</i>	616	1.65	<i>Dictyoglomus</i> sp. 1512	99
New lineage	389	1.04	<i>Hydrogenivirga caldilitoris</i> strain IBSK3	84
<i>Verrucomicrobia</i>	379	1.01	Bacterium Ellin5102	84

* от всех микроорганизмов;

** указан ближайший культивируемый организм (кроме типа BRC1).

Йеллоустонского парка, причем их относительная доля возрастает с ростом температуры, достигая в некоторых источниках более 90% [15]. В частности, *Sulfurihydrogenibium* обычно встречаются в нейтральных источниках с температурой до 75°C [16]. Это микроаэрофильные микроорганизмы, среди которых встречаются как облигатные хемолитоавтотрофы, окисляющие серу и ее соединения с использованием кислорода в качестве акцептора электронов, так и факультативные гетеротрофы [17]. В отличие от них представители *Thermosulfidibacter* являются анаэробами, окисляющими водород за счет восстановления серы [18].

Представители филума *Thermodesulfobacteria* (род *Caldimicrobium*) составляют около 7.3% микробного сообщества. Представитель этого рода, *Caldimicrobium rimae*, выделенный из источника “Трещинный” кальдеры Узон, является литоавтотрофом, фиксирующим CO₂ и окисляющим водород с использованием серы или тиосульфата в качестве акцептора элек-

тронов [19]. Аналогичный тип метаболизма характерен для бета-протеобактерий рода *Thiomonas* [напр., 20], доля которых составляет 0.6%.

К хемолитоавтотрофам относятся также гамма-протеобактерии рода *Thiofaba*, составляющие 7.6% всех микроорганизмов. Эти аэробные бактерии фиксируют CO₂, окисляя серу и ее восстановленные соединения [21]. Около 6.0% составляют бета-протеобактерии рода *Tepidimonas*, представители которого являются умеренно термофильными аэробными хемолитогетеротрофами, получающими энергию за счет окисления тиосульфата и других соединений серы до сульфата [22].

Около 2.6% составляют дельта-протеобактерии рода *Desulfurella*, первый представитель которого, *Desulfurella acetivorans*, был выделен из циано-бактериального мата источника Заварзина более 20 лет назад [4]. *Desulfurella* spp. могут расти литоавтотрофно с молекулярным водородом и серой, а также

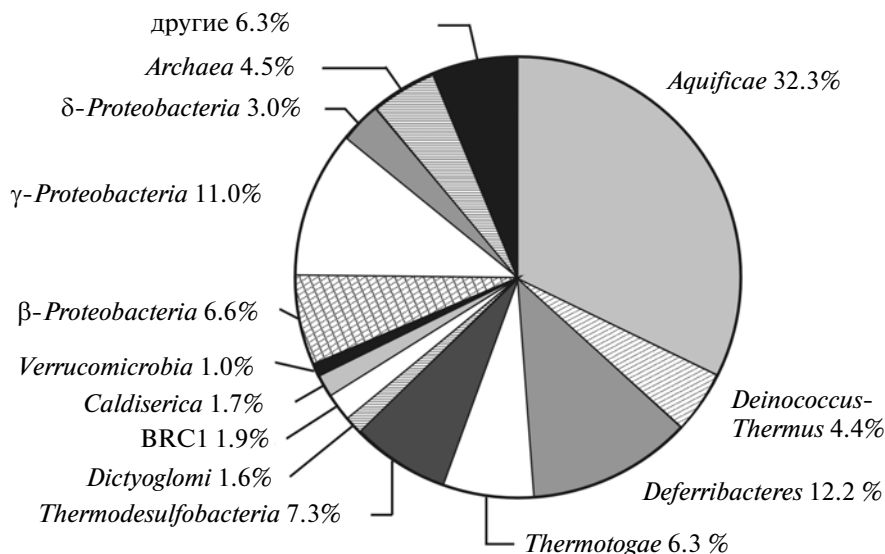


Рис. 2. Состав микробного сообщества источника Заварзина.

анаэробно окисляют несбраживаемые органические вещества, в том числе ацетат и другие органические кислоты, используя серу в качестве акцептора электронов.

Значительно меньшая доля в бактериальном сообществе источника Заварзина приходится на анаэробные и аэробные органотрофные организмы (табл. 2), известные по термальным местообитаниям всего мира. Около 6.3% последовательностей отнесены к роду *Fervidobacterium* типа *Thermotogae*, представители которого анаэробно сбраживают органические вещества, в том числе различные белковые субстраты и полисахариды [23]. Многие представители *Fervidobacterium* синтезируют внеклеточные протео-

литические ферменты, обеспечивающие гидролиз таких устойчивых белков, как кератины [24]. К органотрофным бактериям относятся также представители рода *Thermus* (тип *Thermus-Deinococcus*) и рода *Dictyoglomus* типа *Dictyoglomi*, на которые приходится, соответственно, 4.4 и 1.6% микроорганизмов.

Видимо, органотрофами являются и представители второй по численности группы бактерий (12.2%), обитающих в источнике Заварзина и представляющей род *Calditerrivibrio* типа *Deferribacteres* (табл. 1). Известные до сих пор представители этого рода — органотрофные анаэробы, использующие в качестве акцептора электронов нитрат, восстанавливая его до аммония [25]. Распространенность *Calditerrivibrio* в

Таблица 2. Основные типы метаболизма бактерий источника Заварзина

Отношение к кислороду	Источник углерода	Доноры электронов	Акцепторы электронов	Микроорганизмы	Доля указанной группы, %
Аэробы	CO ₂ , органические вещества	Сера	Кислород	<i>Sulfurihydrogenibium</i> <i>Thiofaba</i>	29.2
	Органические вещества	Тиосульфат	Кислород	<i>Tepidimonas</i>	6.0
Анаэробы	CO ₂	Водород	Сера	<i>Thermosulfidibacter</i> <i>Caldimicrobium</i> <i>Thiomonas</i>	18.6
	Органические вещества	Органические вещества	Протоны сера (брожение)	<i>Fervidobacterium</i> <i>Thermus</i> <i>Dictyoglomus</i>	12.3
	Органические вещества	Органические вещества, водород	Сера (окисление до CO ₂ и H ₂ S)	<i>Desulfurella</i> <i>Caldisericum</i>	4.4
	Органические вещества	Органические вещества	Нитрат	<i>Calditerrivibrio</i>	12.2

источнике Заварзина может быть обусловлена одним из самых высоких на Узоне содержанием ионов нитрата в воде источника (0.5 мМ).

Около 1.7% микроорганизмов представляют род *Caldisericum* типа *Caldiserica* (ранее именовавшегося OP5). Этот тип, в основном, представлен некультивируемыми организмами из различных термальных местообитаний [11], единственным культивируемым представителем является выделенный в термальном источнике в Японии *Caldisericum exile* AZM16c01. Это организм — хемогетеротроф, окисляющий органические субстраты и использующий серу или сульфит в качестве акцептора электронов [26].

Около 1.9% микроорганизмов были отнесены к типу BRC1, не имеющему на данный момент культивируемых представителей. Бактерии этого типа были обнаружены в различных термальных местообитаниях, включая источник Заварзина (напр., GenBank Acc. No. GQ328636), однако метаболизм этих микроорганизмов остается неизвестным. Еще около 1% последовательностей на филогенетическом дереве 16S рРНК образовывали отдельную линию уровня типа, причем гомология с ближайшим культивируемым организмом, *Hydrogenivirga* sp. 128-5-R1-6 типа *Aquificae*, составляла лишь 84%. Филогенетически близкие некультивируемые бактерии (93–96% идентичности по 16S рРНК) были обнаружены в источниках Йеллоустонского парка.

Еще одну отдельную филогенетическую ветвь уровня типа образуют около 0.2% бактерий. Поиск в GenBank выявил 7 близких (98% идентичности) последовательностей 16S рРНК некультивируемых микроорганизмов из источника Заварзина (GenBank Acc. No. GQ328713, GQ328694, GQ328549, GQ328495, GQ328450, GQ328488, GQ328421), в то время как гомология с последовательностями 16S рРНК микроорганизмов из других местообитаний не превышала 86% (по данным на 24.10.2010 г.). Таким образом, эта филогенетическая ветвь бактерий, для которой мы предлагаем название Z01, является эндемичной для источника Заварзина.

Менее 1% последовательностей были отнесены к другим таксономическим группам, — типам *Verrucomicrobia*, *Actinobacteria*, *Acidobacteria*, *Chloroflexi*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes* и протеобактериям классов альфа- и эпсилон. Цианобактерии, образующие мат на дне источника, в водной фазе составляли менее 0.2% микроорганизмов.

Состав архейного сообщества. Археи составляют около 4.5% микробного сообщества, и среди них обнаружены представители всех четырех типов — *Euryarchaeota* (42% архейных последовательностей), *Crenarchaeota* (50%), *Korarchaeota* (7.5%) и *Nanoarchaeota* (0.5%). Почти все эуриархеи относятся к филогенетической линии, аффилированной с порядком *Thermoplasmatales*, но удаленной от культивируемых организмов этой группы. Порядок *Thermoplasmatales* включает умеренно термофильные, ацидофильные

аэробные и факультативно анаэробные археи, окисляющие органические субстраты аэробно или, в анаэробных условиях, за счет восстановления серы [27]. Представители этого порядка были обнаружены и в грунтовой воде 3-го участка Восточного термального поля кальдеры Узон [28]. Кренархеи представлены, в первую очередь, родом *Pyrobaculum* (25.2% архей), представители которого являются, в основном, анаэробными факультативно литоавтотрофными организмами, окисляющими водород и органические вещества с использованием серы или ее окисленных соединений в качестве акцептора электронов [27]. Также были идентифицированы представители “некультивируемых” линий кренархей (около 18% архей). Представители глубокой филогенетической ветви архей, *Korarchaeota*, встречающиеся в термальных источниках Йеллоустонского парка [29], а также Исландии и Камчатки [30], также составляют значительную часть архейного сообщества.

Метаболизм микробного сообщества источника Заварзина. Проведенный филогенетический анализ позволил классифицировать абсолютное большинство микроорганизмов сообщества на уровне рода или семейства. Хотя филогенетическая близость во многих случаях не коррелирует со сходством путей метаболизма микроорганизмов, полученные данные позволяют выдвинуть гипотезы о природе экологических взаимосвязей между основными группами микроорганизмов.

Поскольку температура источника ниже верхней границы, при которой возможен фотосинтез (около 70°C), первичная продукция органического вещества может осуществляться как фотосинтетически, так и хемолитоавтотрофно, в результате окисления восстановленных веществ вулканического происхождения, поставляемых геотермальным потоком. Фотосинтетическая продукция в источнике Заварзина осуществляется цианобактериальным матом, покрывающим дно источника, так как в воде концентрация фототрофов (тех же цианобактерий и *Chloroflexi*) была очень низкой. Хемолитоавтотрофная продукция может осуществляться в аэробных или микроаэрофильных условиях за счет окисления серы и ее восстановленных соединений (*Sulfurihydrogenibium*, *Thiofaba*), а в анаэробной зоне — за счет окисления водорода с использованием в качестве акцептора электронов серы (*Thermosulfidibacter*, *Caldimicrobium*, *Thiomonas*). Еще один потенциальный источник энергии, метан, по-видимому, не используется в условиях источника Заварзина (55–58°C, pH 6.3), поскольку мы не обнаружили представителей известных метанотрофных бактерий, в том числе термоацидофильных метанотрофов типа *Verrucomicrobia*, встречающихся на Узоне в местообитаниях с близкой температурой, но более низким pH (2–4) [31]. В целом, доля хемолитоавтотрофных бактерий составляет около половины всех микроорганизмов (табл. 2).

Образуемая фотосинтетиками и хемолитоавтотрофами, а также поступающая с поверхностными водами из окружающих низкотемпературных зон органика может использоваться разнообразными органотрофными микроорганизмами, представленными, в основном, анаэробами. В их число входят как бактерии, сбраживающие органические субстраты (*Fervidobacterium*, *Dictyoglomus*, *Caldisericum*), так и осуществляющие ее полное окисление за счет использования в качестве акцептора электронов кислорода (*Thermus*), серы (*Desulfurella*) или нитрата (*Thermus*, *Calditerrivibrio*). Элементарная сера может поступать в источник с окружающих его серных бугров или образовываться при химическом или биологическом окислении сероводорода, присутствующего в воде источника. Практически полное отсутствие известных сульфатредуцирующих микроорганизмов может объясняться низким содержанием сульфата. Напротив, бактерии, филогенетически близкие к известным нитратредукторам, составляют значительную долю сообщества, что коррелирует с высоким содержанием нитрата в воде источника. Однако происхождение нитрата остается неясным, поскольку в сообществе отсутствовали известные термофильные микроорганизмы, осуществляющие первую (археи типа *Thaumarchaeota*) и вторую (бактерии типа *Nitrospira*) фазы нитрификации и окисляющие аммоний, присутствующий в воде источника.

В целом, источник Заварзина характеризуется очень высоким разнообразием обитающих в нем термофильных прокариот. В нем представлены микроорганизмы различных таксонов высокого уровня, характеризующиеся разнообразными типами метаболизма (табл. 2, рис. 2). При этом не наблюдается абсолютное доминирование какой-либо одной группы микроорганизмов, например, *Aquificales*, которые составляли более 95% сообщества в высокотемпературных источниках Йеллоустонского парка [15]. Вероятно, это обусловлено как сравнительно умеренными значениями температуры и pH, так и разнообразием процессов первичной продукции органических веществ, осуществляемой не только хемолитоавтотрофами, обитающими в толще воды источника, но и фотосинтезирующими микроорганизмами, входящими в состав цианобактериальных матов. Большое количество филогенетически разнообразных групп, из которых ни одна не доминирует, говорит о том, что это хорошо сбалансированное сложное сообщество, где каждая группа занимает свою экологическую нишу. Такое сообщество может рассматриваться как модель первичных экосистем древней Земли и служить объектом дальнейших, более детальных, исследований.

Работа поддержана Министерством образования и науки Российской Федерации в рамках ФЦП "Научные и научно-педагогические кадры инновационной России" на 2009–2013 годы (контракт № П 1049).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Заварзин Г.А., Карпов Г.А., Горленко В.М., Головачева Р.С., Герасименко Л.М., Бонч-Осмоловская Е.А., Орлеанский В.К. Кальдерные микроорганизмы. М.: Наука, 1989. 120 с.
2. Заварзин Г.А. Изучение микробного разнообразия в Институте микробиологии им. С.Н. Виноградского // Микробиология. 2004. Т. 73. № 5. С. 598–612.
3. Лебединский А.В., Черных Н.А., Бонч-Осмоловская Е.А. Геносистематика микроорганизмов термальных местообитаний // Биохимия. 2007. Т. 72. № 12. С. 1594–1609.
4. Bonch-Osmolovskaya E.A., Sokolova T.G., Kostrikina N.A., Zavarzin G.A. *Desulfurella acetivorans* gen. nov. and sp. nov. – a new thermophilic sulfur-reducing eubacterium // Arch. Microbiol. 1990. V. 153. P. 151–155.
5. Margulies M., Egholm M., Altman W.E., Attiya S., Bader J.S., Bemben L.A., Berka J., Braverman M.S., Chen Y.J., Chen Z., Dewell S.B., Du L., Fierro J.M., Gomes X.V., Godwin B.C., He W., Helgesen S., Ho C.H., Irzyk G.P., Jando S.C., Alenquer M.L.I., Jarvie T.P., Jirage K.B., Kim J.B., Knight J.R., Lanza J.R., Leamon J.H., Lefkowitz S.M., Lei M., Li J., Lohman K.L., Lu H., Makhijani V.B., McDade K.E., McKenna M.P., Myers E.W., Nickerson E., Nobile J.R., Plant R., Puc B.P., Ronan M.T., Roth G.T., Sarkis G.J., Simons J.F., Simpson J.W., Srinivasan M., Tartaro K.R., Tomasz A., Vogt K.A., Volkmer G.A., Wang S.H., Wang Y., Weiner M.P., Yu P., Begley R.F., Rothberg J.M. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors // Nature. 2005. V. 437. P. 376–380.
6. Запороженко Е.В., Слободова Н.В., Булыгина Е.С., Кравченко И.К., Кузнецов Б.Б. Экспресс-метод выделения ДНК из бактериальных сообществ различных почв // Микробиология. 2006. Т. 75. С. 127–134.
7. Cole J.R., Wang Q., Cardenas E., Fish J., Chai B., Farris R.J., Kulam-Syed-Mohideen A.S., McGarrell D.M., Marsh T., Garrity G.M., Tiedje J.M. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis // Nucl. Acids Res. 2009. V. 37. D141–D145.
8. Chao A. Non-parametric estimation of the number of classes in a population // Scand. J. Statist. 1984. V. 11. P. 265–270.
9. Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D.G. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools // Nucl. Acids Res. 1997. V. 24. P. 4876–4882.
10. Van de Peer Y., De Wachter R. TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment // Comput. Appl. Biosci. 1994. V. 10. P. 569–570.
11. Hugenholtz P., Pitulle C., Hershberger K.L., Pace N.R. Novel division level bacterial diversity in a Yellowstone hot spring // J. Bacteriol. 1998. V. 180. P. 366–376.
12. Siering P.L., Clarke J.M., Wilson M.S. Geochemical and biological diversity of acidic, hot springs in Lassen Volcanic National Park // Geomicrobiol. J. 2006. V. 23. P. 129–141.
13. Roesch L.F., Fulthorpe R.R., Riva A., Casella G., Hadwin A.K., Kent A.D., Daroub S.H., Camargo F.A., Farmerie W.G., Triplett E.W. Pyrosequencing enumerates

- and contrasts soil microbial diversity // ISME J. 2007. V. 1. P. 283–290.
14. Miller S.R., Strong A.L., Jones K.L., Ungerer M.C. Bar-coded pyrosequencing reveals shared bacterial community properties along the temperature gradients of two alkaline hot springs in Yellowstone National Park // Appl. Environ. Microbiol. 2009. V. 75. P. 4565–4572.
 15. Spear J.R., Walker J.J., McCollom T.M., Pace N.R. Hydrogen and bioenergetics in the Yellowstone geothermal ecosystem // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2005. V. 102. P. 2555–2560.
 16. Reysenbach A.-L., Banta A., Civello S., Daly J., Mitchel K., Lalonde S., Konhauser K., Rodman A., Rustenholtz K., Takacs-Vesbach C. The Aquificales of Yellowstone National Park // Geothermal Biology and Geochemistry in Yellowstone National Park: Workshop Proceedings from the Thermal Biology Institute's Yellowstone National Park Conference, October 2003 / Eds. W.P. Inskeep & T.R. McDermott. Bozeman, MT: Montana State University, 2005. P. 129–142.
 17. O'Neill A.H., Liu Y., Ferrera I., Beveridge T.J., Reysenbach A.L. *Sulfurihydrogenibium rodmanii* sp. nov., a sulfur-oxidizing chemolithoautotroph from the Uzon Caldera, Kamchatka Peninsula, Russia, and emended description of the genus *Sulfurihydrogenibium* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2008. V. 58. P. 1147–1152.
 18. Nunoura T., Oida H., Miyazaki M., Suzuki Y. *Thermosulfidibacter takaii* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, hydrogen-oxidizing, sulfur-reducing chemolithoautotroph isolated from a deep-sea hydrothermal field in the Southern Okinawa Trough // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2008. V. 58. P. 659–665.
 19. Miroshnichenko M.L., Lebedinsky A.V., Chernyh N.A., Tourova T.P., Kolganova T.V., Spring S., Bonch-Osmolovskaya E.A. *Caldimicrobium rimae* gen. nov., sp. nov., an extremely thermophilic, facultatively lithoautotrophic, anaerobic bacterium from the Uzon Caldera, Kamchatka // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2009. V. 59. P. 1040–1044.
 20. Vesteinsdóttir H., Reynisdóttir D.B., Orlygsson J. *Thiomonas islandica* sp. nov., a novel moderately thermophilic hydrogen and sulfur oxidizing betaproteobacterium isolated from an Icelandic hot spring // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2011. V. 61. P. 132–137.
 21. Mori K., Suzuki K. *Thiofaba tepidiphila* gen. nov., sp. nov., a novel obligately chemolithoautotrophic, sulfur-oxidizing bacterium of the *Gamma*proteobacteria isolated from a hot spring // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2008. V. 58. P. 1885–1891.
 22. Albuquerque L., Tiago I., Veríssimo A., da Costa M.S. *Tepidimonas thermarum* sp. nov., a new slightly thermophilic betaproteobacterium isolated from the Elisengquelle in Aachen and emended description of the genus *Tepidimonas* // Syst. Appl. Microbiol. 2006. V. 29. P. 450–456.
 23. Andrews K.T., Patel B.K. *Fervidobacterium gondwanense* sp. nov., a new thermophilic anaerobic bacterium isolated from nonvolcanically heated geothermal waters of the Great Artesian Basin of Australia // Int. J. Syst. Bacteriol. 1996. V. 46. P. 265–269.
 24. Friedrich A.B., Antranikian G. Keratin degradation by *Fervidobacterium pennavorans*, a novel thermophilic anaerobic species of the order *Thermotogales* // Appl. Environ. Microbiol. 1996. V. 62. P. 2875–2882.
 25. Iino T., Nakagawa T., Mori K., Harayama S., Suzuki K. *Calditerrivibrio nitroreducens* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, nitrate-reducing bacterium isolated from a terrestrial hot spring in Japan // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2008. V. 58. P. 1675–1679.
 26. Mori K., Sunamura M., Yanagawa K., Ishibashi J., Miyoshi Y., Iino T., Suzuki K., Urabe T. First cultivation and ecological investigation of a bacterium affiliated with the candidate phylum OP5 from hot springs // Appl. Environ. Microbiol. 2008. V. 74. P. 6223–6229.
 27. Kletzin A. General characteristics and important model organisms // Archaea: molecular and cellular biology / Ed. Cavicchioli R. Washington, USA: ASM Press, 2007. 556 p.
 28. Марданов А.В., Гумеров В.М., Белецкий А.В., Бонч-Осмоловская Е.А., Равин Н.В., Скрябин К.Г. Характеристика биоразнообразия термофильного микробного сообщества методом параллельного пиросеквенирования // Докл. акад. наук. 2010. Т. 432. № 2. С. 544–548.
 29. Barns S.M., Delwiche C.F., Palmer J.D., Pace N.R. Perspectives on archaeal diversity, thermophily and monophyly from environmental rRNA sequences // Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1996. V. 93. P. 9188–9193.
 30. Reigstad L.J., Jorgensen S.L., Schleper C. Diversity and abundance of *Korarchaeota* in terrestrial hot springs of Iceland and Kamchatka // ISME J. 2010. V. 4. P. 346–356.
 31. Islam T., Jensen S., Reigstad L.J., Larsen O., Birkeland N.K. Methane oxidation at 55 degrees C and pH 2 by a thermoacidophilic bacterium belonging to the *Verrucomicrobia* phylum // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2008. V. 105. P. 300–304.