

АНАЛИЗ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ ТЕРМАЛЬНЫХ ИСТОЧНИКОВ РАЙОНА ОЗЕРА ФУМАРОЛЬНОЕ КАЛЬДЕРЫ ВУЛКАНА УЗОН, КАМЧАТКА

© 2011 Е.Н. Дворянчикова, А.К. Кизилова, И.К. Кравченко, В.Ф. Гальченко

Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН, г. Москва

Поступила в редакцию 19.05.2011

Впервые проведено комплексное молекулярно-биологическое исследование микробных сообществ 5 термальных источников, расположенных в районе озера Фумарольное кальдеры вулкана Узон, Камчатка. Были использованы методы, основанные на применении ПЦР технологий (ПЦР-детекция, ПЦР-ДГЭ, клонирование) и гибридизации *in situ* для анализа как рибосомальных, так и функциональных генов, отвечающих за синтез ключевых ферментов метанотрофии, метаногенеза, автотрофной фиксации CO₂, нитрификации. Установлено, что общая численность микроорганизмов в образцах ила составляла от 0,5 до 36,8×10⁶ клеток/мл и метаболически активные зубактерии составляли 22-35%. Методом ПЦР представители *Bacteria* и также фототрофные прокариоты были обнаружены во всех исследованных источниках, *Archaea* в четырех, а метанотрофы в трех. Ни в одном из источников не были обнаружены метаногенные и нитрифицирующие археи. Впервые в гидротермах изучено разнообразие метанотрофных сообществ и обнаружено низкое разнообразие, представленное только метанотрофами I типа, наиболее близкими к *Methylothermus* и *Methylobacter*. Получено 5 накопительных высокообогащенных монокультур экстремально термофильных метанотрофов, в состав которых входят организмы, значительно отличающиеся от двух известных видов рода *Methylothermus*.

Ключевые слова: микробные сообщества, метанотрофы, накопительные культуры, гибридизация

Кальдера вулкана Узон, Камчатка – это уникальный в масштабе Земли район проявления современного вулканизма. Гидротермальная деятельность сосредоточена в узкой, шириной не более 400 м зоне, проходящей по осевой линии кальдеры с востока на запад на протяжении 2,5 км. Пространственно она делится на четыре поля: Западное, Северное, Восточное (Центральное) и район озера Фумарольное. На этой площади наблюдается множество кипящих грифонов, многочисленные грязевые котлы и вулканчики, парящие и в разной степени прогретые площадки с выходами воды и пара с температурой от 45 до 96°C. Термальные источники являются экстремальными экосистемами, микробные сообщества которых представляют значительный интерес, как для фундаментальных исследований, так и для практического применения [1]. Российскими микробиологами были получены приоритетные данные об активности и составе сообществ лито- и органотрофных термофильных бактерий и архей высокотемпературных источников Камчатки [2]. Основное внимание в этих исследованиях уделялось гидрогенотрофным литотрофам и микроорганизмам с различными

типами анаэробного дыхания (серо-, нитрат- и железоредукторам, использующим СО), тогда как другие группы микроорганизмов, например, использующие в своем метаболизме метан и/или другие С₁ соединения, исследованы крайне недостаточно. Основные микробиологические исследования выполнены на объектах, расположенных на Восточном термальном поле, а изучение микробных сообществ в термальных источниках района озера Фумарольное практически не проводилось. В то же время образование горячих озер на месте кратероподобных воронок является уникальной особенностью Узонских термопроявлений. Крупнейшим среди них является озеро Фумарольное, которое заполняет обширную котловину размером 300 х 600 м с хорошо выраженным береговым обрывом.

Цель исследования: изучение микробного разнообразия в термальных источниках района озера Фумарольное кальдеры вулкана Узон (Камчатка) с помощью методов молекулярной экологии. Особое внимание было уделено метанокисляющим организмам, сведения о которых практически отсутствуют.

Материалы и методы.

Отбор образцов и определение физико-химических параметров среды. Образцы цианобактериальных матов и ила были отобраны в ходе экспедиционных исследований в июле 2010 г. Определение физико-химических параметров гидротерм (температуры, pH, Eh) производили с помощью наборов Aquamerk («Merck», Германия). Результаты представлены в табл. 1. Непосредственно

Дворянчикова Екатерина Николаевна, аспирантка
Кизилова Анна Константиновна, кандидат биологических наук, научный сотрудник. E-mail: alegriia@gmail.com

Кравченко Ирина Константиновна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник. E-mail: irinakravchenko@inbox.ru

Гальченко Валерий Федорович, член-корреспондент РАН, директор. E-mail: valgalch@inmi.host.ru

на месте отбора 2 см³ образца вносили во флаконы объемом 120 мл с 20 мл среды «П» [3], разбавленной в 5 раз, и инкубировали в атмосфере метан: воздух (1:1) в течение 7 суток в источнике Заварзина (56,7°C). Полученные обогащенные образцы (первичная накопительная культура) были использованы в лаборатории для проведения исследований методами ПЦР и FISH, а также для выделения накопительных культур метанотрофов.

Выделение ДНК и ПЦР-детекция прокариот различных таксономических и функциональных групп. Препарат тотальной ДНК выделяли с помощью коммерческого набора реактивов (Wizard Genomic DNA Purification Kit, «Promega», США) в соответствии с протоколом производителя с минимальными модификациями. Для увеличения выхода микробной ДНК мы проводили обработку лизирующим буфером при повышенной температуре (80°C) и встряхивании. Для амплификации фрагментов рибосомального гена 16S рРНК бактерий использовали систему праймеров 341 F-907 R [4], для архей – 344F-915R [5]. Для детекции прокариот различных функциональных групп (метанотрофы, фотосинтетики, метаногены, нитрификаторы) использовали ПЦР-амплификацию фрагментов генов ключевых ферментов различных процессов метаболизма. Для метанотрофов применяли систему вырожденных праймеров A189F и A682R [6], амплифицирующих фрагмент гена *pmoA*, кодирующего синтез β-субъединицы метанмонооксигеназы (ММО), ключевого фермента метаноокисления, а для обнаружения прокариот, обладающих генами автотрофной фиксации углекислоты в цикле Кальвина (*cbbl*) применяли праймерную систему *cbbl1F-cbblLR* [7].

Присутствие метаногенных архей детектировали с помощью праймерной системы *mcrAF/mcrAR* [8], позволяющей амплифицировать фрагмент гена *mcrA*, кодирующего α-субъединицу фермента метил-коэнзим М, а нитрифицирующих архей – праймерной системой *CrenamoA23f* и *CrenamoA616* [9] для детекции фрагмента *amoA* архей. Оценку разнообразия метанотрофов проводили методом денатурирующего градиентного гель-электрофореза (ДГГЭ) с использованием праймера A189F(GC) с GC-клампом для обеспечения разделения смеси ампликонов *pmoA* в полиакриламидном геле [10]. Состав реакционной смеси для ПЦР и температурно-временной профиль реакции соответствовали таковым в упомянутых выше работах. Амплификацию проводили на приборе MyCycler («BioRad», США). Анализ продуктов ПЦР проводили в 1,2% агарозном геле, окрашенном бромистым этидием. Выделение и очистку ПЦР фрагментов осуществляли с помощью набора Wizard PCR Preps («Promega», США), согласно рекомендациям производителя.

Оценка бактериального разнообразия методом клонирования фрагмента гена 16S рРНК. Очищенные ПЦР-фрагменты клонировали с

помощью pGEM-T easy vector system I (Promega, США) в компетентных клетках *E.coli* DH10B. Для создания каждой библиотеки клонов случайным образом было отобрано по 50 колоний, проявивших положительную реакцию (белые). С материалом колоний была поставлена ПЦР реакция с универсальными плазмидными праймерами M13F и M13R. Наличие вставки оценивали методом агарозного электрофореза. Генетический материал клонов, содержащих вставки гена 16S рРНК, был секвенирован в сервисной лаборатории с помощью набора реактивов Big Dye Terminator v.3.1 на автоматическом секвенаторе ABI 3730 (Applied Biosystems Inc., США).

Денатурирующий градиентный гель-электрофорез. Разделение смеси ампликонов *pmoA* проводили с помощью прибора DCode Universal Mutation Detection System («BioRad», США) при постоянной температуре 60°C, напряжении 200 V и градиенте денатурантов (формамид, мочевины) 35-60% в течение 6 ч. Полученные гели окрашивали раствором этидиум бромид и документировали с помощью имидж-системы Gel Doc System («BioRad», США). Характерные видимые полосы (bands), содержащие ДНК, были вырезаны, полученные после элюирования растворы ДНК были очищены и использованы для определения нуклеотидных последовательностей методом секвенирования.

Гибридизация in situ с флуоресцентно-мечеными олигонуклеотидными зондами (FISH). Фиксацию образцов раствором параформальдегида и гибридизацию препаратов с флуоресцентно-мечеными олигонуклеотидными зондами проводили при температуре 46°C в соответствии с методикой [11]. Для специфической детекции метанотрофов II типа использовали зонд M-450 (30% формамида в гибридизационном буфере), а метанотрофов I типа – смесь зондов M-84 и M-705 (20% формамида) [12]. Для детекции представителей домена *Bacteria* использовали смесь универсальных зондов EUB 338mix [13]. Синтез зондов, меченных флуоресцентным красителем Cy3, выполнен компанией «Синтол» (Москва, Россия). Общую численность бактерий определяли в препаратах, окрашенных раствором ДНК-специфического красителя ДАФИ. Количество гибридизованных с зондами клеток подсчитывали с помощью микроскопа AxioImager D1 («Karl Zeiss», Германия) в 50 полях зрения с использованием светофильтров Zeiss 20 для Cy3-меченных зондов и Zeiss 49 для подсчета клеток, окрашенных ДАФИ, с последующим расчетом на 1 мл обогащенного образца.

Выделение и анализ накопительных культур. Накопительные культуры из обогащенных образцов получали путем регулярных пересевов один-два раза в месяц. Инкубацию вели в статических условиях при температуре 60°C. Процесс роста метанотрофных бактерий при последовательных пересевах контролировали с помощью световой микроскопии, FISH и ПЦР детекции метанотрофов. Представленные результаты анализа

были получены для накопительных культур, полученных через 3 месяца инкубации (3-4 пассажа).

Анализ нуклеотидных последовательностей. Анализ полученных нуклеотидных последовательностей фрагментов генов проводили с помощью программного пакета BLAST [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST].

Результаты и обсуждение. Характеристики гидротерм. В июле 2010 г. был проведен

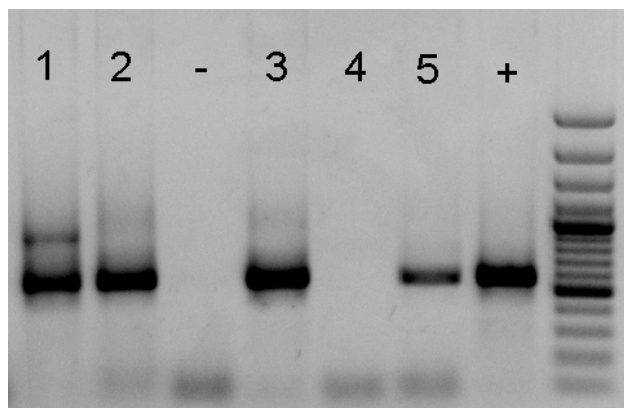
отбор образцов ила и цианобактериальных матов из жерла термальных источников Культурный, Терра, Строма, Квадрат и Глаз дракона, расположенных в районе озера Фумарольное кальдеры вулкана Узон. Физико-химические характеристики вод изученных гидротерм представлены в табл. 1. Все исследованные источники были высокотемпературными со слабощелочной или близкой к нейтральной реакцией среды.

Таблица 1. Характеристики термальных источников

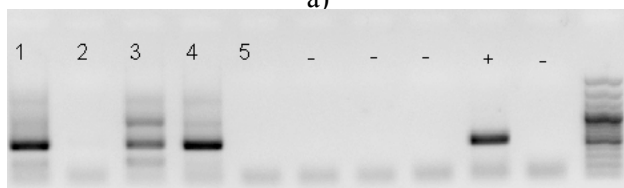
Название источника	Координаты		Температура, °С	pH	Eh, мВ
	N	E			
Культурный	54° 30. 115'	159° 59. 279'	63,0	5,2	80
Терра	54° 29. 887'	159° 59. 410'	65,0	6,2	73
Строма	54° 29. 854'	159° 59. 477'	56,1	5,3	5
Квадрат	54° 29. 862'	159° 59. 485'	64,5	6,3	- 22
Глаз Дракона	54° 29. 885'	159° 59. 468'	59,8	6,2	н.о.

Примечание: н.о. – не определяли.

ПЦР-детекция прокариот. На первом этапе исследования была проведена амплификация фрагментов таксономических и функциональных генов прокариот. Примеры детекции целевых организмов продемонстрированы на рис. 1.



а)



б)

Рис. 1. Визуализация результатов ПЦР с помощью агарозного электрофореза:

а – археи, система праймеров 344F-915R; б – метанотрофы, система праймеров A189F и A682R; 1 – Культурный; 2 – Квадрат; 3 – Терра; 4 – Глаз Дракона; 5 – Строма; «-» отрицательный контроль; «+» положительный контроль, организмы *Methanosarcina lacustris* (а), *Methylosinus trichosporium* (б).

Результаты анализа показали присутствие *Bacteria* во всех исследованных источниках и *Archaea* в четырех (рис. 2а). Анализ функциональных генов также продемонстрировал различия в составе микробных сообществ. Метанотрофные бактерии были детектированы только в 3 источниках (рис. 1б), а фототрофные – во всех 5 источниках.

Из термальных источников Камчатки с кислой реакцией среды (pH 3,5) были выделены ацидо-термофильные метанооксиляющие представители филума *Verrucomicrobia* [14, 15], в то время как сведения о метанотрофах в высокотемпературных нейтральных источниках Камчатки в литературе отсутствуют. Таким образом, в нашем исследовании впервые было зафиксировано их присутствие в горячих источниках Камчатки.

Распространение фототрофных цианобактерий и анаэробных фотосинтезирующих бактерий в термальных источниках изучено для достаточно большого количества объектов, расположенных в России, Исландии, США и Китае [16], поэтому неудивительным был факт обнаружения организмов, обладающих генами первичной ассимиляции CO₂ во всех исследованных источниках. Для осадков источника Культурный фрагмент гена *cbbL* был секвенирован, и полученная нуклеотидная последовательность продемонстрировала сходство с депонированной в GenBank последовательностью фототрофной бактерии *Chloroflexus*. Ни в одном из исследованных источников нам не удалось детектировать присутствие аммонийоксиляющих архей, хотя в работе (Zhang et al., 2008) было обнаружено присутствие нитрифицирующих кренархей в высокотемпературных источниках Камчатки [17]. Ни в одном из источников не были обнаружены метаногенные археи. Результаты ПЦР-детекции прокариот в источниках суммированы в табл. 2.

Анализ бактерий в обогащенных образцах методом FISH. Общее количество микроорганизмов, выявленных в обогащенных образцах (окраска ДАФИ), составляло от 5 до 36 x 10⁶ клеток на 1 мл осадка, а количество метаболически активных бактерий (EUB338 mix) варьировало от 2,3 до 21 x 10⁶ клеток на 1 мл осадка (табл. 3). Доля активных бактерий была максимальной (35,6%) в образцах источника Квадрат, а в остальных варьировала от 22,3% до 31,5%.

Таблица 2. Результаты амплификации рибосомальных и функциональных генов бактерий и архей в образцах осадков термальных источников

Группа прокариот	Целевой ген	Праймерные системы	Образование целевого продукта				
			Термальные источники				
			1	2	3	4	5
все <i>Bacteria</i>	16S рРНК	341 F -907 R	+	+	+	+	+
метанотрофные бактерии	<i>pmoA</i>	A189F- A682R	+	-	+	+	-
фототрофные бактерии	<i>cbbL</i>	cbb11F- cbbLR	+	+	+	+	+
все <i>Archaea</i>	16S рРНК	344F-915R	+	+	+	-	+
метаногенные археи	<i>mcrA</i>	mcrAF /mcrAR	-	-	-	-	-
нитрифицирующие кренархеи	<i>amoA</i>	CrenamoA23f - CrenamoA616	-	-	-	-	-

Примечание: источники: 1 – Культурный, 2 – Терра, 3 – Строма, 4 – Квадрат, 5 – Глаз Дракона; «+» - означает детекцию целевого организма, «-» - не обнаружено.

Анализ обогащенных образцов методом FISH выявил высокие значения численности метанотрофов I типа (*γ-Proteobacteria*) в источниках Культурный, Строма и Квадрат. Количество клеток здесь достигало $1,5-2,0 \times 10^6$ клеток на 1 мл осадка. В источниках Терра и Глаз Дракона количество метанотрофов было значительно ниже

– 10^5 и 10^4 клеток на 1 г осадка, соответственно. Доля метанотрофов I типа от метаболически активных эубактерий составляла: Культурный – 4,3%; Терра – 3,2%; Строма – 4,2%; Квадрат – 3,4%; Глаз Дракона – 0,2%. Метанотрофы II группы (зонд M-450) ни в одном из исследованных источников обнаружены не были.

Таблица 3. Численность клеток в обогащенных образцах, определенная методом гибридизации *in situ* с флуоресцентными олигонуклеотидными зондами и окраской ДАФИ.

Источник	Культурный	Терра	Строма	Квадрат	Глаз Дракона
окраска / гибридизация	количество клеток, $\times 10^6$ /мл осадка				
ДАФИ	24 \pm 2,2 (68,2%)	11 \pm 3,9 (20,1%)	33 \pm 5,6 (73,5%)	36 \pm 4,5 (61%)	5 \pm 0,68 (68,4%)
EUB338 mix	9,7 \pm 0,39 (27,6%)	4,2 \pm 1,4 (26,8%)	10 \pm 1,6 (22,3%)	21 \pm 3,3(35,6%)	2,3 \pm 0,81 (31,5%)
M-84 + M-705	1,5 \pm 0,46 (4,3%)	0,5 \pm 0,19 (3,2%)	1,9 \pm 0,61 (4,2%)	2 \pm 0,49 (3,4%)	0,013 \pm 0,002(0,2%)

Оценка разнообразия бактерий в образце ила источника Культурный методом клонирования 16S рРНК. Клонирование ПЦР-фрагментов позволило оценить разнообразие бактерий в источнике Культурный. Из анализа результатов клонирования (табл. 4) следует, что доминирующим организмом (29 клонов) в источнике является метанотроф, наиболее близкий к штамму НВ [16]. Минорные компоненты (1-5 клонов) представлены термофильными организмами, проявившими высокую степень сходства с бактериями, выделенными из термальных источников Камчатки, Йеллоустонского национального парка, Тибета и геотермальных почв Новой Зеландии.

ПЦР-ДГГЭ анализ фрагмента гена *pmoA*. Для 4 источников, в которых был амплифицирован фрагмент гена *pmoA*, был проведен ПЦР-ДГГЭ анализ, позволяющий оценить разнообразие метанооксилирующих бактерий. В табл. 5 представлены данные по анализу нуклеотидных последовательностей характерных полос. Проведенное исследование показало, что во всех источниках присутствуют метанотрофы, наиболее близкие к представителям рода *Methylothermus*, но отличающиеся от двух описанных видов (79-91% сходства нуклеотидных последовательностей). В образцах из источников Терра и Глаз Дракона были обнаружены последовательности, наиболее

близкие к некультивируемым представителям рода *Methylomonas* (79-90% сходства). Только в образце из источника Терра обнаружены 2 метанотрофных организма, в то время как во всех остальных образцах – по одному. В источниках Культурный, Терра, Квадрат идентифицированы метанотрофы, проявившие высокую степень сходства с термофильным метанотрофом НВ [18]. Для метанотрофа из образца Строма ближайшим родственником был *Methylothermus subterraneus* из горячих подземных водоносных слоев золотодобывающих рудников Японии [19].

Характеристика накопительных культур термофильных метанотрофов. Из образцов ила источника Культурный, а также источников Глаз дракона и Строма путем последовательных переосеждений на селективных средах были выделены 5 накопительных культур метанотрофов, присутствие которых в обогащенных образцах нам не удалось детектировать. Накопительные культуры представляли собой ассоциации метанооксилирующих бактерий с гетеротрофными спутниками, однако доля метанооксилирующих бактерий в них была высокой. Морфология метанотрофных клеток, дающих сигнал с зондом M-84+M-705 (I группа метанотрофов), была сходной для всех накопительных культур. Это были короткие, крупные (около 1 мкм) округлые палочки, которые хорошо идентифицировались методом фазового

контрастирования препаратов живых клеток. Электронно-микроскопический анализ интактных культур метанотрофов культуры K12 выявил присутствие полярного жгутика, а анализ срезов обнаружил мембранные структуры, характерные

для метанотрофов I типа. Анализ последовательностей *rhoA* показал, что во всех накопительных культурах присутствуют метанотрофы, наиболее близкие к *Methylothermus*.

Таблица 4. Разнообразие бактерий в образце ила источника Культурный методом клонирования 16S рРНК

Номер образца	Ближайший представитель	Процент сходства покрытие/сходство
1 (Культурный, 29 клонов)	Thermophilic methanotroph HB (U89302) Uncultured bacterium clone SL_5.95 (AY550713)	98%(99%) 98%(94%)
2 (Камчатка 14, 15 клонов)	Uncultured Chlorobi bacterium clone VSM5Q1u76 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (EU631213) Uncultured green sulfur bacterium clone SM1H02 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (AF445702)----	95% 94%
3 (Культурный, 5 клонов)	Thermoactinomyces sacchari (AM161154) Uncultured bacterium clone LaC15L24(EF667582) Propionibacterium acnes (AM161153)	98% (83%) 73%(89%) 9%(83%)
4 (Культурный, 1 клон)	Uncultured bacterium clone ZB_P10_C06 (GQ328567) из источника Заварзина в Узоне Uncultured Acidobacteriaceae bacterium (AM935486)	83% (100%) 83% (95%)
5 (Культурный, 1 клон)	Pseudomonas putida (AM161157)	98% (95%)
6 (Культурный, 2 клон)	Uncultured bacterium clone ZB_P14_B04 16S (GQ328675 из источника Заварзина в Узоне Candidate division OP10 clone OPB80 (AF027089) из горячего источника Йеллоустонского парка	73%(97%) 73%(96%)
7 (Культурный, 1 клон)	Uncultured bacterium clone ZB_P13_F12 (GQ328655) из источника Заварзина в Узоне	73%(85%)
8 (Культурный, 1 клон)	Uncultured bacterium clone TP146 (EF205576) hot springs in central Tibet Uncultured Acidobacteria (AM749745) from geothermal soils in New Zealand	78%(97%) 78%(94%)

Таблица 5. Результаты BLAST анализа нуклеотидных последовательностей характерных ДГГЕ полос, полученных при разделении ПЦР фрагментов гена.

Источник	Ближайший родственник	Покрытие/сходство
Культурный	Uncultured bacterium clone SL_5.95 (AY550713)	99/80
	Thermophilic methanotroph HB (U89302)	99/79
Терра (смесь)	Uncultured bacterium clone SL_5.32 (AY550731)	100/95
	Thermophilic methanotroph HB (U89302)	100/95
	Uncultured bacterium (AM910134)	100/80
	Uncultured <i>Methylothermus</i> sp. (AB500822)	100/79
Строма	<i>Methylothermus subterraneus</i> (AB536748)	100/91
Квадрат	Uncultured bacterium clone SL_5.95 (AY550713)	93/88
	Thermophilic methanotroph HB (U89302)	93/88
Глаз Дракона	Uncultured bacterium (AM910134)	95/90
	Uncultured <i>Methylothermus</i> sp. (AB500822)	95/87

Выводы: в результате проведенных исследований впервые получены характеристики микробных сообществ гидротерм Камчатки с помощью комплексного молекулярно-биологического подхода, основанного на использовании ПЦР технологий (ПЦР-детекция, ПЦР-ДГГЭ, клонирования) и гибридизации *in situ* для анализа рибосомальных генов, а также функциональных генов, отвечающих за синтез ключевых ферментов метанотрофии, метаногенеза, автотрофной фиксации CO₂, нитрификации). Впервые изучено распространение и разнообразие метанотрофных сообществ в осадках нейтральных высокотемпературных источников. Установлено, что разнообразие термофильных метанотрофов в исследованных

источниках ограничивается бактериями, наиболее близкими к *Methylothermus* и *Methylobacter*. Получено 5 накопительных высокообогащенных (20-50%) монокультур метанотрофов, в состав которых входят организмы, значительно отличающиеся от двух известных видов рода *Methylothermus*. Культуры являются экстремальными термофилами и их рост осуществляется при значениях температур не ниже 50°C. Дальнейшие исследования предполагают более детальные исследования обнаруженных организмов, выделение чистых культур и описание новых таксонов термофильных метанотрофов.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ № 08-04-00164-а, 09-04-10113-к и 10-04-10127-к.

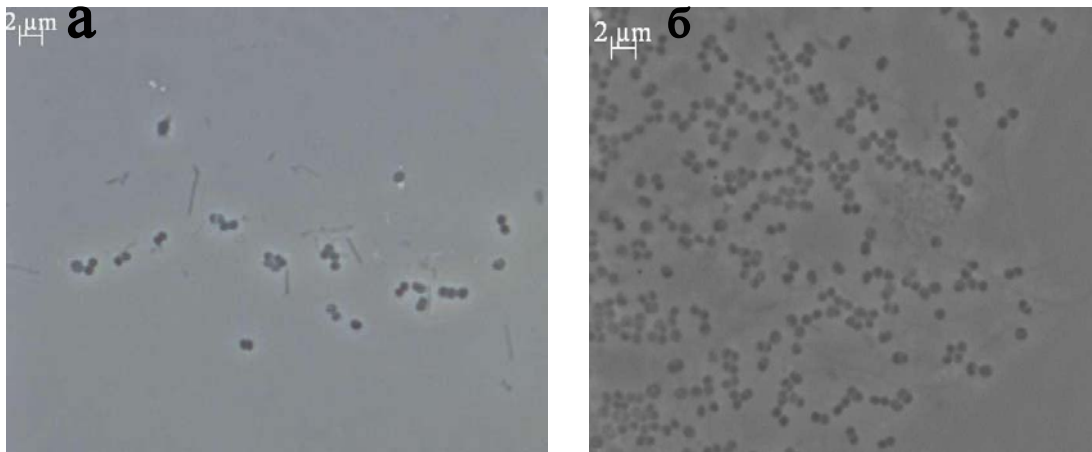


Рис. 2. Морфология клеток накопительных культур метанотрофов:
а – K14, источник Культурный; б – K12, источник Строма (фазовый контраст)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Brock, T.D. Microbiological studies of thermal habitats of the central volcanic region, North Island, New Zealand. / T.D. Brock, M.L. Brock // N. Z. J. Marine and Freshwater Res. 1971. V.5. P. 233-258.
2. Труды института микробиологии имени С.Н. Виноградского: Вып.16: Термофильные микроорганизмы // Ин-т микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН. – М.: МАКС Пресс, 2011. 364 с.
3. Гальченко, В.Ф. Метанотрофные бактерии. – М.: ГЕОС, 2001. 500 с.
4. Muyzer, G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA / G. Muyzer, E.C. de Waal, A.G. Uitterlinde // Appl. Environ. Microbiol. 1993. V. 59. P. 695-700.
5. Casamayor, E.O. Identification of and spatio-temporal differences between microbial assemblages from two-neighboring sulfurous lakes: comparison by microscopy and denaturing gradient gel electrophoresis / E.O. Casamayor, H. Schafer, L. Baneras // Appl. Environ. Microbiol. 2000. 66. C. 499-508.
6. Holmes, A.J. Evidence that particulate methane monooxygenase and ammonia monooxygenase may be evolutionarily related / A.J. Holmes, A. Costello, M.E. Lidstrom, G.C. Murrell // FEMS Microbiol. Lett. 1995. V. 132. P. 203-208.
7. Спиридонова, Е.М. Система олигонуклеотидных праймеров для амплификации генов рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы / оксигеназы у бактерий различных таксономических групп / Е.М. Спиридонова, И.А. Берг, Т.В. Колганова и др. // Микробиология. 2004. № 2. С. 377-380.
8. Luton, P.E. The *mcrA* gene as an alternative to 16S rRNA in the phylogenetic analysis of methanogen populations in landfill / P.E. Luton, J.M. Wayne, R.J. Sharp, P.W. Riley // Microbiology. 2002. V. 148. P. 3521-3530.
9. Tourna, M. Growth, Activity and Temperature Responses of Ammonia-Oxidising Archaea and Bacteria in Soil Microcosms / M. Tourna, T.E. Freitag, G.W. Nicol, J.I. Prosser // Environ. Microbiol. 2008. Vol. 10. P. 1357-1364.
10. McDonald, I.R. Molecular ecology techniques for the study of aerobic methanotrophs / I.R. McDonald, L. Bodrossy, Y. Chen, C.J. Murrell // Appl. Environ. Microbiol. 2008. V. 74. P. 1305-1315.
11. Stahl, D.A. Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics / D.A. Stahl, R. Amann // Development and Application of Nucleic Acid Probes. Eds. E. Stackebrandt and M. Goodfellow Chichester: Wiley, 1991. P. 205-248.
12. Eller, G. Group-specific 16S rRNA targeted probes for the detection of type I and type II methanotrophs by fluorescence in situ hybridization / G. Eller, S. Stubner, P. Frenzel // FEMS Microbiol. Lett. 2001. V. 198. P. 31-37.
13. Diams, H. The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all Bacteria: Development of a more comprehensive probe set / H. Diams, A. Bruhl, R. Amann et al. // Syst. Appl. Microbiol. 1999. V. 22. P. 434-444.
14. Pol, A. Op den Camp. Methanotrophy below pH 1 by a new Verrucomicrobia species / A. Pol, K. Heijmans, H.R. Harhangi // Nature. 2007. V. 450. P. 874-878.
15. Bodrossy, L. A novel methane-oxidising γ -Proteobacterium / L. Bodrossy, K. Kovács, I.R. McDonald, K. Murrell // FEMS Microbiol. Lett. 1999. V. 170. P. 335-341.
16. Madigan, M.T. Anoxygenic phototrophic bacteria from extreme environments // In: Discoveries in Photosynthesis. Advances in Photosynthesis and Respiration, 2005. Vol. 20, XII., 969-983, DOI: 10.1007/1-4020-3324.
17. Chuanlun, L. Zhang. Global Occurrence of Archaeal *amoA* Genes in Terrestrial Hot Springs / Chuanlun L. Zhang, Qi Ye, Zhiyong Huang et al. // Appl. Environ. Microbiol. 2008. V.74. P. 6417-6426.
18. Bodrossy, L. A novel methane-oxidising γ -Proteobacterium / L. Bodrossy, K. Kovács, I.R. McDonald, K. Murrell // FEMS Microbiol. Lett. 1999. V. 170. P. 335-341.
19. Hirayama, H. *Methylothermus subterraneus* sp.nov., a moderately thermophilic methanotrophic bacterium from a terrestrial subsurface hot aquifer in Japan / H. Hirayama, Y. Suzuki, M. Abe et al. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2010. DOI 10.1099/ij.s.0.028092-0.

**ANALYSIS OF MICROBIAL COMMUNITIES OF THERMAL SPRINGS
OF LAKE FUMAROLNOE AREA, UZON VOLCANO CALDERA,
KAMCHATKA**

© 2011 E.N. Dvoryanchikova, A.K. Kizilova, I.K. Kravchenko, V.F. Galchenko

Institute of Microbiology named after S.N. Vinogradskiy RAS, Moscow

For the first time complex molecular-biological studies of microbial communities of 5 thermal springs, located around Lake Fumarolnoe, Uzon volcano caldera, Kamchatka, is conducted. The methods based on PCR technologies (PCR-detection, PCR-DGGE, cloning) and fluorescence in situ hybridizations (FISH) for analysis of ribosomal and functional genes, which are responsible for synthesis of key enzymes of methanotrophy, methanogenesis, autotrophic CO₂ fixation, nitrification have been used. We found that aggregate number of microorganisms in sludge samples varied from 0.5 to 36.8×10⁶ cells/ml, and metabolically active eubacteria shared 22-35 %. Representatives of *Bacteria* and phototrophic prokaryotes have been found out by PCR in all thermal springs, *Archaea* - in four, and methanotrophs - in three. No methanogens and nitrifying archaea were detected in any of the springs. For the first time in hydrotherms methanotrophic communities are studied, and the low diversity presented only methanotrophs of I type, most closely related to *Methylothermus* and *Methylobacter*, is revealed. We isolated 5 enrichment monocultures of extremely thermophilic methanotrophs, which structure includes organisms, considerably different from two known species of genera *Methylothermus*.

Key words: *microbial communities, methanotrophs, enrichment cultures, hybridization*

Ekaterina Dvoryanchikova, Post-graduate Student
Anna Kizilova, Candidate of Biology, Research Fellow.
E-mail: alegrria@gmail.com
Irina Kravchenko, Candidate of Biology, Leading
Research. E-mail: irinakravchenko@inbox.ru
Valeriy Galchenko, Corresponding Member of RAS.
E-mail: valgalch@inmi.host.ru