

УДК 574.5+57.083.18

БАКТЕРИАЛЬНОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ИСТОРИЧЕСКИХ ЖЕЛЕЗОСОДЕРЖАЩИХ ВОДНЫХ ИСТОЧНИКОВ КАЛИНИНГРАДСКОГО РЕГИОНА

© 2024 г. Е. Е. Супрунов^а, И. А. Шнурова^а, Б. Э. Ефименко^а, В. В. Лисун^{а, *}

^аБалтийский федеральный университет им. И. Канта, Калининград, 236016, Россия

*e-mail: Li.sun.v.29@gmail.com

Поступила в редакцию 13.10.2023 г.

После доработки 20.12.2023 г.

Принята к публикации 22.12.2023 г.

Калининградская область имеет богатое историческое наследие, в том числе несколько источников воды с высоким содержанием железа. Известные с конца XIX века, они богаты двухвалентным железом, которое окисляется бактериальными сообществами. В их состав входит множество различных таксономических групп бактерий. В данной работе впервые было проведено профилирование микробных сообществ железосодержащих источников Калининградской области; в ходе исследования были взяты 6 проб из четырех географических точек. По результатам профилирования были выявлены таксономические группы, относящиеся к филумам *Acidobacteriota*, *Desulfobacteriota*, *Cyanobacteriota*, *Proteobacteria*, *Nitrospirota*, а среди преобладающих групп выделяется гаммапротеобактерия рода *Gallionella*.

Ключевые слова: железосодержащие источники, железоокисляющие бактерии, бактериальный мат, хемолитоавтотроф, *Gallionella*

DOI: 10.31857/S0026365624040111

Во многих регионах пресноводные источники богаты растворенным железом. В Калининградской области имеется несколько источников, которые относятся к региональным особо охраняемым природным территориям (ООПТ) или входят в состав историко-культурных ландшафтов. Они обладают устаревшей инфраструктурой, и первые достоверные упоминания датируются концом XIX века. Выход на поверхность вод с повышенной концентрацией железа приводит к образованию хемолитоавтотрофных микробных сообществ, которые характеризуются значительным разнообразием. В него, например, входят сульфатредуцирующие бактерии группы *Desulfuromonas* (Singh et al., 2018), которые могут вступать в синтрофные отношения с окислителями железа, а также многие представители филумов *Proteobacteria*, *Acidobacteriota* и *Bacteroidetes* (Emerson et al., 2015). Помимо этого, рядом с колониями железоокисляющих бактерий часто обнаруживаются цианобактерии (Emerson, Weiss, 2004), создающие градиент кислорода в толще воды и влияющие на окислительно-восстановительный потенциал окружающей среды. Но важнейшую роль играют железобактерии, которые способны окислять

и осаждают железо из растворимых двухвалентных форм. Железобактерии представляют собой таксономически разнообразную группу, среди которых есть представители двух филумов, *Pseudomonadota* и *Bacillota*, большинство из которых относятся порядку *Gallionellales*. В источниках пресной воды наиболее часто встречающиеся семейства железобактерий включают *Gallionellaceae* (Reis et al., 2014), *Sphaerotilaceae* (Emerson et al., 2015). Они являются анаэробами или факультативными анаэробами. Метаболизм железобактерий сосредоточен вокруг ферментативного окисления двухвалентного железа Fe(II) до трехвалентного Fe(III).

Изучение разнообразия подобных пресных экосистем помогает детальнее понять биогеохимический цикл железа в осадочных экосистемах и разнообразие таксономических групп прокариот, осуществляющих восстановление двухвалентного железа, а исследование схожих местообитаний позволяет расширить наше знание о разнообразии автотрофных прокариот в составе матов. Также понимание микробного состава сообществ данных источников, возможно, поможет предположить одну из множества причин повышенной концентрации

железа в питьевых источниках воды Калининградской области.

Целью работы было исследование микробных сообществ железосодержащих источников Калининградской области.

Место отбора проб и определение химических параметров воды. Для исследования были выбраны четыре исторических места: источники в Центральном парке и Зоопарке города Калининград, а также источники в городе Светлогорске и в Национальном парке “Виштынецкий”, находящийся в поселке Боровиково. Дно городских источников глинистое, характеризуется обилием гравия и бетонных остатков. Приток органики преимущественно осуществляется за счет листвы окружающих деревьев, а уровень воды в течение года в основном держится на уровне 40–60 см и более 1 м весной и осенью. Источник зоопарка используют в технических нуждах и, в связи с этим, при пересыхании там возможен обратный заброс воды из большого вольера водоплавающих птиц. Источник в Виштынецком парке имеет такое же глинистое дно, но без каменных составляющих, а также, в отличие от городских источников, он очень ярко освещен. По берегам травянистая растительность, на которой находятся микробные маты, но при этом приток органики гораздо меньше из-за отсутствия поблизости листопадных деревьев. Уровень воды там меньше, но также колеблется в диапазоне от 20–40 до 60 см осенью и весной. Сбор 6 образцов донных отложений, микробных матов и образцов воды производили осенью 2022 года. Трудности пробоотбора в двух точках с одним образцом связаны с доступностью только образцов осадка вследствие проблем в работе источника (зоопарк) или, как в случае образца из г. Светлогорска, с обилием микробных матов на дне и сложностью отделения образцов микробного мата и осадка.

Измерение температуры, концентрации кислорода в воде и значения pH производили на месте при помощи кислородомера БПК-тестер Анион-7040 (“Инфраспек-Аналит”. Россия) и портативного pH-метра HI99151 (“HANNA Instruments”, США) соответственно. Концентрацию общего и двухвалентного железа (Fe(II)) определяли спектрофотометрическим методом, основанным на образовании стабильного комплекса между ортофенантролином и ионами железа (ЦВ 1.04.46-00 “А”, 2008). Заранее подготовленную пробу окрашивали смесью раствора гидросиламина, ацетатного буфера и раствора ортофенантролина, и полученный окрашенный раствор фотометрировали с помощью спектрофотометра UV-1800 (“Shimadzu”, Япония) при длине волны 500 нм.

Анализ состава микробных сообществ. Выделение тотальной ДНК проводили с помощью коммерческого набора QuickDNA Fecal/Soil Microbe Microprep, 50 reactions (“Zymo Research”, США). Выделение ДНК проводили согласно протоколу производителя. Для амплификации использовали универсальные праймеры, 515F и 806R (Caporaso et al., 2011). Библиотеки ампликонов были подготовлены в два последовательных раунда ПЦР, на амплификаторе Bio-Rad CFX96 (“Bio-Rad”, США) с использованием смеси qPCRMix-HS SYBR (“Евроген”, Россия). ПЦР фрагменты секвенировали с использованием набора MiSeq Nano Комплект v2 (500 циклов) (“Illumina”, США) на секвенаторе MiSeq (“Illumina”, США). После секвенирования прочтения были обработаны в программном пакете QIIME 2 (Bolyen et al., 2019). Затем объединенные чтения были кластеризованы в оперативные таксономические единицы (OTU). Объединенные последовательности были использованы для сравнения по базе данных SILVA 1.9.8. Индексы Шеннона и Симпсона были получены с помощью программного сервиса SILVA 1.9.8.

Таблица 1. Концентрация общего железа и железа (II), температура, pH и концентрация кислорода в исследуемых местах отбора проб

Место и координаты	pH	Fe(II), мг/л	Fe(общ.), мг/л	Кислород, мг/л	Температура, °C
Национальный парк Виштынецкий 54.40542° с.ш. 22.60996° в.д.	8.15	6.78	7.83	1.4	6
Центральный парк 54.71755° с.ш. 20.47837° в.д.	7.25	4.81	5.76	2.3	8
Светлогорск 54.93784° с.ш. 20.15897° в.д.	7.21	5.63	6.19	2.41	7
Зоопарк 54.72361° с.ш. 20.48777° в.д.	7.15	4.92	5.82	2.5	8

Последовательности отдельных OTUs, относящихся к анализируемым образцам, были использованы для анализа бета-разнообразия сообществ в образцах, с метрикой невзвешенного UniFrac.

Вода из исследуемых источников содержит большое количество железа (II), при этом концентрация кислорода на границе жидкой и твердой фазы (осадка или микробного мата) была достаточно низкой (табл. 1), вследствие чего можно сделать вывод о бактериальном происхождении железистых осадков в данных источниках.

В результате профилирования микробных сообществ осадков и бактериальных матов (рис. 1а, 1б) было показано, что доминирующими филумами во всех пробах являются *Pseudomonadota* (12–75%), *Cyanobacteria* (5–85%), *Actinobacteriota* (1–55%), *Nitrospirota* (1–25%), *Acidobacteriota* (1–10%) и *Planctomycetota* (1–8%) *Bacillota* (1–10%). Остальные группы представлены в меньшей степени и являются минорными.

Важно отметить, что характер среды напрямую может влиять на видовой состав и его соотношение в сообществе. Это подтверждает тот факт, что в образцах бактериального мата из Центрального парка представители филума *Cyanobacteria* составляют 19% от общего числа, а в пробе бактериального мата и осадка из источника Виштынецкого парка являются доминирующими и составляют до 85% сообщества. Данный факт может быть объяснен тем, что обе точки хорошо освещены в течение дня, но в Виштынецком парке освещенность гораздо выше из-за отсутствия древесных растений; помимо этого, нахождение на южной стороне и меньший приток органики также могут играть свою роль. Из этого можно сделать вывод, что остальные представители сообщества в этом источнике зависят от цианобактерий как продуцентов органического вещества. Преобладание представителей филума *Actinobacteriota* (55%), играющих важную роль в аэробном разложении органических

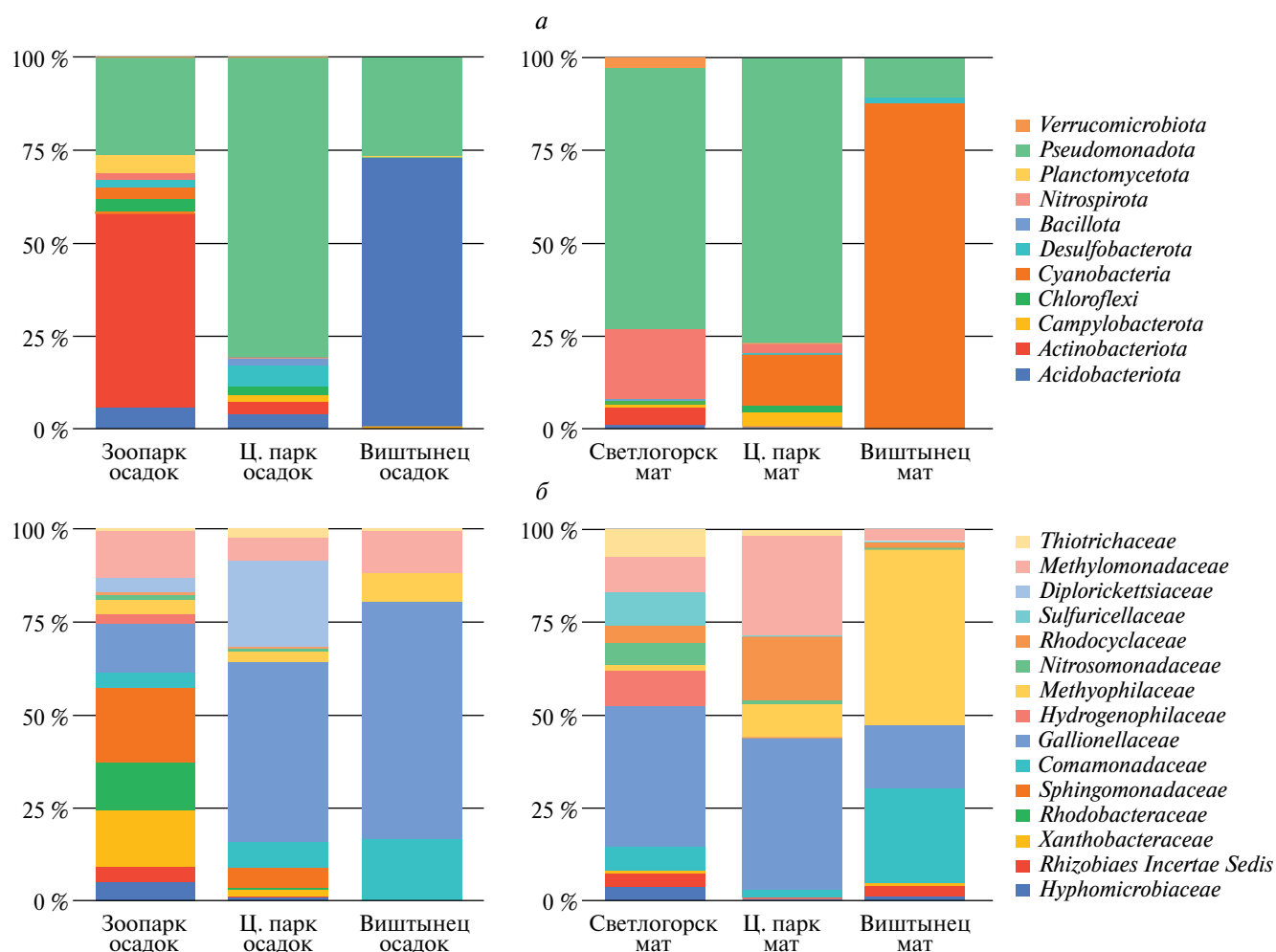


Рис. 1. Общий профиль микробных сообществ осадков (а) и микробных матов (б) исследуемых образцов. Соотношение представителей семейств внутри филума *Pseudomonadota* в осадках (в) и микробных матах (г).

веществ (Anandan et al., 2016), в образцах осадка из зоопарка может быть вызвано обилием попадающей органики, поскольку там источник является частью вольера для птиц. Большой процент представленности филума *Nitrospirota* (25%) в образцах бактериального мата из источника г. Светлогорска может говорить о большем количестве соединений азота в воде источника по сравнению с другими точками отбора проб.

Поскольку филум *Pseudomonadota* (12–75%) составлял, в основном, вторую доминирующую группу, и основные семейства железобактерий относятся к этому филуму микроорганизмов, он был рассмотрен более детально (рис. 1в, 1г). В образцах из Центрального парка доминирующими в филуме *Pseudomonadota* являлись способные к окислению двухвалентного железа представители семейства *Gallionellaceae* (48%), а также семейства *Diplorickettsiaceae* (22.84%), *Sphingomonadaceae* (5.45%) и *Comamonadaceae* (6.75%). Далее, исходя из видового состава проб из зоопарка, прослеживались различия: отталкиваясь от имеющихся данных условий и химических показателей среды (а именно кислотности и концентраций железа и кислорода; табл. 1), уместно сделать вывод о схожести условий обитания для железоокисляющих бактерий. Однако в отличие от видового состава проб из Центрального парка, где процентное содержание доминирующих железоокислителей *Gallionellaceae* было 48%, в пробах из Зоопарка бактерий того же семейства наблюдалось значительно меньше — 12.99%. Такое значительное снижение доли железоокислителей в образце может объясняться забросом микроорганизмов в источник из озера, богатого органотрофами, чье обилие объясняется большим количеством органических веществ, поэтому приоритет смещается в сторону других семейств — *Sphingomonadaceae* (20.34%), *Xanthobacteraceae* (15.16%), а также *Rhodobacteraceae* (12.49%) и *Hydrogenophilaceae* (2.51%). В пробах Национального парка “Виштынецкий” отмечались существенные различия в составе сообщества, в котором главенствующую нишу заняли представители *Cyanobacteria* (72.08%), которые создают благоприятные условия для существования внутри филума *Pseudomonadota* (26.69%) представителей семейства *Gallionellaceae* (63.88%), образуя биопленки и вытесняя других хемотрофов.

Для проб микробных матов, по аналогии с осадками, в пределах филума *Pseudomonadota* тенденция изменения видового состава сохранялась с небольшими отличиями. В образцах из Центрального парка наблюдалось преобладание представителей таксонов филума *Pseudomonadota*: высокий процент железоокисляющих бактерий *Gallionellaceae* (40.66%) и значительная представленность семейств метаноокисляющих бактерий

Methylomonadaceae (27.07%), *Methylophilaceae* (8.82%) и *Rhodocyclaceae* (17.17%), свидетельствующая об анаэробной трансформации органического вещества (Smalley et al., 2015). В образцах из г. Светлогорска также наблюдалось преобладание железоокисляющих бактерий семейства *Gallionellaceae* (37.64%) и представленность меньших в процентном соотношении групп микроорганизмов — от метилотрофных до нитрифицирующих бактерий, относящихся к семействам *Hypomicrobiaceae* (3.49%), *Xanthobacteraceae* (1.13%), *Comamonadaceae* (6.66%), *Hydrogenophilaceae* (9.57%), *Methylophilaceae* (1.47%), *Nitrosomonadaceae* (5.87%) и группе *Rhizobiales Incertae Sedis* (3.74%). В пробах микробного мата из Национального парка “Виштынецкий”, аналогично с пробами осадка, отмечено полное доминирование филума *Cyanobacteria* (85%) и семейства *Gallionellaceae* (15.37%) внутри филума *Pseudomonadota* (10.41%), однако также весомую долю занимали метилотрофы семейства *Methylophilaceae* (42.46%), что свидетельствует об анаэробных процессах разложения органического вещества в нижних слоях микробного мата.

Значения индексов альфа-разнообразия Шеннона и Симпсона (рис. 2а) исследуемых сообществ имеют сходные показатели для городских точек отбора проб: в пробах, взятых с твердого осадка Центрального парка и Зоопарка, значения индекса Шеннона были 6.35 и 6.64 соответственно, в то время как в пробах из Виштынецкого парка (микробного мата и твердого осадка) значения достигали всего лишь 2.28 и 2.01.

Наибольшее значение индекса Симпсона наблюдалось в пробах Виштынецкого парка — 0.41 и 0.5, в остальных же пробах значение не превышало 0.02. Интересно, что для осадков было характерно большее разнообразие таксономических групп, чем для микробных матов; данное явление можно объяснить доступностью неорганического субстрата дна источников и тем фактом, что соли железа при данных условиях малорастворимы и выпадают в осадок.

Наибольшее разнообразие по филумам наблюдалось в образцах из Зоопарка, что связано с наличием органического вещества и привнесением органотрофных прокариот из вольера для птиц. Кроме того, как и в случае Центрального парка, они находятся в городе, где вероятность антропогенного загрязнения сточными водами или твердыми бытовыми отходами значительно выше. Важно отметить, что во всех пробах концентрации Fe(II) были значительно выше, чем Fe(III), что свидетельствует о медленном окислении железа, особенно, учитывая низкую температуру всех источников. Низкие значения индексов Шеннона и Симпсона для проб из Виштынецкого парка связаны с меньшим количеством попадающей органики и,

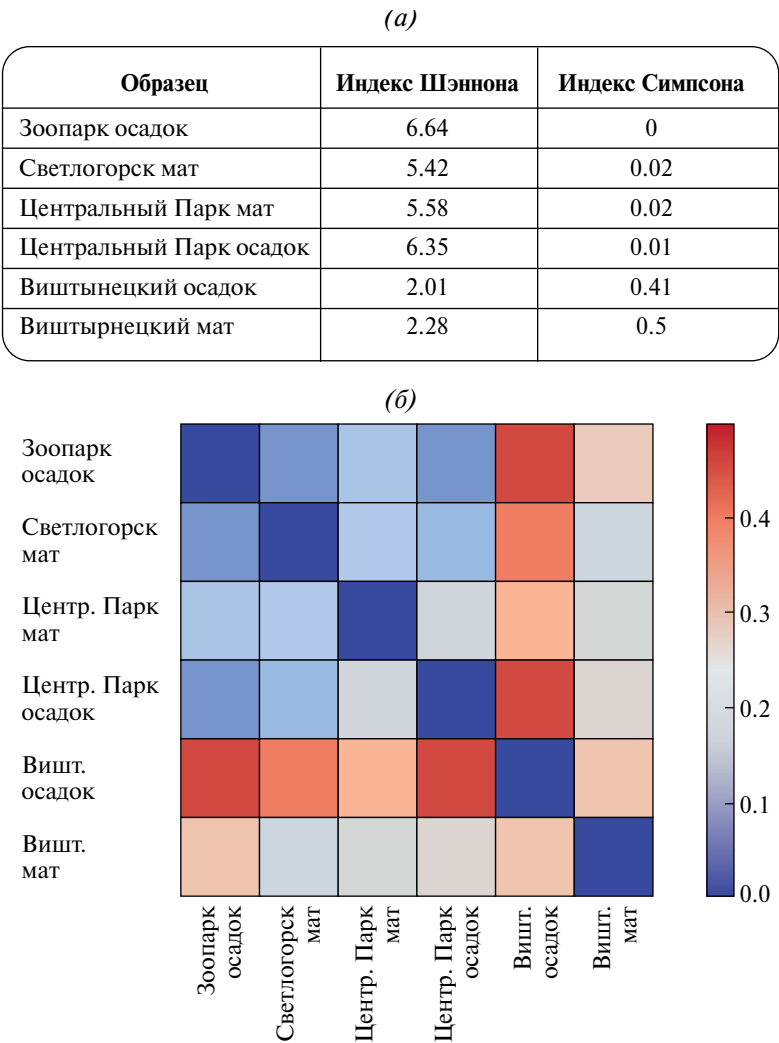


Рис. 2. Значения индексов альфа-разнообразия Шеннона и Симпсона для образцов осадков и микробных матов (а). Тепловая карта, показывающая различия сообществ образцов с разных географических точек Калининградского региона (б). Цвет квадрата показывает схожесть между каждым двумя образцами. Диапазон от синего до красного соответствует схожести от близкого до дальнего.

вследствие этого, меньшим разнообразием гетеротрофных микроорганизмов в сообществе.

Важно отметить, что водные источники, ассоциированные с городами, имеют сходные параметры бета-разнообразия (рис. 2б), что может указывать на схожесть сообществ микроорганизмов в одинаковых условиях самих источников. Интересным является факт различия состава сообществ микробного мата и осадка источника Виштынецкого парка, что, в свою очередь, можно объяснить доступностью неорганического вещества для сообществ осадка. Важно отметить достаточно выраженные отличия городских источников от водного источника в сельской местности, которые определяются влиянием городской среды на микробные сообщества.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность к.г.н. Королевой Ю.В., преподавателю ВЖШС БФУ имени И. Канта, за предоставление аппаратуры для измерения концентрации железа в образцах воды, и к.б.н. Меркелю А.Ю., с.н.с. ФИЦ Биотехнологии РАН, за помощь в обработке данных секвенирования.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- ЦВ 1.04.46-00 А “МВИ массовой концентрации железа в пробах питьевых и природных вод фотометрическим методом.” Редакция 2, 2008 г.
Anandan R., Dharumadurai D., Manogaran G.P. An introduction to Actinobacteria // Actinobacteria – basics and biotechnological applications / Eds. D. Dhanasekaran, Y. Jiang. IntechOpen, 2016. P. 4–5.
Emerson D., Scott J.J., Benes J., Bowden W. Microbial iron oxidation in the Arctic tundra and its implications for biogeochemical cycling // Appl. Environ. Microbiol. 2015. V. 81. P. 8066–8075.

- Emerson D., Weiss J.V.* Bacterial iron oxidation in circumneutral freshwater habitats: findings from the field and the laboratory // Geomicrobiol. J. 2004. V. 21. P. 405–414.
Reis M.P., Avila M.P., Costa P.S., Barbosa F.A., Laanbroek H.J., Chartone-Souza E., Nascimento A.M. The influence of human settlement on the distribution and diversity of iron-oxidizing bacteria belonging to the *Gallionellaceae* in tropical streams // Front. Microbiol. 2014. V. 5. Art. 630.
Singh V.K., Singh A.L., Singh R., Kumar A. Iron oxidizing bacteria: insights on diversity, mechanism of iron oxidation and role in management of metal pollution // Environ. Sustain. 2018. V. 1. P. 221–231.
Smalley N.E., Taipale S., De Marco P., Doronina N.V., Kyrpides N., Shapiro N., Kalyuzhnaya M.G. Functional and genomic diversity of methylotrophic *Rhodocyclaceae*: description of *Methyloversatilis discipulorum* sp. nov. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2015. V. 65. P. 2227–2233.

SHORT COMMUNICATION

Bacterial Diversity of Historic Iron-Containing Water Sources of the Kaliningrad Region

E. E. Suprunov¹, I. A. Shnurova¹, B. E. Efimenko¹, and V. V. Lisun^{1, *}

¹*I. Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, 236016, Russia*

**e-mail: Li.sun.v.29@gmail.com*

Received October 13, 2023; revised December 20, 2023; accepted December 22, 2023

Abstract. The Kaliningrad region has a rich historical heritage, including several water sources with high iron content. Known since the end of the 19th century, they are rich in ferrous iron, which is oxidized by bacterial communities. They include many different taxonomic groups of bacteria. In this work, for the first time, profiling of microbial communities of iron-containing sources in the Kaliningrad region was carried out; During the study, 6 samples were taken from four geographical locations. Based on the results of profiling, taxonomic groups were identified belonging to the phyla Acidobacteriota, Desulfobacteriota, Cyanobacteriota, Proteobacteria, Nitrospirota, and among the predominant groups the gammaproteobacterium of the genus *Gallionella* stands out.

Keywords: iron-containing sources, iron-oxidizing bacteria, bacterial mat, chemolithoautotroph, *Gallionella*