

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной медицины и биологии
Кафедра микробиологии

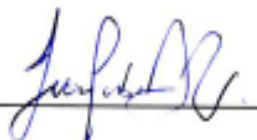
Направление подготовки: 06.04.01– Биология

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ
ХАРАКТЕРИСТИКА МИКРОБНОГО СООБЩЕСТВА ПЕЩЕРЫ
ШУЛЬГАН-ТАШ (РЕСПУБЛИКА БАШКОРТОСТАН)

Студент 2 курса

группы 01-840-2

"__" _____ 20__ г.

 (Х.П. Ордус Вильярреаль)

Научный руководитель

к.б.н., доцент


"__" _____ 20__ г.

 (Г.Ю. Яковлева)

Заведующий кафедрой

д.б.н., профессор

"__" _____ 20__ г.

 (О.Н. Ильинская)

Казань-2020

СОДЕРЖАНИЕ

	стр.
ВВЕДЕНИЕ	4
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	6
1.1 Формирование бактериальных сообществ в пещерах и особенности их местообитания	6
1.2 Физико-химическое взаимодействие между бактериальным сообществом и окружающей средой пещеры	10
1.3 Внешние и внутренние факторы, влияющие на пещерное сообщество микроорганизмов	12
1.4 Характеристика микробных сообществ пещер	15
1.5 Характеристика микробных сообществ карстовых пещер, на примере пещер Киндерлинская и Шульган-Таш	17
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	24
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	24
2.1 Объект исследования	24
2.2 Получение чистых культур микроорганизмов из образцов биоплёнок и воды из Голубого озера	25
2.2.1 Среды для культивирования микроорганизмов	26
2.3 Анализ метаболической активности выделенных чистых культур бактерий	26
2.3.1 Определение протеазной активности	27
2.3.2 Определение РНКазной активности	27
2.3.3 Определение амилазной активности	27
2.4 Идентификация выделенных микроорганизмов	28
2.4.1 Пробоподготовка	28
2.4.2 Амплификация фрагментов ДНК с помощью полимеразной	

цепной реакции (ПЦР)	28
2.4.3 Агарозный гель электрофорез	29
2.4.4 Очистка пула индексированных образцов и определение нуклеотидной последовательности ДНК	29
2.5 Статистический анализ	31
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	32
3.1 Микробиологический анализ сообществ пещеры Шульган-Таш	32
3.2 Идентификация микроорганизмов, выделенных из образцов биопленок и воды Голубого озера	32
3.2.1 Сравнительный анализ полученных изолятов	45
3.3 Ферментативная активность бактериальных изолятов	49
3.4 Заключение	55
ВЫВОДЫ	57
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	58

ВВЕДЕНИЕ

Пещеры – это специфические экосистемы, обладающие уникальными особенностями, которые представляют собой горные породы, подземные воды и морфологию карста. В пещерах создаются свои микроклиматические и физико-химические условия: отсутствие света, постоянно низкая температура, высокая влажность, недостаток органических веществ. Все это приводит к формированию специфических ассоциаций живых организмов, существующих в относительной изоляции от поверхностных экосистем [Kuzmina *et al.*, 2012]. В последнее время вновь возрос интерес к пещерным экосистемам. Связано это с тем, что пещеры могут содержать окаменелости, артефакты, палеолитические картины, и минеральные отложения [Adetutu, Ball, 2014]. К сожалению, пещеры подвержены микробному повреждению, причем риск усугубляется нерегулируемым посещением их туристами. Следовательно, понимание микробного разнообразия в пещерах имеет важное значение для сохранения пещер, восстановления и безопасного пещерного туризма. Сравнительный метагеномный анализ показывает, что сообщества пещер представляют собой отдельные и потенциально специализированные наземные микробные сообщества. Результаты показали значительную разницу между сообществами пещер и других мест обитания (океан, почва или ризосфера) [Ortiz *et al.*, 2014].

Считается, что жизнедеятельность микробов в пещерах происходит на скалистых поверхностях, поскольку большинство пещер лишены существенного слоя почвы и отложений. Кроме того, происходит постоянное циклическое перемещение микроорганизмов между стенами пещеры и отложениями. Поэтому осадочные микроорганизмы являются частью экосистемы пещеры. Устранение микробных групп (особенно когда обнаруживается, что они разрушают наскальные рисунки) со стен может принести лишь ограниченный успех, поскольку почва и осадки, если они

присутствуют, могут быть резервуарами этих микробных групп [Adetutu *et al.*, 2014].

Пещера Шульган-Таш (Капова) известна не только в России, но и в мире благодаря наскальной живописи, датируемой верхним палеолитом [Abdullin *et al.*, 2012]. Сохранение палеолитических картин в пещере Шульган-Таш чрезвычайно важно, поскольку они представляют собой бесценное культурное наследие человечества. При исследовании микробного сообщества пещеры Шульган-Таш было описано 17 основных морфотипов. Сообщества, которые выделены со стен афотической части пещеры, включают как представителей прокариот (бактерии, в том числе актино- и цианобактерии) так и эукариот (дрожжи и микроскопические грибы) [Kuzmina *et al.*, 2019]. Однако видовой состав сообщества еще до конца не был охарактеризован.

Интерес к микроорганизмам экстремальных мест обитания может быть связан не только с изучением и сохранностью данных объектов, но и с поиском новых биологически активных веществ, например, экзогенных ферментов, которые могут быть использованы в промышленности, сельском хозяйстве и медицине.

В связи с этим, цель данной работы: охарактеризовать сообщество микроорганизмов, выделенных из образцов биопленок и проб воды Голубого озера пещеры Шульган-Таш.

В соответствии с поставленной целью решались следующие задачи.

- 1) Из образцов биопленок и проб воды Голубого озера пещеры Шульган-Таш выделить чистые культуры микроорганизмов.
- 2) Идентифицировать микроорганизмы, выделенные из образцов биопленок и проб воды Голубого озера пещеры Шульган-Таш, по 16S рРНК.
- 3) Оценить способность микроорганизмов, выделенных из образцов биопленок и проб воды Голубого озера, к синтезу экзогенных протеаз, РНКаз и амлаз.

ВЫВОДЫ

1) Из образцов биопленок и проб воды Голубого озера пещеры Шунгаль-Таш было выделено 127 культур микроорганизмов, из которых 45 изолятов – на среде Лурия-Бертани, 65 изолятов – на среде R2A и 17 изолятов – на среде Гаузе.

2) 53 изолята были полностью идентифицированы: они к домену *Bacteria*, филум *Proteobacteria*, *Firmicute* и *Actinobacteria*.

3) Филум *Proteobacteria* представлен видам семейств: *Pseudomonadaceae* (26 видов, 59%), *Burkholderiaceae* (5 видов), *Moraxellaceae* (4 вида), *Enterobacteriaceae* (4 вида), *Caulobacteraceae* (4 вида) и *Xanthomonadaceae* (1 вид). Филум *Actinobacteria* представлен 3 семействами: *Micrococcaceae* (2 вида); *Microbacteriaceae* (1 вид) и *Streptomycetaceae* (1 вид). Филум *Firmicutes* представлен 2 семействами: *Planococcaceae* (3 вида) и *Bacillaceae* (2 вида)

4) Наибольшее количество идентифицированных изолятов, синтезирующих секретлируемые ферменты, выделено из образцов воды Голубого озера.

5) Наибольшей протеазной активностью обладали: *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas umsongensis*, *P. Pseudomonas fluorescens*, *Stenotrophomonas rhizophila*, *Bacillus litoralis*, *Acinetobacter lwoffii* и *Yersinia enterocolitica*. Наибольшей РНКазной активностью – *Pseudomonas umsongensis*, *Pseudomonas frederiksbergensis*, *Bacillus litoralis*, *Yersinia enterocolitica*, *Acinetobacter lwoffii*, *Lysinibacillus fusiformis*, *Polaromonas naphthalenivorans* и *Caulobacter rhizosphaerae*. Наибольшей амилазной активностью – *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas frederiksbergensi*, *Serratia fonticola*, *Yersinia enterocolitica* и *Acinetobacter lwoffii*.