

Министерство образования и науки Российской Федерации
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ТОМСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ (НИ ТГУ)
Институт биологии, экологии, почвоведения, сельского и лесного хозяйства
Кафедра физиологии растений и биотехнологии

ДОПУСТИТЬ К ЗАЩИТЕ В ГЭК
Зав. каф. физиологии растений и
биотехнологии, д.б н., профессор
 О. В. Карначук
«17» июня 2016 г.

Игошин Александр Владимирович

ИССЛЕДОВАНИЕ ДОМИНИРУЮЩИХ ФИЛОТИПОВ
БАКТЕРИЙ В МЕСТООБИТАНИЯХ СВЯЗАННЫХ С
ДОБЫЧЕЙ ПОЛЕЗНЫХ ИСКОПАЕМЫХ

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание степени магистра
биологии

по направлению подготовки
06.04.01 - Биология

Руководитель ВКР:
зав. каф. физиологии
растений и биотехнологии,
д.б н., профессор
 О. В. Карначук
подпись
«17» июня 2016 г.

Автор работы
студент группы № 01024
 А. В. Игошин
подпись

Томск - 2016

Директору Биологического института
Д.С. Воробьеву
от Зав. кафедрой физиологии растений
и биотехнологии БИ ТГУ
О.В. Карначук

Служебная записка.

Уважаемый Данил Сергеевич,

Часть выпускных квалификационных работ студентов Кафедры физиологии растений и биотехнологии содержат неопубликованные данные, в том числе результаты интеллектуальной деятельности в научно-технической сфере, которые имеют потенциальную коммерческую ценность, а также описание модифицированных методик.

В соответствии с п. 3.2, п. 3.4 «Регламента размещения текстов выпускных квалификационных работ в электронной библиотеке Научной библиотеки ТГУ», просим разрешить размещение следующих текстов ВКР с изъятием разделов «Материалы и методы» и «Результаты и обсуждение»:

Бакалаврские работы

1. Ананина Е.А. Устойчивость ацидофильных сульфатредуцирующих бактерий *Desulfovibrio* sp. TomC и *Desulfosporosinus* sp. BG к тяжелым металлам.
2. Жандарова А.Е. Устойчивость сульфатредуцирующих бактерий *Desulfovibrio* sp. TomC и *Desulfomicrobium* sp. DI к тяжелым металлам.
3. Ильюшин В.А. Влияние состава питательных сред и кислородного режима на морфофизиологические и биохимические характеристики *Lentinula edodes*.
4. Никиткин В.А. Влияние селективного света на микроклонирование безвирусного *Solanum tuberosum* L. сортов Фреска и Накра.
5. Никиткина Э.Г. Влияние ионов меди на микроклонирование *Lychnis chalconica* L. в условиях селективного света.
6. Сиволобова Т.И. Защитный эффект брассинолида и кастастерона при NaCl засолении.
7. Соломина Е.А. Молекулярная детекция прокариот и бактериофагов в природных образцах и культурах из экстремальных местообитаний.
8. Суворина С.С. Изучение культивируемых микроорганизмов из глубинного водоносного горизонта в Томской области.

Магистерские диссертации

1. Малофий М.К. Протекторный эффект брассиностероидов при засолении.
2. Игошин А.В. Исследование доминирующих филогенов бактерий в местообитаниях, связанных с добычей полезных ископаемых.

С уважением,
О.В. Карначук

Согласовано.

ДИРЕКТОР БИ
Воробьев Д.С.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Аннотация	4
Abstract	4
Список сокращений	6
Введение.....	7
Цель и задачи	8
Актуальность	9
1. Обзор литературы.....	10
1.1. Образование кислых дренажных вод в местах добычи металлов	10
1.2. Характеристика местообитаний с высоким уровнем засоления.....	11
1.3. Методы исследования биоразнообразия микроорганизмов	13
1.3.1. Культуральные методы	13
1.3.2. Методы на основе гибридизации нуклеиновых кислот.....	13
1.3.3. «Омик»-методы.....	15
1.3.4. Методы фингерпринтинга	18
1.3.5. Филогенетические маркеры, используемые в микробной экологии	30
1.4. Исследования биоразнообразия бактерий в КШД и засоленных местообитаниях	34
2. Материалы и методы	38
2.1. Отбор проб для молекулярного анализа доминирующих фило типов... 38	
2.1.1. Характеристика мест отбора проб отходов добычи металлов месторождений «Шерловая гора» и «Акатуй»	38

2.1.2. Получение накопительных и периодической культур из проб воды и осадков кислых отходов добычи металлов	41
2.1.3. Характеристика местообитаний в районе добычи сульфата натрия и отбор проб	43
2.2. Выделение, амплификация ДНК и проведение гель-электрофореза в денатурирующих условиях, секвенирование и биоинформационный поиск	46
3. Доминирующие флотипы в пробах из местообитаний, связанных с добычей металлов и культурах на их основе	49
3.1. ДГГЭ-анализ фрагментов гена 16S рРНК из проб кислых отходов хвостохранилищ, накопительных и периодической культур	49
3.2. ДГГЭ-анализ фрагментов гена 16S рРНК из проб полученных в районе добычи сульфата натрия	61
Заключение	67
Выводы	68
Список использованных источников	69
Приложение	85
Благодарности	101

Аннотация

Среди огромного разнообразия микроорганизмов особенное внимание ученых привлекают формы, способные обитать в экстремальных условиях. Данный интерес обусловлен тем, что при критических значениях показателей окружающей среды задействуются уникальные физиолого-биохимические механизмы, которые интересны как сами по себе, так и в плане их использования в биотехнологии. Благодаря развитию молекулярных методов исследования, появилась возможность вскрыть ту часть микробного разнообразия которая была недоступна классическим культуральным методам. В данной работе исследуются местообитания, связанные с добычей полезных ископаемых, а также накопительные культуры и культура биореактора на их основе при помощи гель-электрофореза в денатурирующих условиях (ДГГЭ). Он позволяет производить экспресс-оценку доминирующих фило типов в местообитаниях с низким биоразнообразием, благодаря чему и явился методом выбора в данной работе.

Ключевые слова: фило тип, биоразнообразие, денатурирующий градиентный гель-электрофорез

Abstract

Among the number of microorganisms some forms are capable to live in extreme conditions attracting scientists' attention. This possible because of their peculiar physiological and biochemical characteristics that are employed at critical environmental parameters. So, this fact is interesting on its own, and in terms of potential biotechnological application. The development of molecular methods made possible revealing that part of the microbial diversity which was not available by traditional cultural methods. Environments associated with mining as well as elective and batch bioreactor cultures were investigated in this work using

denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). This technique was chosen for the investigation because it permits fast assessment of the phylotypes dominating the environments even those with relatively poor biodiversity.

Keywords: phylotype, biodiversity, denaturing gradient gel electrophoresis

Список сокращений

АТФ – аденозинтрифосфорная кислота

ДГГЭ – денатурирующий градиентный гель-электрофорез

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

дцДНК – двухцепочечная ДНК

КШД – кислые дренажные воды

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РНК – рибонуклеиновая кислота

рРНК – рибосомальная РНК

СРБ – сульфатредуцирующие бактерии

(A)RISA – (Automated) Ribosomal Intergenic Spacer analysis, (автоматический) анализ межгенных рибосомных спейсеров

ITS – internal transcribed spacer, транскрибируемый межгенный спейсер

FISH - fluorescence *in situ* hybridization, флуоресцентная *in situ* гибридизация

T-RLFP – terminal restriction fragment length polymorphism, полиморфизм длин терминальных рестрикционных фрагментов

ВВЕДЕНИЕ

Структура микробных сообществ в значительной мере определяется физическими и химическими факторами среды обитания: геохимическими показателями, значением рН, Eh, температурой, освещенностью, источниками углерода, донорами и акцепторами электронов. Большой интерес представляют собой местообитания с экстремальными значениями факторов, критичных для живых организмов, таких как температура, давление, рН, концентрация растворенных соединений и ионов металлов.

Примером экстремальных местообитаний могут служить кислые шахтные дренажные воды (КШД), образующиеся в местах хранения отходов сульфидных руд. Данные условия, как правило, кроме повышенной кислотности, характеризуются высоким содержанием тяжелых металлов. Геохимическая активность микроорганизмов к таким экосистемах может приводить к выведению металлов в раствор, или их осаждению, изменению рН и окислительно-восстановительных свойств среды [1]. Другой пример – водоемы и почвы с высоким уровнем засоления. По мнению Г. А. Заварзина[2], гиперсолевые водоемы являются экстремальными местообитаниями, сохраняющими реликтовое прокариотическое биоразнообразие, поскольку они не испытали на себе влияния высших форм жизни, которые развиваются на основе сбалансированной микробной системы.

В данной работе проводилось исследование методом денатурирующего градиентного гель-электрофореза (ДГГЭ) разнообразия фрагментов гена 16S рРНК бактерий в пробах кислых отходов переработки полисульфидных руд и культурах (накопительные культуры, периодическая культура биореактора) на их основе, а также в пробах из местообитаний вблизи предприятия по добыче сульфата натрия. Работа проводилась в лаборатории биотехнологии и биоинженерии кафедры физиологии растений и биотехнологии Томского государственного университета (ТГУ).

Цель: Определить доминирующие флотипы *Bacteria* по гену 16S рРНК в местообитаниях, связанных с добычей полезных ископаемых и в накопительных и периодической культурах, полученных на основе проб из данных местообитаний методом гель-электрофореза в денатурирующих условиях (ДГГЭ).

Для выполнения цели были поставлены следующие задачи:

1. Произвести оценку состава микробных сообществ в образцах воды и осадков кислых отходов переработки полисульфидных руд месторождений «Шерловая гора» и «Акатуй», и в образцах воды и почвы вблизи предприятия по добыче сульфата натрия ОАО «Кучуксульфат» методом ДГГЭ;
2. Исследовать состав флотипов в накопительных культурах, полученных на основе проб из месторождений «Шерловая гора» и «Акатуй», характеризующихся ацидофильным характером роста;
3. Исследовать динамику состава консорциума ацидофильных и ацидотолератных бактерий, культивируемых в биореакторе с изменяющимися условиями культивирования.

Актуальность

Исследование биоразнообразия микроорганизмов в экстремальных местообитаниях имеет как фундаментальный, так и прикладной интерес. Первый связан с поиском неизвестных ранее штаммов и видов, дальнейшее изучение которых может пролить свет на физиолого-биохимические механизмы устойчивости к агрессивной среде. Второй – это биотехнологическая значимость некоторых участников вышеописанных микробных сообществ. Некоторые микроорганизмы, в частности, сульфатредуцирующие бактерии (СРБ) обитающие в КШД, способны к осаждению тяжелых металлов из раствора. Они весьма перспективны в технологиях очистки сточных вод предприятий (например, металлургических и горнодобывающих предприятий) от тяжелых металлов. Что же касается галофилов, можно привести лишь некоторые из большого числа примеров их использования в биотехнологии: продукция осмотически активных веществ, используемых в косметической промышленности и в качестве криопротекторов; получение биосурфактантов и экзополисахаридов, использующихся в нефтедобыче; очистка морских экосистем, загрязненных нефтепродуктами, благодаря способности некоторых галофильных бактерий окислять углеводороды в соленой среде; синтез аминокислот D-ряда (являющихся полупродуктами в синтезе многих антибиотиков, пептидных гормонов и пестицидов), с участием гидролаз галофильных прокариот [3].

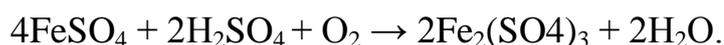
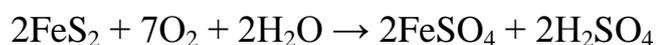
Методы изучения микроорганизмов можно разделить на классические культуральные и молекулярные. К числу последних относится метод денатурирующего градиентного гель-электрофореза (ДГГЭ). Он хорошо подходит для экспресс-оценки состава микробных сообществ с низким уровнем разнообразия. Поэтому ДГГЭ явился методом выбора при исследовании экстремальных местообитаний в настоящей работе.

1. Обзор литературы

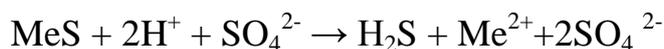
1.1. Образование кислых дренажных вод в местах добычи металлов

Добыча и переработка сульфидов металлов сопряжена с таким явлением, как образование кислых шахтных дренажных вод (КШД), поступающих в подземные горные выработки из подрабатываемых водоносных горизонтов, при вскрытии сульфидных рудных тел и угольных пластов с большим содержанием пирита, либо возникающих как кислотные стоки на территориях хвостохранилищ – мест хранения отходов обогащения полезных ископаемых.

Первое исследование посвященное механизму образования кислого дренажа провели Барнес и Кларк в 1964 году [4]. По их мнению, исходными источниками рудного разложения являются минералы пирит и марказит. Причем наиболее распространено формирование кислого дренажа за счет окисления пирита:



В последующей реакции другие сульфиды под действием серной кислоты переходят в сульфаты [5]:



В результате, в воде повышаются концентрации сульфат-иона и тяжелых металлов, что сопровождается снижением pH. Кислотность в КШД может достигать значений pH ниже 2 [6]. Наиболее распространенные металлы-загрязнители в данных экосистемах - Cu, Zn, Cd, As, Ni, Fe. Их концентрация может варьировать от нескольких микрограмм до нескольких

десятков грамм на литр [7, 8, 9]. Эти металлы образуют хорошо растворимые сульфаты, чем и обуславливается их выход в раствор из материала отходов. Таким образом, в КШД низкий рН среды как правило сопряжен с высокими концентрациями растворенных металлов.

1.2. Характеристика местообитаний с высоким уровнем засоления

Другой пример экстремальных местообитаний - это водоемы и почвы с высоким уровнем засоления. Так, места отбора проб настоящей работы характеризуются как естественным засолением, присушим почвам (солончакам) и озерам Кулунинской равнины, так и происходящим от рядом расположенного предприятия по добыче сульфата натрия. Поэтому, будет целесообразно рассмотреть общие понятия, касающиеся засоленных вод и почв.

Показатель, в зависимости от которого воду характеризуют как соленую, либо пресную – минерализация. Он показывает количество содержащихся в воде растворенных веществ, единица измерения – [г/л]. Аналогичное понятие – соленость, измеряется в [г/кг], либо промилле (‰). Перевод из минерализации в соленость, и обратно, возможен при знании плотности водного раствора при данной концентрации. При низких значениях оба показателя практически совпадают. Соленой считается вода с минерализацией выше 1 г/л [10].

Соленые озера встречаются на всех континентах. Так, среди 253 крупнейших озер мира (с площадью более 500 км²) таковыми являются 64 [11]. Общий объем воды, сосредоточенной в озерах мира составляет 176400 км³, из них на долю пресных озер приходится 91000 км³, соленых – 85400 км³ (данные 1980 года) [10]. Таким образом, их представленность в гидросфере сопоставима.

По преобладающему аниону озера делятся на: гидрокарбонатные и карбонатные, сульфатные и хлоридные. В каждом из этих классов

дополнительно выделяют три группы по преобладающему катиону: кальциевая, магниевая, натриевая.

Кроме соленых озер некоторый интерес с точки зрения экстремальности для живых организмов представляют засоленные почвы, в которых высоки концентрации минеральных солей. Это в первую очередь солончаки и солонцы. Они относятся к интразональным почвам – то есть развивающимся в специфических местных условиях, наряду с зональными. Различие между ними состоит в том, что первые содержат водорастворимые соли в верхнем почвенном горизонте, а вторые – на некоторой глубине. Солончаки и солонцы распространены в лесостепной, степной, сухостепной, пустынно-степной зонах. Эти засоленные почвы содержат легкорастворимые неорганические соединения в токсичных для растений концентрациях – бикарбонаты и карбонаты натрия, сульфаты магния и натрия, хлориды и нитраты магния, натрия и кальция. Наибольшая токсичность присуща соде, меньшая – хлоридам, бикарбонатам натрия и магния, и наименьшая – сульфатам [12]. Для бактерий, как правило, токсичны соли тяжелых металлов, однако и перечисленные соединения могут оказывать негативное влияние в высоких концентрациях. Оно может быть обусловлено собственно растворимым веществом, или его влиянием на активность воды – растворенное вещество притягивает молекулы растворителя и снижает их подвижность. Для каждого вида микроорганизмов существует нижний порог активности воды, ниже которого их развитие прекращается [13].

1.3. Методы исследования биоразнообразия микроорганизмов

За более чем вековую историю изучения микроорганизмов наука накопила достаточно широкий арсенал для изучения прокариотического разнообразия. В целом, можно выделить:

- 1) культуральные методы;
- 2) методы на основе гибридизации нуклеиновых кислот;

- 3) «омик»-методы;
- 4) ДНК-фингерпринтирование.

1.3.1. Культуральные методы

Исторически первыми и классическими методами являются культуральные. В них суспензия клеток микроорганизмов, полученная из какого-либо источника, после серии разведений высевается на основные и элективные среды. Далее производится выделение чистых культур, и изучение их морфологических, физиолого-биохимических и иных систематических характеристик [14, 15]. Однако, культуральные методы имеют существенный недостаток. Дело в том, что культивированию поддается весьма малая доля микроорганизмов из природного сообщества – предположительно от 0,1% до 10% [16]. Но при этом по мнению некоторых исследователей, культуральные методы весьма ценны для оценки экологических характеристик микроорганизмов [17]. Стоит отметить, что «некультивируемость» какого-либо микроорганизма не абсолютна, а обусловлена тем, что исследователям на текущий момент еще не удалось подобрать набор условий для его культивирования. Эта проблема, впрочем, зачастую решается за счет привлечения данных из «омик»-наук, которые будут упомянуты далее.

1.3.2. Методы на основе гибридизации нуклеиновых кислот

В последние годы гибридизационные методы получили заметное распространение в экологии микроорганизмов. В основе данных методов лежит использование последовательностей ДНК (или РНК) в качестве зондов, комплементарно связывающихся с определенной последовательностью в геноме целевого микроорганизма или группы микроорганизмов. Длина такой последовательности может составлять от 20

до 1000 п.н. Короткие зонды (до 50 п.н.) как правило, синтезируют химически, а более длинные получают путем молекулярного клонирования. Гибридизация данных маркеров с исследуемой ДНК говорит о наличии гомологичных участков в геноме изучаемых объектов, и позволяет с определенной точностью идентифицировать систематическое положение микроорганизма [18]. Гибридизационные методы позволяют обнаружить наличие определенных родов или видов в различных сообществах микроорганизмов. Более того, на сегодняшний день существуют зонды с широкой специфичностью, для определения принадлежности к высшим таксонам – царствам, подцарствам, классам, подклассам [19]. Они могут использоваться вкупе с зондами для видовой и родовой идентификации, что позволяет проводить иерархический анализ сообществ - то есть определять филогенетическую принадлежность одновременно на уровнях разных таксонов.

В изначальном варианте для мечения гибридизационных проб использовались радиоактивные метки, которые впоследствии были заменены на хемолюминисцентные. Это позволило значительно продлить срок службы зондов. Появление методов гибридизации *in situ* (FISH, fluorescence *in situ* hybridization) [20] упростило технологию, так как в этом случае отпала необходимость выделения нуклеиновых кислот, что заметно сократило трудоемкость, длительность процедуры и ее стоимость. Кроме того, *in situ* гибридизация позволяет избежать некоторого искажения результатов, которое может возникать при выделении ДНК. Данный подход позволил определять морфологию и численность клеток некультивируемых микроорганизмов, и что также важно – их пространственное распределение. При помощи FISH были, к примеру, исследованы бактериальные популяции активного ила [21], биопленки [22], определена таксономическая принадлежность эндосимбионтов простейших [23] и магнетотаксических бактерий [24].

В 2000-е годы стала развиваться технология ДНК-микрочипов, которая

берет истоки еще в 1987 году [25]. Она предполагает проведение одновременной гибридизации с очень большим количеством зондов – от сотен до сотен тысяч. ДНК-чипы широко используются для анализа и сравнения экспрессии генов, выявления однонуклеотидных полиморфизмов, генотипирования и т.д. Микрочипы могут отличаться по конструкции, особенностям работы, эффективности, точности и стоимости. Данная технология нашла свое применение и в экологии микроорганизмов. Подходы ДНК-микрочипирования с успехом используются для исследования микробных сообществ [26].

В целом, вышеописанные технологии достаточно эффективны, они менее трудоемки и дешевы по сравнению с другими молекулярными методами. Однако их проведение требует грамотного выбора зондов, подбора условий гибридизации и учета возможной перекрестной гибридизации с генетически близкими микроорганизмами. Неуклонное пополнение баз данных по нуклеотидным последовательностям стимулирует развитие гибридизационных методов, так как появляются возможности использования этих последовательностей в качестве зондов. Таким образом, метод *in situ* гибридизации является одним из основных при анализе сообществ микроорганизмов. Именно методы молекулярной гибридизации позволяют дать наиболее точную количественную оценку состава популяций и представляют собой мощный инструмент микробной экологии.

1.3.3. «Омик»-методы

С начала 2000-х гг. получил развитие ряд новых методов комплексного изучения микробных сообществ, в частности, метагеномика, метатранскриптомика, метапротеомика и метаболомика. Часто их объединяют термином «омика» - «омик»-науки, «омик»-методы и т.д., на основании общей части названия [27]. Данные методы позволяют получить системное представление о составе сообщества, процессах, протекающих в

нем и потенциальных метаболических характеристиках его участников [28].

Метагеномика, или как ее иногда называют, экологическая геномика, занимается анализом совокупной генетической информации, полученной из образцов окружающей среды, в отличие от геномики, которая исследует структуру, организацию и функционирование отдельных геномов (например, человека, мыши, бактерии). Таким образом, метагеном какого-либо микробного сообщества – это его совокупный геном. Впервые метагеномные подходы стали применяться еще с 1985 года, когда для описания микробных сообществ использовали библиотеку клонов фрагментов гена 16S рРНК [29]. Сам термин «метагеномика» появился чуть позже – в 1998 году, когда исследователь Джо Хандельсман употребил его при описании микробного сообщества почвы [30]. Данный подход стал широко использоваться для исследования прокариотического разнообразия и динамики экосистем – как природных, например, микробиомов почв [31], вод [32], различных экстремальных местообитаний [33], так и микробиомов человека и животных [34]. Благодаря этим исследованиям было выявлено множество новых таксонов микроорганизмов в природных экосистемах [32].

Мощным толчком развитию метагеномики в первом десятилетии XXI века послужило появление новых методов высокопроизводительного секвенирования. Они позволили расшифровку последовательностей не только отдельных фрагментов гена 16S рРНК, но и множества случайных фрагментов тотальной ДНК образца - shotgun-секвенирование, или метод дробовика. Таким образом, метагеномика дает возможность получить данные не только о таксономическом разнообразии в образце, но также и о потенциальной роли микроорганизма в сообществе – путем определения относительной представленности генов, кодирующих белки разных функциональных категорий [28]. Несмотря на перечисленные возможности, метагеномные подходы не лишены ряда недостатков: 1) не всегда удается осуществить полную сборку геномов всех микроорганизмов образца; 2) невозможно охарактеризовать роль некоторых генов, из-за того, что

неизвестны или неисследованы функции, кодируемых ими белков; 3) основываясь только на метагеномных данных иногда затруднительно установить, какой именно вид выполняет ту или иную биохимическую роль в сообществе [35].

Кроме вышеперечисленных недостатков, существенно и то, что наличие гена однозначно не свидетельствует о его функциональном участии в метаболизме микроорганизма и сообщества. В этой связи играет важную роль другой «омик»-подход – метатранскриптомика, который идентифицирует матричные РНК, активно транскрибирующиеся в сообществе. Для того, чтобы исследовать транскрипционный пул микробиома, на матрице тотальной РНК микробного сообщества проводят реакцию обратной транскрипции, и далее, секвенируют полученную комплементарную ДНК [36]. Минусами этого метода являются: 1) очень низкая устойчивость матричной РНК в окружающей среде, по сравнению с ДНК; 2) уровень транскрипции гена и концентрация соответствующего белка в клетке могут не коррелировать, поэтому данные метатранскриптомики указывают лишь косвенно на потенциальное присутствие определенного белка в клетке [36, 37].

Наличие матричной РНК в микробных клетках свидетельствует о процессе транскрипции генов, кодирующих функциональные белки, но прямо не свидетельствует о реализации функций этих белков в сообществе. Данные о том, какие именно белки, кодируемые геномами микроорганизмов, участвуют в реализации биохимической функции в микробном сообществе позволяет получить метапротеомный анализ. В этом методе, из биомассы микроорганизмов образца выделяют тотальный белковый препарат, разделяют белки с помощью двумерного гель-электрофореза и жидкостной хроматографии, и идентифицируют их с помощью масс-спектрометрии в комбинации с деградацией белков по Эдману для определения первичной структуры [27].

Метаболомика – наука, занимающаяся анализом метаболома –

совокупности всех метаболитов клетки, ткани, органа или организма в целом. В основном, методы метаболомики находят свое применение в токсикологии, экспериментальной физиологии и функциональной геномике, однако они применимы и к микробиологии, в том числе и в части изучения микробиомов. С помощью данного подхода характеризуются метаболиты, которые производятся или потребляются в процессе физиологической активности микроорганизмов. Метаболом, или метаболомический профиль, представляет собой химические «отпечатки пальцев», которые указывают на текущий физиологический статус микробного сообщества, на характер взаимодействия микроорганизмов с окружающей средой [38]. Основные аналитические методы метаболомики – спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР) и масс-спектрометрия [39].

В сочетании, подходы метагеномики, метатранскриптомики, метапротеомики и метаболомики позволяют получить наиболее полную информацию о составе и функциональных свойствах микроорганизмов в микробном сообществе, и их экосистемной роли [40].

1.3.4. Методы фингерпринтинга

Последней и весьма широко используемой для исследования разнообразия прокариот является группа методов, объединенная под общим названием фингерпринтинг. К использованию для исследования микробиомов применяется название фингерпринтинг сообществ (англ. community fingerprinting). Общий смысл заключается в типировании сообщества на основании полиморфизма ДНК, и назначении ему соответствующего профиля – фингерпринта. Среди методов, которые следует отметить – T-RLFP, ARISA, ARDRA, CRISPR-типирование и DGGE (ДГГЭ).

T-RLFP (англ. terminal restriction fragment length polymorphism) - метод полиморфизма длин терминальных рестрикционных фрагментов. В нем используются флуоресцентно-меченые фрагменты ДНК, для составления

профиля сообщества [41].

Для выполнения T-RFLP-анализа (рисунок 1) выбирается целевой ген, например 16S рРНК, который амплифицируется путем ПЦР. Как минимум один из праймеров, используемых в ПЦР должен быть помечен флуоресцентно на 5'-конце. После амплификации каждый из фрагментов ДНК несет флуоресцентную метку. Далее, выбирается определенный рестрикционный фермент, который гидролизует связи в ДНК, строго в районах специфичных для него сайтов рестрикции (или на некотором расстоянии от них). Положение, на котором основан описываемый метод состоит в том, что каждый участник микробного сообщества имеет различающуюся последовательность целевого гена и, следовательно, рестрикционный фермент будет расщеплять амплифицированную ДНК разных микроорганизмов в разных местах. Таким образом, в ходе ферментативной обработки будут произведены флуоресцентно меченые последовательности ДНК определенной длины принадлежащие каждый соответствующему представителю микробиома. Эти фрагменты носят название терминальных, поскольку они имеют концы, содержащие меченый праймер. Далее фрагменты разделяются путем гель- или капиллярного электрофореза. Лазерная детекция фиксирует размер и паттерн интенсивности флуоресценции терминальных фрагментов. В качестве стандарта используется ДНК, с заранее известной длиной и уровнем свечения. Путем установки порогового уровня для флуоресценции, можно отделить полезный сигнал от шума [42].

На выходе, после детекции лазером, выдается электрофореграмма, которая показывает серию пиков. На горизонтальной оси отложена длина фрагментов, на вертикальной – интенсивность флуоресценции. Также, имеется таблица с данными, показывающая время миграции фрагментов, размер (в парах оснований) каждого пика, его высоту и площадь под ним [42].

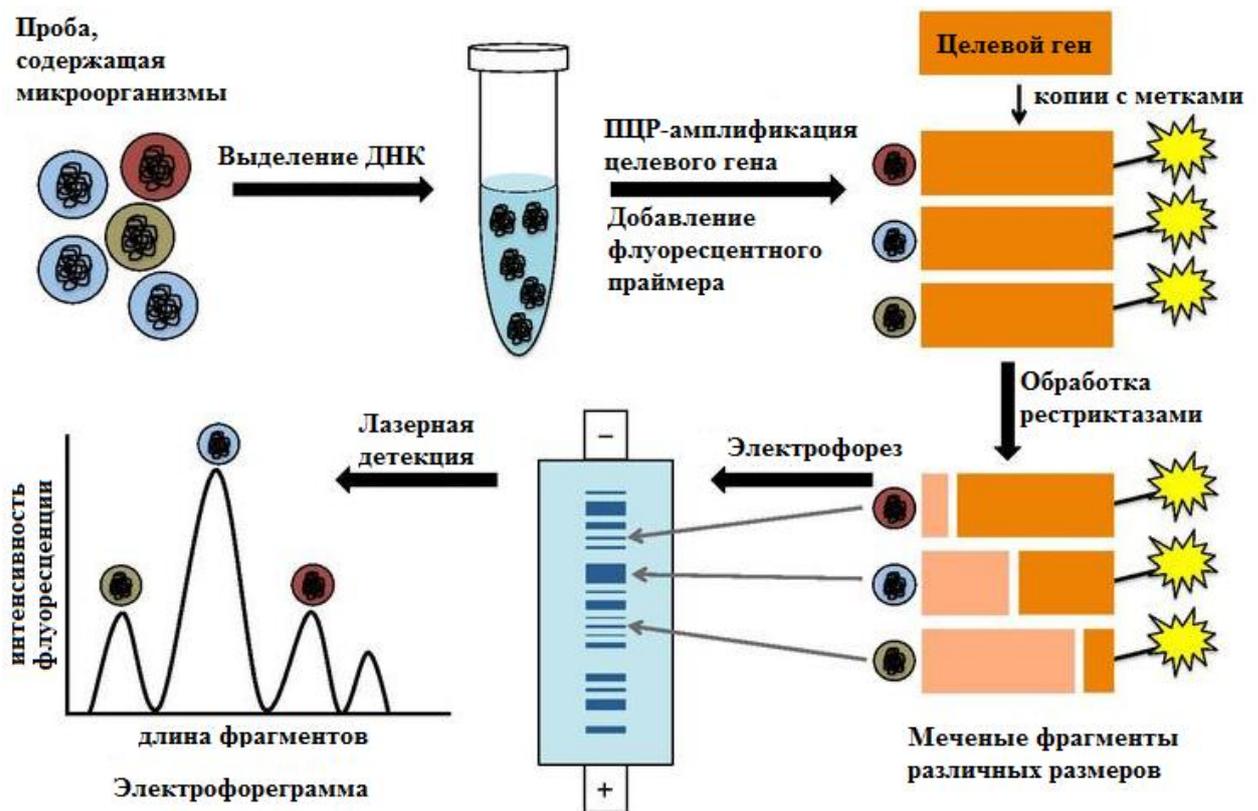


Рисунок 1. Схема T-RFLP-анализа микробного сообщества с 3 флотипами [43].

Теоретически предполагается, что пики в разных позициях вдоль горизонтальной оси представляют различные типы (тип, не в таксономическом смысле) организмов, иначе называемые операционными таксономическими единицами (OTU, operational taxonomic units). Площадь под каждым пиком интенсивности флуоресценции представляет собой относительную долю каждого флотипа в микробном сообществе. Однако, нужно учитывать ряд моментов. Различные организмы могут иметь одинаковый сайт рестрикции в целевом гене. В таком случае, данные организмы не будут разделяться как разные пики на электрофореграмме. Кроме того, площадь под каждым пиком представляет относительную долю, которая может не отражать реальное соотношение представителей сообщества, из-за артефактов измерения и ПРЦ-амплификации. Например, ДНК минорных компонентов микробного сообщества может быть амплифицирована недостаточно, чтобы быть детектированной – то есть не удастся отделить сигнал от шума. Это приводит к недооценке разнообразия в

сообществе. Кроме того описаны другие возможные факторы, которые могут исказить результаты, включая различия в копияности генов между разными видами, артефакты появляющиеся на стадии лизиса клеток и выделения ДНК [41].

Главное достоинство метода T-RFLP – быстрота выполнения анализа и возможность исследования большого количества образцов. Также, визуально представленные результаты анализа упрощают сравнение паттернов структуры сообществ среди различных образцов. Как недостаток можно отметить то, что учитывая вышеоговоренные артефакты, результаты T-RFLP-анализа представляются скорее качественными, нежели количественными. Кроме того метод не дает возможности непосредственной идентификации микроорганизмов в образце [44].

Один из примеров использования T-RFLP – оценка разнообразия микробного сообщества кишечника у двух видов медоносных пчел в Таиланде. Disayathanoowat и соавт. [45] обнаружили, что эти два вида имеют различные микробиомы, которые изменяются в течение жизни пчел. В другом исследовании, Жоо с соавт. [46] использовали метод для мониторинга фитопланктона. Авторы собирали образцы воды из естественных водоемов через определенные промежутки времени. После сравнения терминальных рестрикционных фрагментов, полученных в ходе анализа, с фрагментами из базы данных, они пришли к выводу, что T-RFLP может быть эффективно использован как инструмент мониторинга изменений в фитопланктонном сообществе. Однако, разнообразие и оценки относительной представленности оказались несколько менее точными по сравнению с другими методами, использованными для той же цели.

Сходным с T-RFLP методом является ARDRA (англ. amplified ribosomal DNA restriction analysis) – рестрикционный анализ продуктов амплификации рибосомальной ДНК. На матрице геномной ДНК чистых культур бактерий производится амплификация гена 16S рРНК, полученный амплификат подвергают обработке эндонуклеазами рестрикции, и

полученные фрагменты разделяют при помощи гель-электрофореза. Различные бактерии обладают уникальным паттерном распределения длин рестрикционных фрагментов, благодаря чему возможно производить типирование и идентификацию изолятов [47].

Стоит также упомянуть о генотипировании прокариот с помощью CRISPR локусов. CRISPR-Cas система (от clustered regularly interspaced short palindromic repeats, короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные кластерами) – это система адаптивного иммунитета прокариот, обеспечивающая защиту клетки от чужеродных генетических элементов. В состав CRISPR-Cas системы входят: CRISPR-кассета состоящая из идентичных повторов, чередующихся с уникальными спейсерами и *cas* (от CRISPR-associated) гены [48]. В типичном виде, принцип действия защитного CRISPR-Cas механизма показан на Рисунке 2. CRISPR-кассета транскрибируется как единая незрелая РНК, которая далее подвергается процессингу, результатом которого становится набор коротких РНК (CRISPR-РНК, крРНК). Каждая крРНК состоит из уникального спейсера и двух неполных фрагментов повторов, фланкирующих его. Среди пула CRISPR-РНК находится фрагмент с последовательностью, комплементарной участку чужеродной ДНК или РНК, который в комплексе с Cas-белками связывается с этим участком, именуемым протоспейсером, что приводит к расщеплению чужеродной нуклеиновой кислоты [49]. Приобретение CRISPR-кассетой новых спейсеров называется адаптацией.

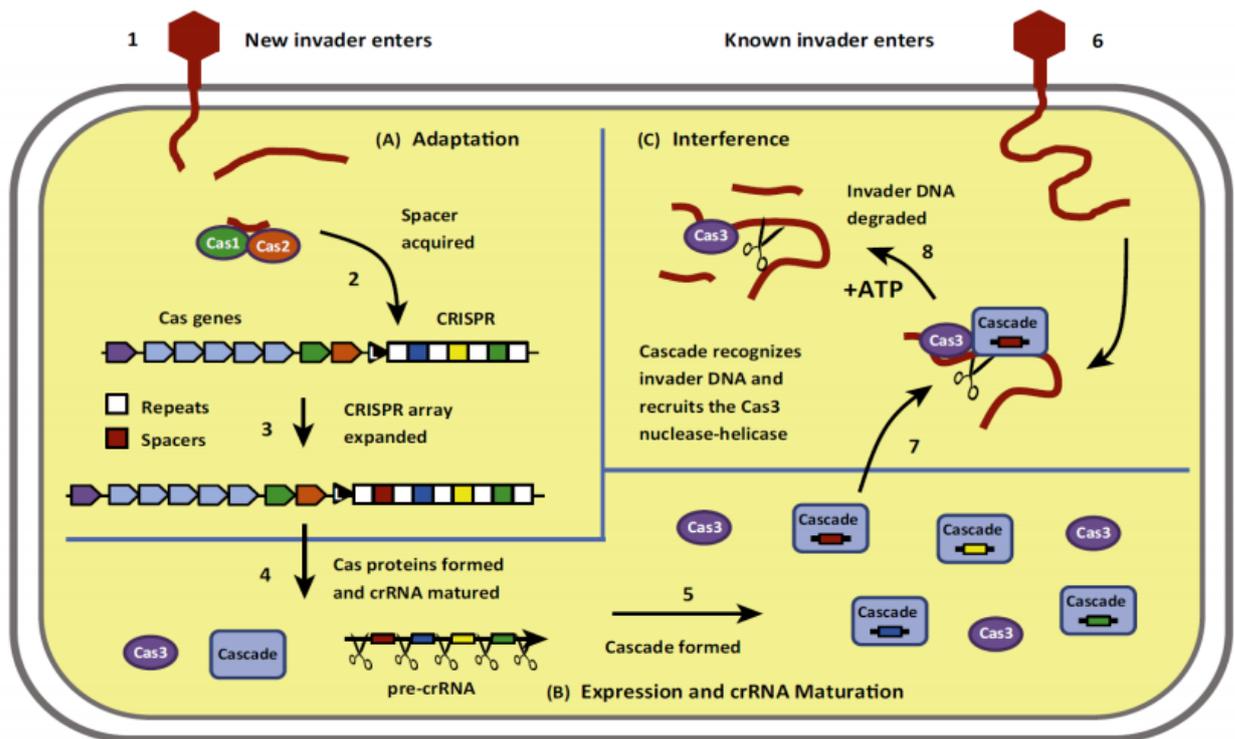


Рисунок 2. Схема работы CRISPR-Cas системы [50].

А. В левой части рисунка показан процесс CRISPR адаптации. После проникновения чужеродного генетического материала внутрь клетки (1) происходит его частичная деградация, в этот момент белки Cas1 и Cas2 связываются с фрагментом чужеродной ДНК и встраивают его в CRISPR-кассету (2). Таким образом кассета удлиняется на один уникальный спейсер и дополнительную копию повтора (3).

В. В нижней части рисунка изображены экспрессия и процессинг CRISPR-РНК. CRISPR-кассета транскрибируется как полноразмерный транскрипт (пре-CRISPR-РНК) (4). Далее белки комплекса Cascade связываются с ним и гидролизуют до коротких РНК (5), каждая из которых остается связанной с комплексом Cascade.

С. В Правой части рисунка показан процесс CRISPR-интерференции. При повторном проникновении ДНК фага в клетку (6) происходит ее комплементарное связывание с комплексом Cascade-CRISPR-РНК, который рекрутирует нуклеазу Cas3 (7). Нуклеаза вносит разрывы в ДНК фага, что приводит к ее деградации (8).

CRISPR-Cas системы обнаружены в геномах 40% бактерий и 90% архей [48]. Количество CRISPR-кассет в геномах варьирует, и составляет от 1 до 18, каждая из которых в среднем содержит 60 уникальных спейсеров, однако их количество может достигать и нескольких сотен [51]. Различные штаммы бактерий, принадлежащие к одному виду, несут уникальные наборы CRISPR-спейсеров. Благодаря этому их используют для типирования близкородственных штаммов бактерий. Данный подход особенно востребован в эпидемиологии, при исследованиях распространения патогенных штаммов таких бактерий как *Mycobacterium tuberculosis*, *Yersinia pestis*, *Salmonella enterica* и др [52,53]. На основе полиморфизма CRISPR-локусов были разработаны различные подходы, например, такие как сполиготайпинг (от spolygotyping, spacer oligonucleotide typing), CRISPR типирование (CRISPR typing), CRISPR-MVLST (multi-virulence-locus sequence typing; мультилокусное секвенирование генов вирулентности в сочетании с секвенированием CRISPR локусов) [54].

Анализ межгенных рибосомных спейсеров - RISA, (или ARISA, в случае автоматизации) от англ. (Automated) Ribosomal Intergenic Spacer analysis. Данный метод основан на существовании последовательностей ДНК (или участков РНК в составе транскриптов), именуемых спейсерами, которыми у прокариот отделяются опероны, либо отдельные гены (межгенные спейсеры). Типичный рибосомный оперон прокариот 16S-23S-5S содержит: соответствующие гены - 16S рРНК, 23S рРНК, 5S рРНК; три транскрибируемых межгенных спейсера (ITS, internal transcribed spacer) – ITS1, ITS2 и ITS3; и в большинстве случаев от одной до нескольких последовательностей, кодирующих тРНК. Структура рибосомного оперона: 16S рРНК – ITS1 – тРНК – ITS2 – 23S – ITS3 – 5S [55] (рисунок 3).

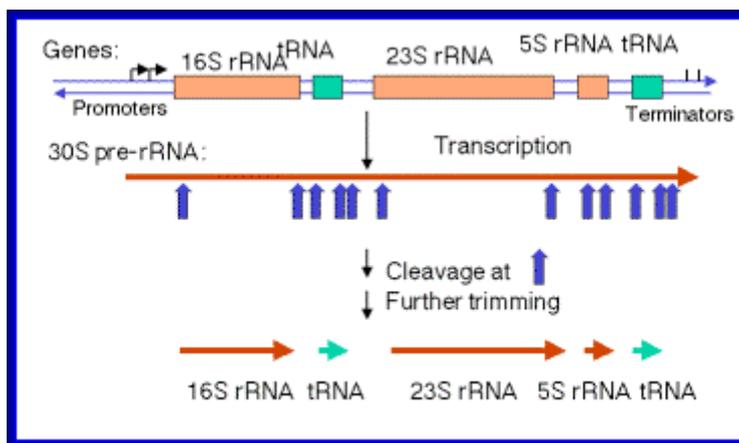


Рисунок 3. Структура рибосомного оперона прокариот [56].

Благодаря тому, что спейсеры не являются кодирующими последовательностями, они обладают высоким полиморфизмом, (в отличие от консервативных генов рРНК), и широко варьируют как в части нуклеотидного состава, так и по длине, что можно использовать как маркер биоразнообразия. В источниках, касающихся (A)RISA под обозначением ITS без нумерации, как правило имеется ввиду весь участок, заключенный между генами 16S рРНК и 23S рРНК, то есть включающий ITS1, гены тРНК и ITS2. Для исследования эукариотического разнообразия аналогично используются ITS1 и ITS2, разделяющие гены рРНК эукариот [55, 57]. В методе (рисунок 4), выделяется тотальная ДНК микробного сообщества, с помощью ПЦР амплифицируется ITS регион, и далее, полученные фрагменты разделяются в геле (RISA), либо, в случае флуоресцентно меченых праймеров, могут быть представлены на электрофореграмме в виде пиков, соответствующих последовательностям разной длины (ARISA) [58, 59].

Таким образом, в RISA информация представляется в виде паттерна полос (ДНК-бэндов), а в ARISA в виде электрофореграммы с набором пиков – аналогично T-RFLP. Яркость флуоресцентно меченых праймеров коррелирует с представленностью соответствующего микроорганизма в сообществе. Паттерн ДНК-бэндов на геле можно интерпретировать как сообщество-специфичный профиль. Каждый бэнд или пик указывает по крайней мере на одного представителя. В RISA, полосы на геле, представляющие ДНК разной длины, принадлежат различным организмам из

сообщества, которые имеют разную длину спейсера, заключенного между консервативными генами 16S и 23S рРНК. Электрофореграмма же показывает пики, коррелирующие с относительной долей этого спейсера в образце [58].

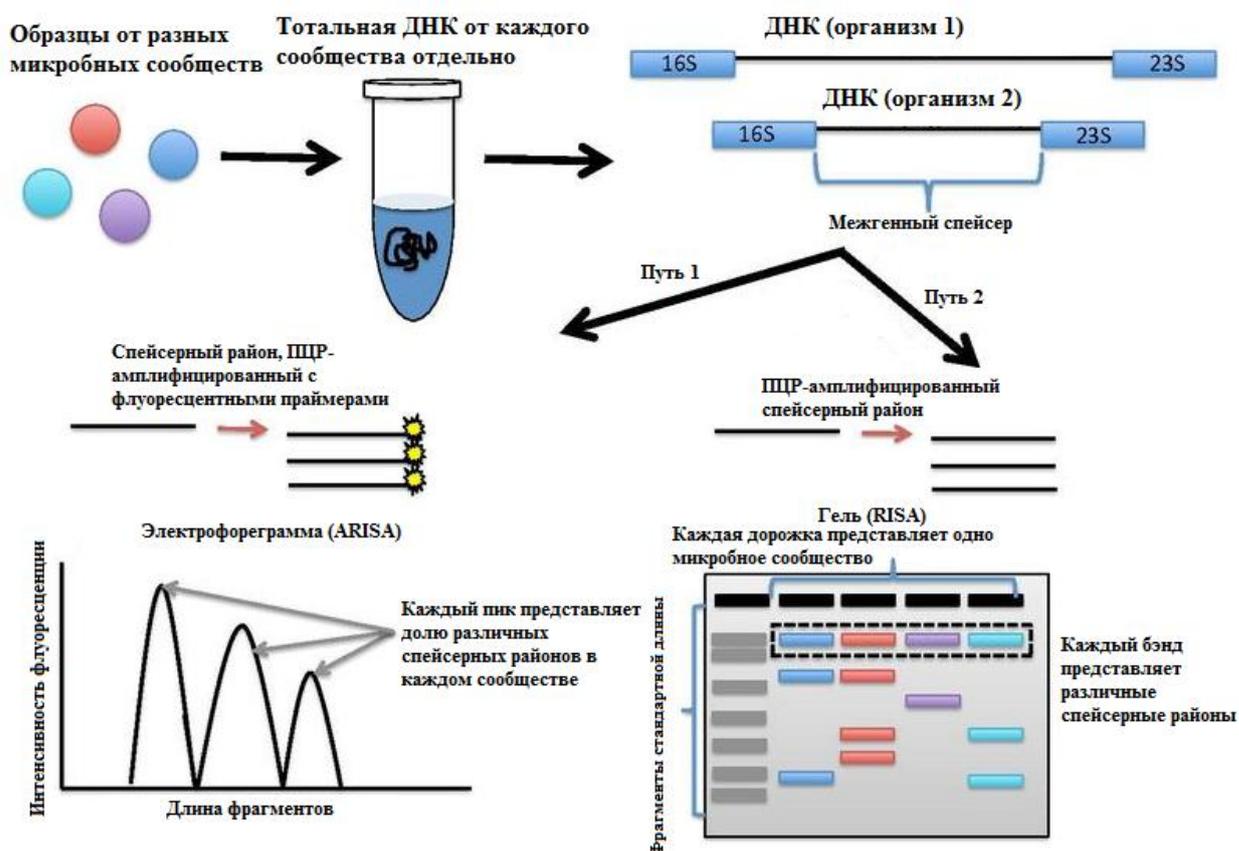


Рисунок 4. Общая схема (A)RISA [43].

ARISA может иметь более высокую разрешающую способность при анализе микробного биоразнообразия по сравнению с T-RFLP [60]. Этот метод фингерпринтинга является быстрым и чувствительным. Наблюдаемые значения длин бэндов могут быть проанализированы в базах данных на предмет совпадения с культивируемыми микроорганизмами. Исследователь может использовать групп-специфичные праймеры для изучения какой-либо конкретной филогенетической группы. Определенным недостатком ARISA является тот факт, что некоторые микроорганизмы могут представлять более одного пика на профиле сообщества. Это происходит по той причине, что часто геном микроорганизма несет в себе несколько рибосомных оперонов, которые могут иметь отличающиеся спейсеры. Обратная ситуация –

неродственные организмы могут иметь слишком близкую длину ITS-фрагмента, недостаточную для разрешения, что приводит к недооценке разнообразия в сообществе. Учитывая эти недостатки, исследователи обычно используют для анализа несколько образцов от каждого сообщества, чтобы получить усредненную оценку [58].

Для примеров использования RISA можно привести обзор Ranjard и соавт. [59] они цитировали исследования, в которых этот метод применялся для профилирования бактериальных сообществ, подверженных действию антибиотиков, ртути, для сообществ почв вырубленных лесов. Также они отметили успешное использование ARISA для характеристики сообществ грибов, которые остаются во многом, не до конца исследованным объектом экологической микробиологии. Еще один пример - Schloss с соавт. [61] провели исследование по изучению изменений в окружающей среде и их связи с изменениями в микробном сообществе компостной кучи. Они использовали ARISA для профилирования структуры сообщества и мониторинга микробной сукцессии на протяжении всех стадий процесса компостирования.

DGGE (англ. denaturing gradient gel electrophoresis), или ДГГЭ, денатурирующий градиентный гель-электрофорез – метод фингерпринтинга сообществ, в котором используется разделение однородных (приблизительно однородных) по размеру фрагментов ДНК за счет свойств, основанных на их нуклеотидном составе. Эти свойства обуславливают порог, при котором ДНК денатурирует. DGGE-гель содержит градиент денатурирующего агента (чаще всего это мочевины, формамид или формальдегид), либо используется линейный температурный градиент [62]. В тот момент, когда фрагмент ДНК достигает своей точки плавления (порог температуры или концентрации денатуранта), он прекращает свое движение [63]. Это обуславливается тем, что в составе одного из праймеров присутствует так называемый GC-кламп из 40 пар нуклеотидов G и C, который препятствует полной денатурации двухцепочечной ДНК (благодаря тому, что G-C-связи более прочные по

сравнению с А-Т-связями), и не до конца денатурировавшие фрагменты дцДНК, соединенные в участке GC-клампа, не могут далее мигрировать. Таким образом после достижения фрагментами точки плавления, происходит их «заякоривание» в геле [64].

Каждая дорожка на DGGE-геле (рисунок 5) представляет одно микробное сообщество. В ее пределах имеются полосы, представляющие собой разделившиеся фрагменты ДНК - бэнды, или флотипы. Если полоса представляет флотип, общий для всех анализируемых сообществ данного исследования, то она будет находиться на одной позиции с аналогичными полосами на других дорожках. Флотипы, не представленные в каких-либо образцах, не будут иметь совпадения по горизонтали на соответствующих дорожках. Чаще всего в DGGE используется фрагмент гена 16S рРНК, в основном из-за того, что филогения микроорганизмов построена на его основе [65].

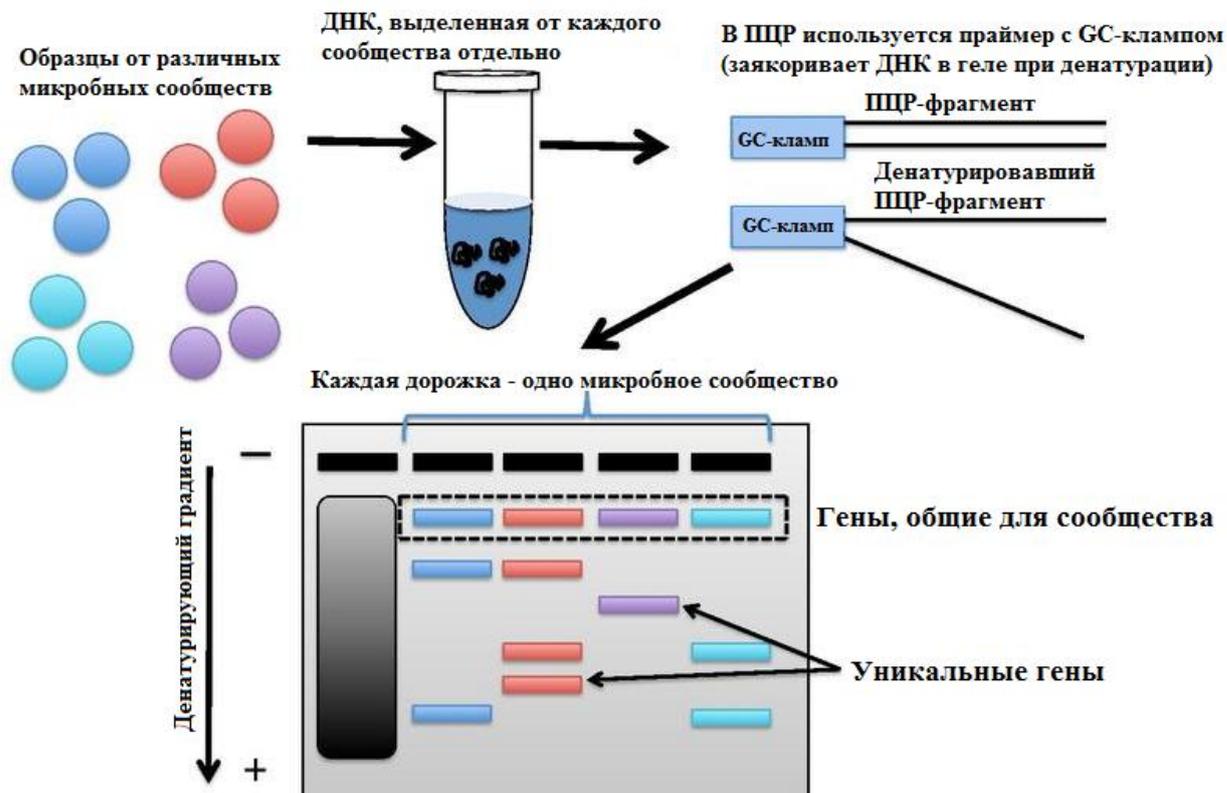


Рисунок 5. Общая схема DGGE [43].

Метод DGGE дает возможность оценить, в какой степени те, или иные микробные сообщества сходны или различны в своем составе. Так как каждый бэнд на геле представляет уникальный флотип, то количество бэндов, присутствующих на дорожке может быть использовано для оценки биоразнообразия в образце. Кроме того, исследователь может вырезать полосы из геля, в целях секвенирования ДНК, и получить информацию о филогенетической принадлежности носителей последовательностей соответствующих бэндов [66, 62].

Метод DGGE служит способом разделения ДНК-фрагментов сходного размера. Это особенно важно в оценке микробного разнообразия благодаря тому, что 16S рРНК не варьирует достаточно широко в размере среди прокариотических таксонов, составляя 1500-1600 пар оснований (1542 п.о. в *E. Coli*). DGGE-гель позволяет быстро оценить биоразнообразие в образце, и не препятствует возможности секвенирования ДНК из нужного бэнда. Основным недостатком DGGE состоит в том, что метод является по своей сути качественным, и с его помощью невозможно получить количественные оценки о численном преобладании каких-либо групп микроорганизмов в образце. А для установления филогенетической принадлежности флотипов, как уже было сказано, необходимо выполнять дополнительные манипуляции. Другой недостаток заключается в том, что CG-клампы, полученные в ходе различных олигонуклеотидных синтезов, отличаются. Было показано, что это может значительно влиять на положение бэндов на геле, более того - потенциально возможны множественные бэнды, принадлежащие одной 16S рРНК последовательности [64, 62].

К ранним известным работам с применением DGGE можно отнести исследование, которое провел Stephen с соавт. [67] Они использовали метод для анализа почвенных протеобактерий. Ими были получены начальные оценки микробного разнообразия в образцах почвы, поддерживаемой на протяжении 36 лет при разных значениях рН. В этом исследовании их внимание было обращено на узкую группу родственных бактериальных

филотипов, среди которых все являлись аммиак-окисляющими β -протеобактериями. Они сочетали DGGE и методы гибридизации с целью получения более детальной информации о естественной популяции. В другой работе, Ward и соавт. [68] изучали сообщества цианобактериальных матов горячих источников Йеллоустонского национального парка (США) используя DGGE-анализ фрагментов гена 16S рРНК. Благодаря этому исследованию удалось взглянуть с новых позиций на биоразнообразие, экологию и эволюцию микроорганизмов.

В настоящей работе для исследования микробных сообществ применяется метод DGGE.

1.3.5. Филогенетические маркеры, используемые в микробной экологии

Также следует упомянуть о филогенетических маркерах. Для выяснения таксономической принадлежности микроорганизмов как правило используют гены домашнего хозяйства. Первоначально, в микробной экологии использовали ген *groV*, кодирующий фрагмент бета-субъединицы прокариотической РНК-полимеразы или ген фактора трансляции Ef-Tu. Данные гены представлены в геномах всех бактерий и архей, и являются высококонсервативными, вероятно, не подвержены горизонтальному переносу, и поэтому пригодны для таксономических исследований сообществ [69]. Однако, с середины 90-х гг. большее распространение стал другой маркер – ген 16S рибосомальной РНК [70].

С развитием высокопродуктивного секвенирования, без типирования по последовательности гена 16S рРНК не обходится ни одно метагеномное исследование. Сейчас, 16S рРНК является главным филогенетическим маркером, и используется всеми биоинформатическими ресурсами и базами данных. Среди распространенных биоинформатических ресурсов стоит отметить Ribosomal Database Project (RDP) [71] и Greengenes database [72].

Как уже упоминалось, длина последовательности гена 16S рРНК

составляет 1500-1600 пар оснований, и состоит как из строго консервативных, так и переменных участков. Чем выше консервативность участка, тем ниже его разрешающая способность при филогенетической идентификации. Поэтому, для филогенетического анализа на уровне вида и рода целесообразно использовать переменные участки гена 16S рРНК. Были проведены исследования разрешающей способности различных участков гена 16S рРНК с использованием энтропийного подхода. Обнаружилось наличие нескольких переменных участков – V2, V3, V4, V5 и V6 [73], которые представлены на рисунке 6.

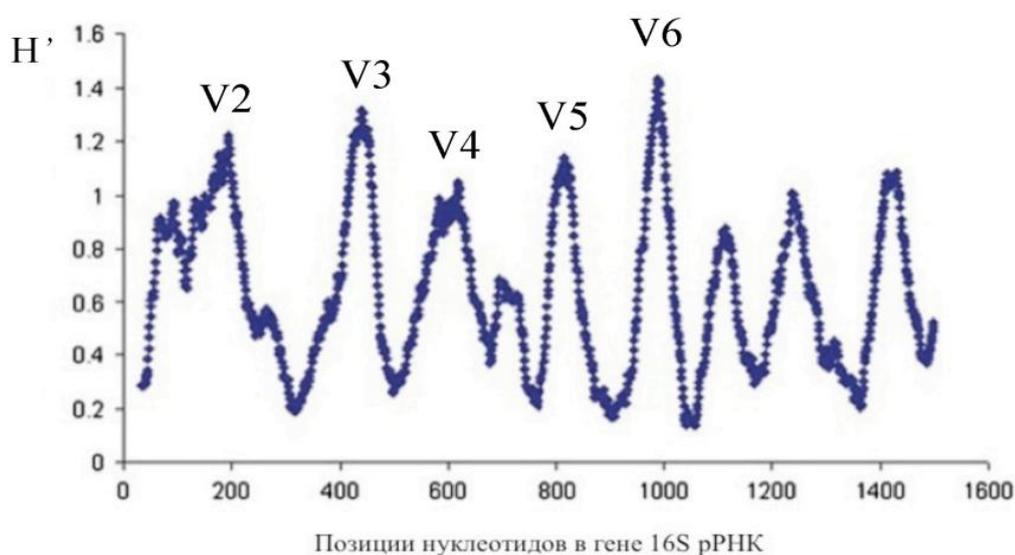


Рисунок 6. Переменные участки гена 16S рРНК. На графике показаны значения энтропии Шеннона (H') в битах для каждой позиции нуклеотида гена 16S рРНК. Значение энтропии рассчитывалось по формуле $H' = - \sum p(x_i) \log_2 p(x_i)$, где $p(x_i)$ – частота i -го нуклеотида [74].

Однако, существует ряд моментов, ограничивающих интерпретацию результатов анализа гена 16S рРНК. Самый серьезный состоит в том, что геном одной бактерии может нести несколько рибосомных оперонов (от 1 до 15, в среднем 4,2). При этом, последовательности гена 16S рРНК в этих оперонах могут отличаться [75]. Хотя в большинстве случаев варьирование не превышает 1%, у бактерии *Aeromonas veronii* среди ее шести копий гена 16S рРНК различие в последовательностях составляет до 1,5% [76], а

Thermobispora bispora имеет две копии, отличающиеся на 6,4% [77]. Таким образом, в отдельных случаях уровень гомологии последовательностей внутри одного генома может быть сопоставим с таковым для уровня отдельных видов или даже родов.

Другое ограничение использования гена 16S рРНК как филогенетического маркера состоит в том, что идентичность последовательностей 16S рРНК двух организмов далеко не гарантирует идентичность остальных частей их геномов. Так, у штаммов *Bacillus globisporus* и *B. psychrophilus* гомология 16S рРНК составляет 99.7%. Однако при определении родства методом гибридизации ДНК, было выявлено, что геномные ДНК двух штаммов гибридизуются между собой лишь на 23-50%. Принято, что штаммы относятся к одному виду при условии, что уровень гибридизации их ДНК превышает 70%. Также, аномально высокий уровень гомологии гена 16S рРНК в пределах одного рода (около 0.03% замен) наблюдается у *Streptococcus*, *Vibrio*, *Escherichia*, *Bacillus*, *Pantoea*, *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Stenotrophomonas* и *Actinomyces* [76]. Таким образом, нужно с осторожностью использовать идентификацию микроорганизмов по последовательности гена 16S рРНК на уровне низших таксонов.

Из вышеприведенных примеров очевидно, что филогенетическая идентификация с использованием гена 16S рРНК – весьма неоднозначна. Первоначально, видовой порог уровня гомологии определялся в 97% [78], далее его увеличили до 98.7-99% [79]. Позже было предложено использовать 99.3% идентичности последовательности гена 16S рРНК для уровня вида, и 95.6% - для рода [75]. Для таксонов более высокого порядка (семейство, класс, филум) границы размыты и устанавливаются отдельно в каждом случае. Используя вышеуказанные оценки уровня сходства, в большинстве случаев (>90%) с помощью анализа гена 16S рРНК удастся определить родовую принадлежность микроорганизма, а в 65-83% случаев – видовую [76]. Также, точность определения таксономической принадлежности

микроорганизма зависит и от длины анализируемой последовательности: чем длиннее последовательность ДНК, тем с большей точностью можно идентифицировать филогенетическое положение организма [71], (рисунок 7).

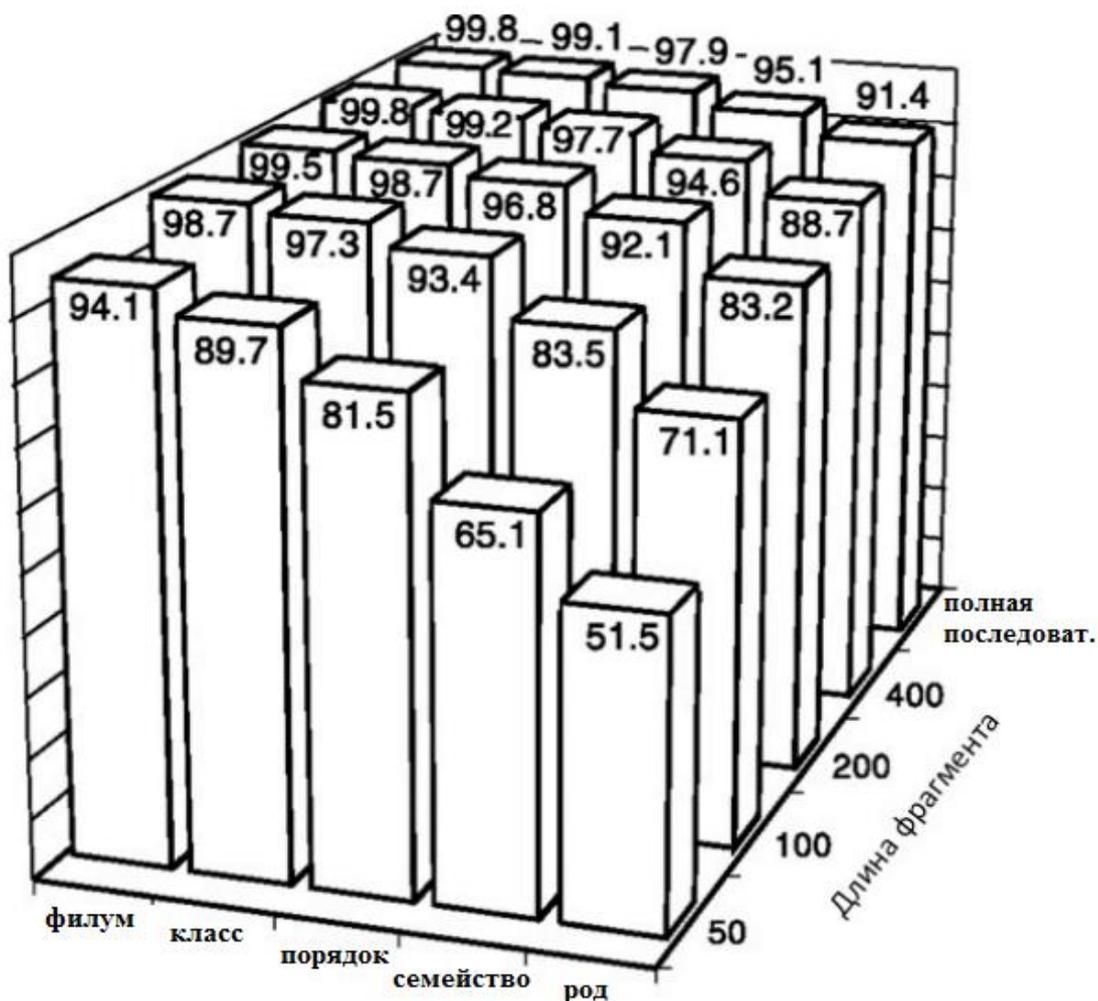


Рисунок 7. Зависимость доли классифицированных фрагментов генов 16S рРНК от длины фрагмента [71]. Цифры в столбцах - доли (%) фрагментов генов 16S рРНК, которые удалось идентифицировать на основании их сравнения с базой данных RDP. На осях отложены длины фрагментов ДНК и названия таксонов.

Серьезной проблемой при попытке определить филогенетическое положение организма являются многочисленные ошибки, содержащиеся в последовательностях ДНК, депонированных в базах данных. Для генов 16S рРНК было показано, что около 3% последовательностей из баз данных

являются химерными, то есть артефактами возникающими, например, в результате ПЦР, когда незрелый ампликон комплементарно присоединяется к нематеринской ДНК-матрице и копируется в последующих циклах реакции. Еще около 2% последовательностей содержат ошибки секвенирования [76]. Кроме того, представленность разных таксонов в базе данных GenBank различна, что весьма неудобно при определении редких таксонов. Большинство депонированных геномов бактерий принадлежат к филуму *Proteobacteria*, (в основном *Gamma**proteobacteria*, *Alphaproteobacteria* и *Betaproteobacteria*), *Firmicutes*, и *Actinobacteria*. Что же касается таких таксонов как *Caldiserica*, *Elusimicrobia*, *Gemmatimonadetes*, *Ignavibacteria*, и *Thermodesulfobacteria*, то на 2013 год они были представлены в базе данных только одним геномом [75].

Таково состояние науки и методов, касающихся изучения биоразнообразия микроорганизмов на момент написания работы. Несомненно, тренд направлен в сторону развития молекулярных (особенно высокопроизводительного и доступного секвенирования) и биоинформационных методов.

1.4. Исследования биоразнообразия бактерий в КШД и засоленных местообитаниях

Среди последних работ, посвященных биоразнообразию КШД следует отметить обзор Celia Mendez-Garcia и соавт. [80] В нем исчерпывающе описано разнообразие бактерий, архей и эукариот, а также их метаболизм и геохимическая роль.

Биоразнообразие в кислых шахтных дренажах представлено организмами, в первую очередь относящимися к доменам *Bacteria*, *Archea* и, в меньшей степени *Eukarya* (как правило, грибы и водоросли). Наиболее изученными в плане состава сообществ являются такие КШД-ассоциированные местообитания, как река Рио Тинто в Юго-Западной

Испании, шахтные дренажи месторождений Iron Mountain mine, (Ричмонд, США), Cae Coch и Mynydd Parys (Великобритания), Carnoules (Франция) Drei Kronen und Ehrt (Германия) и Los Rueldos (Северо-Западная Испания).

Бактерии, населяющие кислые воды, осадки и макроскопические наросты принадлежат преимущественно к типам *Proteobacteria*, *Nitrospirae*, *Actinobacteria*, *Firmicutes*, и *Acidobacteria*.

Proteobacteria весьма широко распространены в кислых экосистемах. Среди родов, обитающих в КШД стоит отметить *Acidithiobacillus* spp., с оптимумом роста при pH 2-3. Эти бактерии обладают хемолитотрофным метаболизмом, и способны окислять Fe^{2+} и соединения серы, либо только соединения серы.

Среди типа *Nitrospirae* наиболее характерным для кислых дренажей родом является *Leptospirillum* spp. Это хемолитоавтотрофы, получающие энергию путем окисления двухвалентного железа. Могут существовать при pH ниже 1, и имеют температурный оптимум 26-40 °C.

Actinobacteria - железо-окисляющие гетеротрофные микроорганизмы, повсеместно распространены в обсуждаемых экосистемах. Наиболее распространенный род – *Acidobacterium*, облигатные гетеротрофы, существующие в диапазоне температур от 2 до 42 °C, с оптимумом 30-35 °C.

Среди типа *Firmicutes* следует отметить род *Sulfobacillus* spp., который предпочитает обитать в теплых КШД-местообитаниях (оптимум роста ок. 45 °C). Обычно это миксотрофы, при автотрофном питании окисляющие Fe^{2+} , серу, или минеральные сульфиды.

Сульфатредуцирующие бактерии (СРБ) – внетаксономическая группа микроорганизмов, встречается в КШД. Это хемоорганотрофы или хемолитотрофы, которые используют сульфат как конечный акцептор. Они составляют физиологически уникальную группу, сочетающую анаэробный транспорт электронов с синтезом АТФ.

Что же касается микробного биоразнообразия местообитаний с

высоким уровнем засоления, то на сегодняшний день среди галофилов домена *Bacteria* известны представители *Cyanobacteria*, *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Spirochaetes*, и *Bacteroidetes* [81]. В обзоре Д. Ю. Сорокина [82] указывается, что в озерах с минерализацией выше 250 г/л практически отсутствует бактериальное разнообразие, но присутствуют археи класса *Halobacteria* филума *Euryarchaeota*. Что же касается умеренно минерализованных (минерализация от 50 до 250 г/л) водоемов, то в них состав микробного сообщества зависит от температурной и кислородной стратификации. В низкоминерализованных (35 – 50 г/л) озерах биоразнообразие прокариот не уступает таковому в пресных. В ряде исследований показано, что бактериопланктон в водоемах с низкой и умеренной минерализацией представлен преимущественно α -протеобактериями (в основном семейство *Rhodobacteraceae*) и γ -протеобактериями (в том числе роды *Halomonas* и *Thioalkalivibrio*), филумами *Firmicutes* (аэробы *Bacillus*, анаэробы *Clostridia*), *Bacteroidetes* (роды *Cytophaga*, *Flexibacter*, *Flavobacterium*, *Bacteroides*, *Salinibacter*), цианобактериальными родами *Arthrospira* и *Anabaenopsis*, и несколькими пурпурными фототрофными бактериями относящимися к семействам *Ectothiorhodospiraceae*, *Chromatiaceae* и *Rhodobacteraceae*.

Метагеномное исследование Charlotte D. Vavourakis и соавт. [83] интересно тем, что оно затрагивает микробное разнообразие в гиперсолевых водоемах Кулундинской степи, которые географически близки к местам отбора проб настоящей работы. В нем состав сообществ анализируется на основе метагеномных ридов, содержащих фрагменты гена 16S рРНК, а также на основе последовательностей гена 16S рРНК, амплифицированных на матрице тотальной ДНК проб. Большинство метагеномных ридов образцов из водоемов с насыщенной рапой (минерализация свыше 250 г/л) принадлежало археям филума *Euryarchaeota* (91%). В образцах из озера с меньшей минерализацией (170 г/л) 34% ридов относилось к филуму *Bacteroidetes*, 33% к γ -протеобактериям и 12% к α -протеобактериям.

Меньшую долю составляли представители *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Cyanobacteria* и неклассифицированные бактерии. *Euryarchaeota* все же составляли заметную (7%) фракцию в сообществе.

Аналогичные результаты получились на основе сиквенсов гена 16S рРНК – в водоеме с более насыщенной рапой были обнаружены в подавляющем большинстве архейные последовательности, тогда как в условиях меньшей минерализации доминировали бактерии. В умеренно минерализованном озере среди операционных таксономических единиц (OTU) относящимся к *Bacteroidetes*, 83% принадлежало роду *Gracilimonas*, 11% и 5% - к семействам *Chitinophagaceae* и *Flavobacteriaceae*, соответственно. Стоит отметить, что представители *Gracilimonas* незначительно присутствовали также среди OTU проб из озер с насыщенной рапой, наряду с археями. Среди α -протеобактерий водоема с минерализацией 170 г/л 63% операционных таксономических единиц относилось к семейству *Rhodobacteraceae* порядка *Rhodobacterales*, и 32% к порядку *Rhizobiales*, без установленной принадлежности к какому-либо семейству. В том же озере были найдены и последовательности γ -протеобактерий, из которых 59% не удалось приурочить к какому-либо известному порядку, 37% относилось к серуоокисляющему роду *Thioalkalivibrio* (порядок *Chromatiales*) и 2% к галофильному роду *Halomonas* (порядок *Oceanospirillales*) [83].

В засоленных почвах наблюдается в целом сходное разнообразие прокариот. Так в метагеномном исследовании микробного сообщества солончаков в Индии среди 145 клонов гена 16S рРНК бактериальной библиотеки преобладали *Actinobacteria* (34 клон), *Firmicutes* (32) и *Proteobacteria* (25). Также заметную долю составляли *Bacteroidetes* (14), *Chloroflexi* (13) и *Acidobacteria* (10). В архейной библиотеке гена 16S рРНК среди классифицированных групп преобладали представители порядка *Halobacteriales* филума *Euryarchaeota* [84].

Главы «2. Материалы и методы» и «3. Доминирующие флотипы в пробах из местообитаний, связанных с добычей металлов и культурах на их основе» изъяты, поскольку являются интеллектуальной собственностью кафедры физиологии растений и биотехнологии ТГУ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе было проведено исследование разнообразия филотипов 16S рРНК *Bacteria* в экстремальных местообитаниях, накопительных культурах и периодической культуре биореактора при помощи денатурирующего градиентного гель-электрофореза. В пробах из местообитаний подверженных техногенному влиянию обнаружены филотипы, достаточно удаленные от их ближайших культивируемых и валидно описанных родственников, что представляет научный интерес.

В полученных на основе проб отходов добычи металлов накопительных культурах были выявлены филотипы, родственные устойчивым к металлам СРБ рода *Desulfosporosinus*, что делает их перспективными для дальнейших исследований. Культивирование в биореакторе показало возможность создания избирательных условий для преимущественного развития целевой группы путем изменения рН среды.

ВЫВОДЫ

1. С помощью ДГГЭ-анализа фрагментов гена 16S рРНК произведена оценка состава микробных сообществ в образцах воды и осадков кислых отходов переработки полисульфидных руд месторождений «Шерловая гора» и «Акатуй», и в образцах воды и почвы вблизи предприятия по добыче сульфата ОАО «Кучуксульфат». В вышеперечисленных пробах обнаружены флотипы, удаленные от известных культивируемых представителей по уровню гомологии 16S рРНК, составляющей 88-91%. Они могут представлять новые неисследованные роды бактерий, для валидного описания которых необходимо получение чистых культур.
2. В накопительных культурах, полученных на основе проб из месторождений «Шерловая гора» и «Акатуй», характеризующихся ацидофильным характером роста, были идентифицированы флотипы, родственные устойчивым к металлам сульфатредуцирующим бактериям рода *Desulfosporosinus*, что делает их перспективными дальнейших исследований.
3. Исследована динамика состава консорциума микроорганизмов в периодической культуре биореактора. Продемонстрирована возможность управляемого изменения микробного состава путем создания селективных условий для преимущественного развития целевой группы с перспективой ее дальнейшего выделения в чистую культуру.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Каравайко Г.И. Биогeотeхнология металлов: Практическое руководство / Г. И. Каравайко, Дж. Росси, А. Агате, С. Грубев, З. А. Авакян - ГКНТ, - М., - 1989. – 375 с.
2. Заварзин Г. А. Развитие микробных сообществ в истории Земли / Г. А. Заварзин // Проблемы доантропогенной эволюции биосферы. - М.: Наука, - 1993. - с. 212-222.
3. Миронова Екатерина Валентиновна. Биосинтетическое получение аналогов бактериородопсина: диссертация на соискание ученой степени кандидата химических наук: 03.00.23. - Москва, - 2002. - 118 с.
4. Barnes, Ivan. Geochemistry of ground water in mine drainage problems / Ivan Barnes, F. E. Clarke // U.S. Geol. Survey Prof. Paper 473-A, – 1964. - p. 6.
5. Смирнов С.С. Зона окисления сульфидных месторождений / С.С. Смирнов - Москва, - Издательство Академии Наук СССР, - 1951. - 334 с.
6. Газизов М. С. Горная энциклопедия. Под редакцией Е. А. Козловского / М. С. Газизов, В. И. Костенко - М.: Советская энциклопедия, - 1984 - 1991.
7. Huisman J.L. Biologically produced sulphide for purification of process streams, effluent treatment and recovery of metals in the metal and mining industry / J.L. Huisman, G. Schouten, C. Schultz // Hydrometallurgy, - 2006. – V. 83(1-4). - p. 106-113.
8. Nordstrom D. K.. Negative pH and extremely acidic mine waters from Iron Mountain / D. K. Nordstrom, C.N. Alpers, C.J. Ptacek, D.W. Blowes // California. Environ. Sci. Technol, - 2000. – V. 34. - p. 254-258.
9. Zuhairi Yaacob, W. A. N. Acid mine drainage and heavy metals contamination at abandoned and active mine sites in Pahang / W. A. N. Zuhairi Yaacob, N. U. R. Syuhadah Mohd Pauzi, H. A. Mutalib, - Bulletin of the

Geological Society of Malaysia, - 2009. - V. 55. - p. 15-20

10. Спенглер О.А. Слово о воде / О. А. Спенглер - Ленинград. Гидрометеоздат, – 1980 г. - 152 с.
11. Herdendorf C.E. Large Lakes of the world / C. E. Herdendorf // IAGLR Central Office, - The University of Michigan. - Michigan, - 1982. - V.8(3). - p.379-412
12. Ганжара, Н.Ф. Почвоведение : Учебник для вузов по агроэкон. спец. / Н.Ф.Ганжара . – М. : Агроконсалт, - 2001 . – 392 с.
13. Еремина И. А. Микробиология: учеб. пособие для студ. вузов / И. А. Еремина ; КемТИПП. - 2-е изд., испр. и доп. - Кемерово : КемТИПП, 2007. - 112 с.
14. Звягинцев Д.Г. Методы почвенной микробиологии и биохимии / Д. Г. Звягинцев - Издательство: МГУ, - 1991 г. - 304 с.
15. Борисов Л. Б. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология: Учебник / Л.Б. Борисов. – М.:Мед информационное агентство, - 2005. - 736 с.
16. Ward D.M. Ribosomal RNA analysis of microorganisms as they occur in nature / D. M. Ward, M. M. Bateson, R. Weller, A. L. Ruff-Roberts // Adv Microb Ecol, - 1992. - № 12. - p.219-286.
17. Hattori T. Advances in soil microbial ecology and the biodiversity / T. Hattori, H. Mitsui, H. Haga, N. Wakao, S. Shikano, K. Gorlach, Y. Kasahara, A. el-Beltagy, R. Hattori // Antonie Van Leeuwenhoek. – 1997. – V. 72(1). - p.21-28.
18. Amann R. I. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation / R. I. Amann, W. Ludwig, K. H. Schleifer // Microbiol. Rev., - 1995. – V. 59(1). - p. 143-169.
19. Manz W. 1992. Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: problems and solutions / W. Manz, R. Amann, W. Ludwig, M. Wagner, K. H. Schleifer // Systematic and Applied Microbiology, – 1992. –V. 15. - p. 593-600.

20. Poulsen L.K. Use of rRNK fluorescence in situ hybridization for measuring the activity of single cells in young and established biofilms / L. K. Poulsen, G. Ballard, D. A. Stahl // *Appl. Microbiol.*, - 1993. - V. 59. - p.1354-1360.
21. Sekiguchi Y. Fluorescence in situ hybridization using 16S rRNA-targeted oligonucleotides reveals localization of methanogens and selected uncultured bacteria in mesophilic and thermophilic sludge granules / Y. Sekiguchi, Y. Kamagata, K. Nakamura, A. Ohashi, H. Harada // *Appl Environ Microbiol.*, - 1999. - V. 65(3). - p.1280-1288.
22. Kalmbach S. Isolation of new bacterial species from drinking water biofilms and proof of their in situ dominance with highly specific 16S rRNA probes / S. Kalmbach, W. Manz, U. Szewzyk // *Appl Environ Microbiol.*, - 1997. - V. 63(11). - p.4164-4170.
23. Embley, T. M. RNA sequence analysis shows that the symbionts in the ciliate *Metopus contortus* are polymorphs of a single methanogen species / T. M. Embley, B. J. Finlay, S. Brown // *FEMS Microbiol Lett*, - 1992. - V.97. - p.57-62.
24. Spring S. Dominating role of an unusual magnetotactic bacterium in the microaerobic zone of a freshwater sediment / S. Spring, R. Amann, W. Ludwig, K. H. Schleifer, H. van Gemerden, N. Petersen // *Appl Environ Microbiol.*, - 1993. - V. 59(8). - p. 2397-2403.
25. Kulesh D. A. Identification of interferon-modulated proliferation-related cDNA sequences / D. A. Kulesh, D. R. Clive, D. S. Zarlenga, J. J. Greene // *Proc Natl Acad Sci U S A.*, - 1987. - V. 84(23). - p. 8453-8457.
26. Stackebrandt E. Molecular Identification, Systematics, and Population Structure of Prokaryotes / E. Stackebrandt - Springer, - Berlin, - Germany, - 2006. - 320 p.
27. Maron P.A. Metaproteomics: a new approach for studying functional microbial ecology / P. A. Maron, L. Ranjard, C. Mougel, P. Lemanceau // *Microbiol. Ecol.*, - 2007. - V. 53. - p. 486-493.

28. Segata N. Computational meta'omics for microbial community studies / N. Segata, D. Boernigen, T. L. Tickle, X. C. Morgan, W. S. Garrett, C. Huttenhowera // *Mol. Syst. Biol.*, – 2013. – V. 9(1). - p. 666
29. Pace N. R. Analyzing natural microbial populations by rRNA sequences / N. R. Pace, D. A. Stahl, D. J. Lane, G. J. Olsen // *ASM News.*, – 1985. – V. 51. – p. 4–12.
30. Handelsman J. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products / J. Handelsman // *Chemistry & biology.*, – 1998. – V. 5. – p. 245-249.
31. Knietsch A. Metagenomes of complex microbial consortia derived from different soils as sources for novel genes conferring formation of carbonyls from short-chain polyols on *Escherichia coli* / A. Knietsch, T. Waschkowitz, S. Bowien, A. Henne, R. Daniel // *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, – 2003. – V. 5. – p. 46-56.
32. Venter J. C. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea / J. C. Venter // *Science.*, – 2004. – V. 304, № 5667. – p. 66-74
33. Blank C. E. Microbial composition of near-boiling silicadepositing thermal springs throughout Yellowstone National Park / C. E. Blank, S. L. Cady, N. R. Pace // *Appl. Environ. Microbiol.*, – 2002. – V. 68. – p. 5123–5135.
34. Maccaferri S. Metagenomics: key to human gut microbiota / S. Maccaferri, E. Biagi, P. Brigidi // *Dig Dis.*, – 2001. – V. 29. – p. 525-530
35. Sharpton T. J. An introduction to the analysis of shotgun metagenomic data / T. J. Sharpton // *Front. Plant. Sci.*, – 2014. – V. 5. – p.1-14.
36. Carvalhais L. C. Application of metatranscriptomics to soil environments / L. C. Carvalhais, P. G. Dennis, G. W. Tyson, P. M. Schenk // *J. Microbiol. Methods.*, – 2012. – V. 91, № 2. – p. 246-251.
37. Logue J. B. Progress in the Ecological Genetics and Biodiversity of Freshwater Bacteria / J. B. Logue, H. Bürgmann, C. T. Robinson //

BioScience., – 2008. – V. 58, № 2. – p. 103-113.

38. Breitling R. Metabolomics for Secondary Metabolite Research / R. Breitling, A. Cenicerros, A. Jankevics, E. Takano // *Metabolites.*, – 2013. – V. 3. – p. 1076-1083.

39. Tang J. Microbial Metabolomics / J. Tang // *Curr. Genomics.*, – 2011. – V. 12, № 6. – p. 391-403.

40. Hultman J. Multi-omics of permafrost, active layer and thermokarst bog soil microbiomes /J. Hultman, M. P. Waldrop, R. Mackelprang, M. M. David, J. McFarland, S. J. Blazewicz, J. Harden, M. R. Turetsky, A. D. McGuire, M. B. Shah, N. C. VerBerkmoes, L. C. Lee, K. Mavrommatis, K. J. Jansson // *Nature Letter research.*, – 2015. – V. 521. – p. 208-212.

41. Liu W. T. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA / W. T. Liu, T. L. Marsh, H. Cheng, L.J. Forney // *Applied and Environmental Microbiology*, – 1997. – V. 63(11). – p. 4517–4522.

42. Osborn A. M. An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics / A. M. Osborn, E.R.B. Moore, K.N. Timmis // *Environmental Microbiology*, - 2000. – V. 2 (1). – p. 39–50.

43. Community fingerprinting [Электронный ресурс] // Wikipedia, the free encyclopedia. URL:
https://en.wikipedia.org/wiki/Community_Fingerprinting

44. Marsh T. L. Culture-independent microbial community analysis with terminal restriction fragment length polymorphism / T. L. Marsh // *Methods in Enzymology*, – 2005. – V. 397. – p. 308–329.

45. Disayathanoowat T. T-RFLP analysis of bacterial communities in the midguts of *Apis mellifera* and *Apis cerana* honey bees in Thailand / T. Disayathanoowat, J.P.W. Young, T. Helgason, P. Chantawannakul // *FEMS Microbiology Ecology*, – 2012. – V. 79. – p. 273–281.

46. Joo S. Monitoring of phytoplankton community structure using terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) / S. Joo, S.R. Lee, S. Park // *Journal of Microbiological Methods*, – 2010. – V. 81. – p. 61–68.
47. Ingianni A. Genotypic differentiation of *Gardnerella vaginalis* by amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) / A. Ingianni, S. Petruzzelli, G. Morandotti, R. Pompei // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, – 1997. – V. 18. – p. 61-66.
48. Bhaya D. CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation / D. Bhaya, M. Davison, R. Barrangou // *Annu. Rev. Genet.*, – 2011. – V. 45. – p. 273-297.
49. Brouns S. J. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes / S. J. Brouns, M. M. Jore, M. Lundgren, E. R. Westra, R. J. Slijkhuis, A. P. Snijders, M. J. Dickman, K. S. Makarova, E. V. Koonin, J. van der Oost // *Science.*, – 2008. – V. 321. – p. 960-964.
50. CRISPR-Cas – small RNA based Adaptive Immunity in Prokaryotes [Электронный ресурс] // Wageningen UR. URL: <https://www.wageningenur.nl/en/show/CRISPRCas-small-RNA-based-AdaptiveImmunity-in-Prokaryotes.htm>
51. Marraffini L. A. CRISPR interference: RNS-directed adaptive immunity in bacteria and archaea / L. A. Marraffini, E. J. Sontheimer // *Nature Rev. Genet.*, – 2010. – V. 11. – p. 181-190.
52. Gori A. Spoligotyping and *Mycobacterium tuberculosis* / A. Gori, A. Bandera, G. Marchetti, A. D. Esposti, L. Catozzi, G. P. Nardi, L. Gazzola, G. Ferrario, J. D. A. Embden, D. Soolingen, M. Moroni, F. Franzetti // *Emerging Infectious Diseases.*, – 2005. – V. 11, № 8. – p. 1242-1248.
53. Fabre L. CRISPR typing and subtyping for improved laboratory surveillance of *Salmonella* infections / L. Fabre, J. Zhang, G. Guigon, S. Le Hello, V. Guibert, M. Accou-Demartin, S. Romans, C. Lim, C. Roux, V. Passet, L. Diancourt, M. Guibourdenche, S. Issenhuth-Jeanjean, M. Achtman, S. Brisse, C. Sola, F. X. Weill // *PLoS One*. – 2012. – V. 7, № 5. – p. e36995.

54. Shariat N. CRISPRs: molecular signatures used for pathogen subtyping / N. Shariat, E. G. Dudley // *Appl. Environ. Microbiol.*, – 2014. – V. 80, № 2. – p. 430-439.
55. Nierhaus K. H. Protein Synthesis and Ribosome Structure: Translating the Genome / K. H. Nierhaus, D. N. Wilson - WILEY-VCH Verlag GmbH&Co.: Weinheim, - Germany, - 2004. - p. 579.
56. Gene Expression and Protein Synthesis [Электронный ресурс] // Center for Comparative Genomics and Bioinformatics. URL: <http://www.bx.psu.edu/~ross/workmg/RNAProcessingCh12.htm>
57. Osorio C. R. Variation in 16S-23S rRNA intergenic spacer regions in *Photobacterium damsela*: a mosaic-like structure / C. R. Osorio, M. D. Collins, J. L. Romalde, A. E. Toranzo // *Appl Environ Microbiol.*, – 2005 V.71(2). – p.636-645.
58. Fisher M. M. Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities / M. M. Fisher, E.W. Triplett // *Applied and Environmental Microbiology*, – 1999. – V. 65. – p. 4630–4636.
59. Ranjard L. Characterization of bacterial and fungal soil communities by automated ribosomal intergenic spacer analysis fingerprints: biological and methodological variability / L. Ranjard, F. Poly, J.C. Lata, C. Mougél, J. Thioulouse, S. Nazaret // *Applied and Environmental Microbiology*, – 2001. – V.67. – p.4479–4487.
60. Danovaro R. Comparison of two fingerprinting techniques, terminal restriction fragment length polymorphism and automated ribosomal intergenic spacer analysis, for determination of bacterial diversity in aquatic environments / R. Danovaro, G. M. Luna, A. Dell'Anno, B. Pietrangeli // *Applied and Environmental Microbiology*, – 2006. – V.72. – p.5982–5989.
61. Schloss P. D. Tracking temporal changes in bacterial community fingerprints during the initial stages of compostin / P. D. Schloss, A.G. Hay, D.B. Wilson, L.P. Walker // *FEMS Microbiology Ecology*, - 2003. – V.46. –

p.1–9

62. Muyzer G. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems / G. Muyzer // *Current Opinion in Microbiology*, - 1999. – V.2. – p.317–322.

63. Fischer S.G. DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRN / S. G. Fischer, L.S. Lerman // *PNAS*, – 1983. – V.80(6). – p.1579–1583.

64. Rettedal E.A. GC-clamp primer batches yield 16S rRNA gene amplicon pools with variable GC clamps, affecting denaturing gradient gel electrophoresis profiles / E. A. Rettedal, S. Clay, V. S. Brözel // *FEMS Microbiology Letters*, – 2010. – V.312. – p.55–62.

65. Muyzer G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRN / G. Muyzer, E.C. De Waal, A.G. Uitterlinden // *Applied and Environmental Microbiology*, – 1993. - V.59. – p.695–700.

66. Madigan M.T. Brock *Biology of Microorganisms* (12th ed.) / M. T. Madigan, J.M. Martinko, P.V. Dunlap, D.P. Clark // San Francisco, CA: Pearson Education Inc., - 2009. – p. 1168

67. Stephen, J.R. Analysis of β -subgroup Proteobacterial ammonia oxidizer populations in soil by denaturing gradient gel electrophoresis analysis and hierarchical phylogenetic probing / J. R. Stephen, G. A. Kowalchuk, M-A. V. Bruns, A. E. McCaig, C. J. Phillips, T. M. Embley, J. I. Prosse // *Applied and Environmental Microbiology*, – 1998. – V.64. – p.2958–2965.

68. Ward D.M. A natural view of microbial biodiversity within hot spring cyanobacterial mat communities / D. M. Ward, M. J. Ferris, S. C. Nold, M. M. Bateson // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, – 1998 – V.62. - p.1353–1370.

69. Adékambi T. The rpoB gene as a tool for clinical microbiologists /

T. Adékambi, M. Drancourt, D. Raoult // *Trends Microbiol.*, – 2009. – V. 17. № 1. – p. 37-45.

70. Pei A. Y. Diversity of 16S rRNA genes within individual prokaryotic genomes / A. Y. Pei, W. E. Oberdorf, C. W. Nossa, A. Agarwal, P. Chokshi, E. Gerz, Z. Jin, P. Lee, L. Yang, M. Poles, S.M. Brown, S. Sotero, T. Desantis, E. Brodie, K. Nelson, Z. Pei // *Appl. Environ. Microbiol.*, – 2010. – V. 76. № 12. – p. 3886-3897.

71. Wang Q. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy / Q. Wang, G. M. Garrity, J. M. Tiedje, J. R. Cole // *Appl. Environ. Microbiol.*, – 2007. – V. 73, № 16. – p. 5261-5267.

72. DeSantis T. Z. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB / T. Z. DeSantis, P. Hugenholtz, N. Larsen, M. Rojas, E. L. Brodie, K. Keller, T. Huber, D. Dalevi, P. Hu, G. L. Andersen // *Appl. Environ. Microbiol.*, – 2006. – V. 72. – p. 5069-72.

73. Shah N. Comparing bacterial communities inferred from 16S rRNA gene sequencing and shotgun metagenomics / N. Shah, H. Tang, T. G. Doak, Y. Ye // *Pac. Symp. Biocomput.*, – 2011. – p. 165-176.

74. Andersson A. F. Comparative analysis of human gut microbiota by barcoded pyrosequencing / A. F. Andersson, M. Lindberg, H. Jakobsson, F. Backhed, P. Nyren, L. Engstrand // *PLoS One.*, – 2008. – V. 3. – p. e2836.

75. Větrovský T. The variability of the 16S rRNA gene in bacterial genomes and its consequences for bacterial community analyses / T. Větrovský, P. Baldrian // *PLoS One.*, – 2013. – V. 8. № 2. – p. e57923.

76. Janda J. M. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls / J. M. Janda, S.L. Abbott // *J. Clin. Microbiol.*, – 2007. – V. 45. № 9. – p. 2761–2764.

77. Wang Y. The actinomycete *Thermobispora bispora* contains two distinct types of transcriptionally active 16S rRNA genes / Y. Wang, Z. Zhang,

N. Ramanan // *J. Bacteriol.*, – 1997. – V. 179. № 10. – p. 3270–3276.

78. Stackebrandt E. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology / E. Stackebrandt, B. M. Goebel // *Int. J. Syst. Bacteriol.*, – 1994. – V. 44. – p. 846-849.

79. Stackebrandt E. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards / E. Stackebrandt, J. Ebers // *Microbiol. Today.*, – 2006. – V. 2006. – p. 153-155.

80. Mendez-Garcia C. Microbial diversity and metabolic networks in acid mine drainage habitats / C. Mendez-Garcia, A. I. Pelaez, V. Mesa, J. Sanchez, O. V. Golyshina, M. Ferrer // *Front Microbiol.*, – 2015 – V.6. – p.475.

81. Oren A. Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity / A. Oren // *Saline Systems.*, - 2008. – V.4. - p.2.

82. Sorokin D.Y. Microbial diversity and biogeochemical cycling in soda lakes / D. Y. Sorokin, T. Berben, E. D. Melton, L. Overmars, C. D. Vavourakis, G. Muyzer // *Extremophiles.*, – 2014. – V.18(5). – p.791-809.

83. Vavourakis C.D. Metagenomic Insights into the Uncultured Diversity and Physiology of Microbes in Four Hypersaline Soda Lake Brines / C. D. Vavourakis // *Front Microbiol.*, - 2016. – V.25;7. – p.211.

84. Keshri J. Microbial population index and community structure in saline–alkaline soil using gene targeted metagenomics /J. Keshri, A. Mishra, B. Jha // *Microbiological research*, – 2013. –V.168 (3). – p.165-173.

85. Cline J. D. Spectrophotometric determination of hydrogen sulfide in natural waters / J. D. Cline // *Limnol. Oceanogr.*, - 1969. - V.14.- p.454-458.

86. Баталин Ю. В. Горная энциклопедия / Ю. В. Баталин. — М.: Советская энциклопедия. - Под редакцией Е. А. Козловского. - 1984—1991.

87. Евграфова В. И. Химический состав соленых озер Кулундинской равнины [Электронный ресурс] / В. И. Евграфова; науч.

рук. М. Н. Колпакова // Проблемы геологии и освоения недр : труды XVIII Международного симпозиума имени академика М. А. Усова студентов и молодых ученых, Томск, 7-11 апреля 2014 г. в 2 т. / Национальный исследовательский Томский политехнический университет (ТПУ), Институт природных ресурсов (ИПР) ; Общество инженеров-нефтяников, международная некоммерческая организация, Студенческий чаптер ; под ред. А. Ю. Дмитриева . — Т. 1 . — С. 513-551] .

88. National Center for Biotechnology Information [Электронный ресурс]. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

89. BioEdit Sequence Alignment Editor for Windows 95/98/NT/XP/Vista/7 [Электронный ресурс] // Brown Lab Web Server. URL: <http://jwbrown.mbio.ncsu.edu>

90. Sass A. *Desulfobulbus mediterraneus* sp. nov., a sulfate-reducing bacterium growing on mono- and disaccharides [Текст] / A. Sass, H. Rutters, H. Cypionka, H. Sass // *Arch Microbiol.*, – 2002. – V. 177(6). – p. 468-474.

91. Kaksonen A. H. Simple organic electron donors support diverse sulfate-reducing communities in fluidized-bed reactors treating acidic metal- and sulfate-containing wastewater [Текст] / A. H. Kaksonen, J.J. Plumb, P.D. Franzmann, J.A. Puhakka // *FEMS Microbiol. Ecol.*, – 2004. – V. 47. – p. 279-289.

92. Sanchez-Andrea I. Sulfate reduction at low pH to remediate acid mine drainage [Текст] / I. Sanchez-Andrea, J.L. Sanz, M.F.M. Bijmans, A.J.M. Stams // *Journal of Hazardous Materials.*, – 2014. – V. 269. – p. 98-109.

93. Bakir M.A. *Bacteroides dorei* sp. nov., isolated from human faeces [Текст] / M. A. Bakir, Sakamoto M., Kitahara M., Matsumoto M., Benno Y. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, – 2006. – V. 56(7). – p. 1639-43.

94. Ogilvie L. A. Comparative (meta)genomic analysis and ecological profiling of human gut-specific bacteriophage ϕ B124-14 [Текст] / L. A. Ogilvie, Caplin J., Dedi C., Diston D., Cheek E., Bowler L., Taylor H., Ebdon

J., Jones B.V. // PLoS One., – 2012. – V. 7(4). – P. e35053.

95. Smith C.J. The medically important *Bacteroides* spp. in health and disease [Текст] / C. J. Smith, E. R. Rocha, B. J. Paster // *The Prokaryotes, an Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community*, Edited by M. Dworkin. – New York: Springer., – 2005.

96. Labrenz M. Sulfate-reducing bacteria-dominated biofilms that precipitate ZnS in a subsurface circumneutral-pH mine drainage system [Текст] / M. Labrenz, J.F. Banfield // *Microbial Ecology*, – 2004. – V. 47. – p. 205–217.

97. Kuever J. Genome analysis of *Desulfotomaculum gibsoniae* strain GrollT a highly versatile Gram-positive sulfate-reducing bacterium [Текст] / J. Kuever, M. Visser, C. Loeffler, M. Boll, P. Worm, D.Z. Sousa, C.M. Plugge, P.J. Schaap, G. Muyzer, I.A.C. Pereira, S.N. Parshina, L.A. Goodwin, N.C. Kyrpides, J.Detter, T.Woyke, P. Chain, K.W. Davenport, M. Rohde, S. Spring, H.- P. Klenk, A.J.M. Stams // *Standards in Genomic Sciences*, – 2014. – V. 9. – p. 821-839.

98. Kaksonen A.H. *Desulfurispora thermophila* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, spore-forming sulfate-reducer isolated from a sulfidogenic fluidized-bed reactor [Текст] / A. H. Kaksonen, S. Spring, P. Schumann, R. M. Kroppenstedt, J. A. Puhakka // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, – 2007. – V. 57(5). – p. 1089-1094.

99. Robertson W.J. *Desulfosporosinus meridiei* sp. nov., a spore-forming sulfate-reducing bacterium isolated from gasoline-contaminated groundwater [Текст] / W. J. Robertson, J. P. Bowmann, P. D. Franzmann, B. J. Mee // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, – 2001. – V. 51. - p. 133-140.

100. Ramamoorthy S. *Desulfosporosinus lacus* sp. nov., a sulfate-reducing bacterium isolated from pristine freshwater lake sediments [Текст] / S. Ramamoorthy, H. Sass, H. Langner, P. Schumann, R. M. Kroppenstedt, S. Spring, J. Overmann, R. F. Rosenzweig // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, – 2006. – V. 56(12). – p. 2729-2736.

101. Ueki A. *Paludibacter propionicigenes* gen. nov., sp. nov., a novel strictly anaerobic, Gram-negative, propionate-producing bacterium isolated from plant residue in irrigated rice-field soil in Japan / A. Ueki, H. Akasaka, D. Suzuki, K. Ueki // *Int J Syst Evol Microbiol.*, – 2006. – V.56(Pt 1). – p.39-44.
102. Medeiros J.D. Taxonomic and functional diversity of microbial community from a mining environment / J. D. Medeiros, L. R. Leite, S. Cuadros-Orellana, G. Oliveira // *BMC Bioinformatics*, – 2015. – V. 16(Suppl 8): A3.
103. Karnachuk O.V. Copper resistance in *Desulfovibrio* strain R2 / O. V. Karnachuk, S. Y. Kurochkina, D. Nicomrat, Yu. A. Frank, D. A. Ivasenko, E. A. Phyllipenko, O. H. Tuovinen // *Antonie van Leeuwenhoek.*, - 2003. - V. 83. - p. 99-106.
104. Карначук О. В. Образование и растворение серосодержащих минералов сульфатредуцирующими бактериями: Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук. – Томск, 2006. – 200 с.
105. Kodama Y. *Sulfurospirillum cavolei* sp. nov., a facultatively anaerobic sulfur-reducing bacterium isolated from an underground crude oil storage cavity / Y. Kodama, L. T. Ha, K. Watanabe // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, - 2007, - V.57. – p.827-831.
106. Luijten M. L. Description of *Sulfurospirillum haloinspirans* sp. nov., an anaerobic, tetrachloroethene-respiring bacterium, and transfer of *Dehalospirillum multivorans* to the genus *Sulfurospirillum* as *Sulfurospirillum multivorans* comb. nov. / M. L. Luijten, J. de Weert, H. Smidt, H. T. Boschker, W. M. de Vos, G. Schraa, A. J. Stams // *Int J Syst Evol Microbiol.*, – 2003. - V.53(Pt 3). – p.787-793.
107. Mogensen, G. L. *Desulfovibrio aerotolerans* sp. nov., an oxygen tolerant sulphate-reducing bacterium isolated from activated sludge / G. L. Mogensen, K. U. Kjeldsen, K. Ingvorsen // *Anaerobe.*, – 2005. – V.11. – p.339-349.

108. Allen T. D. *Desulfovibrio carbinoliphilus* sp. nov., a benzyl alcohol-oxidizing, sulfate-reducing bacterium isolated from a gas condensate-contaminated aquifer / T. D. Allen, P. F. Kraus, P. A. Lawson, G. R. Drake, D. L. Balkwill, R. S. Tanner // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, - 2008, - V.58, - p.1313-1317.
109. Willscher S. Solubilization of heavy metals from a fluvial AMD generating tailings sediment by heterotrophic microorganisms / S. Willscher, C. Pohle, J. Sitte, P. Werner // *Journal of Geochemical Exploration*, - 2007. – V.92(2-3), - p.177-185.
110. Towner K. J. *The Biology of Acinetobacter: Taxonomy, Clinical Importance, Molecular Biology, Physiology, Industrial Relevance* // K. J. Towner, E. Bergogne-Bérézin, C. A. Fewson // *F.E.M.S. Symposium Series*. Springer., – 1991. – V.83(2), - p.240
111. Sass H. *Desulfovibrio idahonensis* sp. nov., sulfate-reducing bacteria isolated from a metal(loid)-contaminated freshwater sediment / H. Sass, S. Ramamoorthy, C. Yarwood, H. Langner, P. Schumann, R. M. Kroppenstedt, S. Spring, R. F. Rosenzweig // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, – 2009. – V.59. – p.2208-2214.
112. Yong P. Bioreduction and biocrystallization of palladium by *Desulfovibrio desulfuricans* NCIMB 8307 / P. Yong, N. A. Rowson, J. P. Farr, I. R. Harris, L. E. Macaskie // *Biotechnol Bioeng*, - 2002. - V80, - p.369– 379.
113. Vandamme P. Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found / P. Vandamme, T. Coenye // *Int J Syst Evol Microbiol*, – 2004. – V.54. - p.2285–2289.
114. Elberson M. A. *Cellulomonas persica* sp. nov. and *Cellulomonas iranensis* sp. nov., mesophilic cellulose-degrading bacteria isolated from forest soils / M. A. Elberson, F. Malekzadeh, M. T. Yazdi, N. Kameranpour, M. R. Noori-Dalooi, M. H. Matte, M. Shahamat, R. R. Colwell, K. R. Sowers // *Int J Syst Evol Microbiol*, – 2000. – V.50 Pt 3. - p. 993-996.

115. Sani R. K. Dissimilatory reduction of Cr(VI), Fe(III), and U(VI) by *Cellulomonas* isolates / R. K. Sani, B. M. Peyton, W. A. Smith, W. A. Apel, and J. N. Peterson // *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, – 2002. – V.60. – p.192-199.
116. White R. A. III. Draft genome sequence of *Exiguobacterium pavilionensis* strain RW-2, with wide thermal, salinity, and pH tolerance, isolated from modern freshwater microbialites / R. A. White III, C. J. Grassa, C. A. Suttle // *Genome Announc.*, – 2013. – V.1(4) – p.e00597-13.
117. Nogi Y. Characterization of alkaliphilic *Bacillus* strains used in industry: proposal of five novel species / Y. Nogi, H. Takami, K. Horikoshi // *Int J Syst Evol Microbiol.*, – 2005. – V.55(Pt 6) – p.2309-2315.
118. Melentiev A.I. Characterization of Novel Alkaliphilic Isolate of *Bacillus mannanilyticus*, Strain IB-OR17, Displaying Chitinolytic and Antifungal Activities / A. I. Melentiev, N. F. Galimzianova, E. A. Gilvanova, E. A. Shchelchkova, L. Yu. Kuzmina, T. F. Boyko, N. G. Usanov, G. E. Aktuganov // *Advances in Microbiology.*, – 2014. – V. 4. - p. 455-464.
119. Brooke C. J. *Erysipelothrix rhusiopathiae*: bacteriology, epidemiology and clinical manifestations of an occupational pathogen / C. J. Brooke, T.V. Riley // *J. Med. Microbiol.*, - 1999. - V.48. – p.789-799.
120. Yang S.H. *Brumimicrobium mesophilum* sp. nov., isolated from a tidal flat sediment, and emended descriptions of the genus *Brumimicrobium* and *Brumimicrobium glaciale* / S. H. Yang, H. S. Seo, H. M. Oh, S. J. Kim, J. H. Lee, K. K. Kwon // *Int J Syst Evol Microbiol.*, – 2013. – V.63(Pt 3). – p.1105-1110.
121. Wang Y.X. *Gracilimonas mengyeensis* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from a salt mine in Yunnan, south-western China. / Y. X. Wang, Y. P. Li, J. H. Liu, W. Xiao, Y. H. Lai, Z. Y. Li, Z. G. Ding, M. L. Wen, X. L. Cui // *Int J Syst Evol Microbiol.*, – 2013. - V.63(Pt 11). – p.3989-3993.
122. Garrity G. M. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Volume Two: The Proteobacteria, Part C: The Alpha-, Beta-, Delta-, and

Epsilonproteobacteria / G. M. Garrity, D. J. Brenner, N. R. Krieg, J. T. Staley (eds.) // New York: Springer., – 2005. - pp. 354–361.

123. Banerjee M. R., Yesmin L. Sulfur-oxidizing plant growth promoting rhizobacteria achromobacter piechaudii (ray12) for enhanced canola performance. W.O. Pat. 2003057861-A2. 2003

124. Saitou N. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees / N. Saitou, M. Nei // *Molecular Biology and Evolution*, – 1987. – V.4(4). - p.406-425.

125. Bernardet J. F. Family I. Flavobacteriaceae / J. F. Bernardet // *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edn, edited by N. R. Krieg, W. Ludwig, W. B. Whitman, B. P. Hedlund, B. J. Paster, J. T. Staley, N. Ward, D. Brown & A. Parte. New York: Springer., - 2011. – V.4. - p.106–111.

126. Ibanez J.G. Environmental Chemistry / J.G. Ibanez, M. Hernandez-Esparza, C. Doria-Serrano, A. Fregoso-Infante, M. M. Singh // *Fundamentals*. Springer, New York, - 2007. – 334 p.

Благодарности

Автор хотел бы выразить благодарность своему научному руководителю - заведующей кафедрой физиологии растений и биотехнологии ТГУ Ольге Викторовне Карначук, за ее руководство, подачу важных идей, реализованных в исследованиях, и ценные критические замечания касающиеся данной диссертации. Также автор выражает большую признательность старшему научному сотруднику лаборатории биохимии и молекулярной биологии БИ ТГУ Анне Леонидовне Герасимчук и доценту кафедры Юлии Александровне Франк за их непосредственную помощь и советы.

Введите текст:

...или загрузите файл:

Файл не выбран...

Выбрать файл...

Укажите год публикации: 2016 ▾

Выберите коллекции

Все

Рефераты

Авторефераты

Иностранные конференции

Википедия

Российские конференции

Иностранные журналы

Российские журналы

Энциклопедии

Англоязычная википедия

Анализировать

Обработан файл:

Магистерская диссертация Игошин А. В.PDF.

Год публикации: 2016.

Оценка оригинальности документа - 99.17%

Процент условно корректных заимствований - 0.0%

Процент некорректных заимствований - 0.83%

Время выполнения: 28 с.

Документы из базы

Источники заимствования

	Источники
В списке литературы	Заимствования

1. Сульфатредуцирующие бактерии в экосистемах с экстремальными значениями pH (<http://dlib.rsl.ru/loader/view/01003485742?get=pdf>)

Авторы: Герасимчук, Анна Леонидовна.

Год публикации: 2009. Тип публикации: автореферат диссертации.

<http://dlib.rsl.ru/loader/view/01003485742?get=pdf> (<http://dlib.rsl.ru/loader/view/01003485742?get=pdf>)

[Показать заимствования \(5\)](#)
 0.47%

2. Выделение и изучение сульфатредуцирующих бактерий из экосистем, подверженных влиянию металлургических предприятий (<http://dlib.rsl.ru/loader/view/01003281722?get=pdf>)

Авторы: Франк, Юлия Александровна.

Год публикации: 2006. Тип публикации: автореферат диссертации.

<http://dlib.rsl.ru/loader/view/01003281722?get=pdf> (<http://dlib.rsl.ru/loader/view/01003281722?get=pdf>)

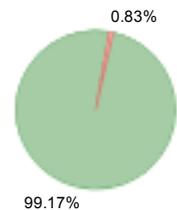
[Показать заимствования \(5\)](#)
 0.35%

3. Экологическая роль сульфидогенных бактерий в образовании сульфидов меди и железа (<http://dlib.rsl.ru/loader/view/01005047468?get=pdf>)

Авторы: Иккерт, Ольга Павловна.

Год публикации: 2012. Тип публикации: автореферат диссертации.

<http://dlib.rsl.ru/loader/view/01005047468?get=pdf> (<http://dlib.rsl.ru/loader/view/01005047468?get=pdf>)

 0.24%


[get=pdf](#)[Показать заимствования \(2\)](#)

4. Применение методов геносистематики для решения вопросов таксономии и изучения биоразнообразия прокариот
(<http://dlib.rsl.ru/loader/view/01003476606?get=pdf>)

Авторы: Турова, Татьяна Павловна.

Год публикации: 2009. Тип публикации: автореферат диссертации.

<http://dlib.rsl.ru/loader/view/01003476606?get=pdf> ([http://dlib.rsl.ru/loader/view/01003476606?](http://dlib.rsl.ru/loader/view/01003476606?get=pdf)[get=pdf](#))[Показать заимствования \(2\)](#)

0.19%

[Дополнительно](#)[Значимые оригинальные фрагменты](#)[Библиографические ссылки](#)[Искать в Интернете](#)