

СОДЕРЖАНИЕ

Том 87, номер 4, 2018

ОБЗОР

- Филогенетика, биогеография и экология метилотрофных дрожжей гетерогенного рода *Ogataea*: успехи и перспективы
Г. И. Наумов, М. Ю. Шаламитский, Е. С. Наумова, Ч.-Ф. Ли 335

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- Аэробная биодegradация компонентов сырой нефти ацидофильными микобактериями
А. Е. Иванова, И. А. Борзенков 344
- Новые штаммы *Bacillus subtilis* как перспективные пробиотики
Г. Ф. Хадиева, М. Т. Лутфуллин, Н. К. Мочалова, О. А. Ленина, М. Р. Шарипова, А. М. Марданова 356
- Thermosulfurimonas marina* sp. nov. – автотрофная серодиспропорционирующая и нитратвосстанавливающая бактерия, выделенная из мелководной морской гидротермы
А. А. Фролова, Г. Б. Слободкина, Р. В. Баслеров, А. А. Новиков, Е. А. Бонч-Осмоловская, А. И. Слободкин 366
- Разнообразие цианобактерий и их участие в образовании минералов в гидротермах Баунтовской группы (Байкальская рифтовая зона)
Д. Д. Цыренова, Д. Д. Бархутова, С. П. Бурюхаев, Е. В. Лазарева, А. В. Брянская, Л. В. Замана 373
- Сравнение разнообразия и функций эпифитных бактерий культурных и сорных растений в агроценозе
Т. Г. Добровольская, К. А. Хуснетдинова, Н. А. Манучарова, А. В. Якушев, Т. И. Хуснетдинова 386

СПЕЦИАЛЬНЫЙ ВЫПУСК (Микробиология озер Центральной Азии) МИНИ-ОБЗОР

- Микробные сообщества озер Центральной Азии – индикаторы климатических и экологических изменений региона
З. Б. Намсараев 393

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- Аминопептидазная активность галоалкалофильных бактерий рода *Halomonas*, выделенных из содово-соленых озер пустыни Бадаин Жаран
Е. Б. Эрдынеева, А. А. Раднагуруева, Я. Е. Дунаевский, Н. Л. Белькова, З. Б. Намсараев, Е. В. Лаврентьева 397
- Субстратная специфичность метаногенных сообществ из донных отложений оз. Байкал, ассоциированных с разгрузками углеводородных газов
С. В. Букин, О. Н. Павлова, Г. В. Калмычков, В. Г. Иванов, Т. В. Погодаева, Ю. П. Галачьянц, Ю. С. Букин, А. В. Хабеев, Т. И. Земская 409
- Структура микробных сообществ в осадках щелочных озер Забайкалья с различной минерализацией
С. В. Зайцева, Е. Ю. Абидуева, А. А. Раднагуруева, С. М. Базаров, С. П. Бурюхаев 421
- Разнообразие прокариот в планктонных сообществах соленых Соль-Илецких озер (Оренбургская область)
Е. А. Селиванова, Д. В. Пошвина, Ю. А. Хлопко, Н. Е. Гоголева, А. О. Плотников 432
- Разнообразие цианобактерий в щелочном озере Хилганта в засушливый и влажный период
З. Б. Намсараев, Т. В. Колганова, Е. О. Патутина, Д. Д. Цыренова, О. С. Самылина 448
- Сукцессионные изменения микробного сообщества щелочного озера Хилганта в засушливый период
З. Б. Намсараев, В. М. Горленко, С. П. Бурюхаев 458

Contents

Vol. 87, No. 4, 2018

Reviews

- Phylogenetics, Biogeography and Ecology of Methylophilic Yeasts of the Heterogeneous Genus *Ogataea*: Achievements and Prospects
G. I. Naumov, M. Yu. Shalamitskiy, E. S. Naumova, and Ch.-F. Lee 335
-

Experimental Articles

- Aerobic Biodegradation of Crude Oil Components by Acidophilic Mycobacteria
A. E. Ivanova and I. A. Borzenkov 344
- New *Bacillus subtilis* Strains as Promising Probiotics
G. F. Khadieva, M. T. Lutfullin, N. K. Mochalova, O. A. Lenina, M. R. Sharipova, and A. M. Mardanov 356
- Thermosulfurimonas marina* sp. nov., an Autotrophic Sulfur-Disproportionating and Nitrate-Reducing Bacterium Isolated from a Shallow-Sea Hydrothermal Vent
A. A. Frolova, G. B. Slobodkina, R. V. Baslerov, A. A. Novikov, E. A. Bonch-Osmolovskaya, and A. I. Slobodkin 366
- Cyanobacterial Diversity and the Role of Cyanobacteria in Formation of Minerals in the Baunt Group Hydrotherms (Baikal Rift Zone)
D. D. Tsyrenovaa, D. D. Barkhutova, S. P. Burykhaev, E. V. Lazareva, A. V. Bryanskaya, and L. V. Zhamana 373
- Comparison of Diversity and Functions of Epiphytic Bacteria from Cultivated and Weed Plants in Agroecosystems
T. G. Dobrovol'skaya, K. A. Khusnetdinova, N. A. Manucharova, A. V. Yakushev, and T. I. Khusnetdinova 386
-

Special Issue: Lakes of Central Asia

Mini-Review

- Microbial Communities of the Central Asian Lakes as Indicators of Climatic and Ecological Changes in the Region
Z. B. Namsaraev 393
-

Experimental Articles

- Aminopeptidase Activity of Haloalkalophilic Bacteria of the Genus *Halomonas* Isolated from the Soda-Saline Lakes in the Badain Jaran Desert
E. B. Erdyneeva, A. A. Radnagurueva, Ya. E. Dunaevsky, N. L. Belkova, Z. B. Namsaraev, and E. V. Lavrentieva 397
- Substrate Specificity of Methanogenic Communities from Lake Baikal Bottom Sediments Associated with Hydrocarbon Gas Discharge
S. V. Bukin, O. N. Pavlova, G. V. Kalmychkov, V. G. Ivanov, T. V. Pogodaeva, Yu. P. Galach'yants, Yu. S. Bukin, A. V. Khabuev, and T. I. Zemskaya 409
- Structure of Microbial Communities of the Sediments of Alkaline Transbaikalia Lakes with Different Salinity
S. V. Zaitseva, E. Yu. Abidueva, A. A. Radnagurueva, S. M. Bazarov, and S. P. Buryukhaev 421
- Diversity of Prokaryotes in Planktonic Communities of Saline Sol-Iletsk Lakes (Orenburg Oblast, Russia)
E. A. Selivanova, D. V. Poshvina, Yu. A. Khlopko, N. E. Gogoleva, and A. O. Plotnikov 432
- Cyanobacterial Diversity in the Alkaline Lake Khilganta during the Dry and Wet Periods
Z. B. Namsaraev, T. V. Kolganova, E. O. Patutina, D. D. Tsyrenova, and O. S. Samylina 448
- Successional Changes in the Microbial Community of the Alkaline Lake Khilganta during the Dry Season
Z. B. Namsaraev, V. M. Gorlenko, and S.P. Buryukhaev 458
-
-

Посвящается памяти выдающегося зимолога
Клетта Курицмана (1938–2017)

ФИЛОГЕНЕТИКА, БИОГЕОГРАФИЯ И ЭКОЛОГИЯ МЕТИЛОТРОФНЫХ ДРОЖЖЕЙ ГЕТЕРОГЕННОГО РОДА *OGATAEA*: УСПЕХИ И ПЕРСПЕКТИВЫ

© 2018 г. **Г. И. Наумов**^{a, *}, М. Ю. Шаламитский^b, Е. С. Наумова^a, Ч.-Ф. Ли^c

^a Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов,
Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия

^b Всероссийский национальный научно-исследовательский институт виноградарства и виноделия “Магарач”
Российской академии наук, Ялта, Россия

^c Department of Applied Science, National Tsing Hua University of Education, Hsinchu 30014, Taiwan

*e-mail: gnaumov@yahoo.com

Поступила в редакцию 27.12.2017 г.

Анализ литературных молекулярных сведений и данных из GenBank показал, что род *Ogataea* гетерогенен и представлен, по крайней мере, пятью еще не описанными родами. Полноценный филогенетический анализ современного рода *Ogataea* может быть осуществлен только на основе мультигенного анализа всех известных его видов. Обсуждаются возможности молекулярной видовой идентификации дрожжей в биогеографических и экологических исследованиях.

Ключевые слова: комплекс *Ogataea polymorpha*, метилотрофные дрожжи, молекулярная филогения, мультигенный анализ, новые роды, род *Ogataea*

DOI: 10.1134/S0026365618040158

ВВЕДЕНИЕ

Дрожжевой метилотрофный род *Ogataea*, первоначально охватывающий пять видов, — *O. glaucozyma*, *O. henricii*, *O. minuta*, *O. philodendra*, *O. polymorpha* и разновидность *O. minuta* var. *nonfermentans*, был выделен из гетерогенного рода *Pichia* на основании частичного секвенирования генов малой (SSU) и большой (LSU) субъединиц рРНК (Yamada et al., 1994). Позднее разновидность *O. minuta* var. *nonfermentans* была восстановлена самостоятельным видом *O. nonfermentans* (Kurtzman, Robnett, 2010). Типовым видом рода *Ogataea* является *O. minuta*. Род *Ogataea*, как и его родственные метилотрофные роды *Komagataella* и *Kuraishia*, долго не находил признания (Kurtzman, 1998; Kurtzman, Robnett, 2010). Благодаря мультигенному анализу, к моменту выхода современного определителя дрожжей (Kurtzman, 2011a) состав рода стремительно расширился и охватывал уже 37 видов, включая представителей рода *Candida*. В настоящее время численность рода *Ogataea*, с учетом анаморф, достигла 67 видов (Santos et al., 2015; Naumov et al., 2017; Lu et al., 2017).

Увеличение числа видов рода *Ogataea* происходит из-за биотехнологической важности метилотрофных дрожжей и их интенсивных экологических исследований в различных регионах мира. Метилотрофные дрожжи *Ogataea* имеют большое прикладное и фундаментальное значение, привлекая к себе внимание биотехнологов, генных инженеров, генетиков и молекулярных биологов. Особенно это относится к генетическому комплексу *Ogataea (Hansenula) polymorpha*: *O. angusta*, *O. haglerorum*, *O. parapolyomorpha* и *O. polymorpha* (Gleeson et al., 1984, 1986; Gleeson, Sudbery, 1988, 1989; Marri et al., 1993; Naumov et al., 1997; Blandin et al., 2000; Gellissen, 2002; Lahtchev, 2002; Ramezoni-Rad et al., 2003; Kunze et al., 2009; Eldarov et al., 2011; Наумова и соавт., 2013; Naumov et al., 2017).

Цель нашего сообщения — обобщить известные сведения по филогенетике, и связанных с ней биогеографии и экологии метилотрофных дрожжей *Ogataea*.

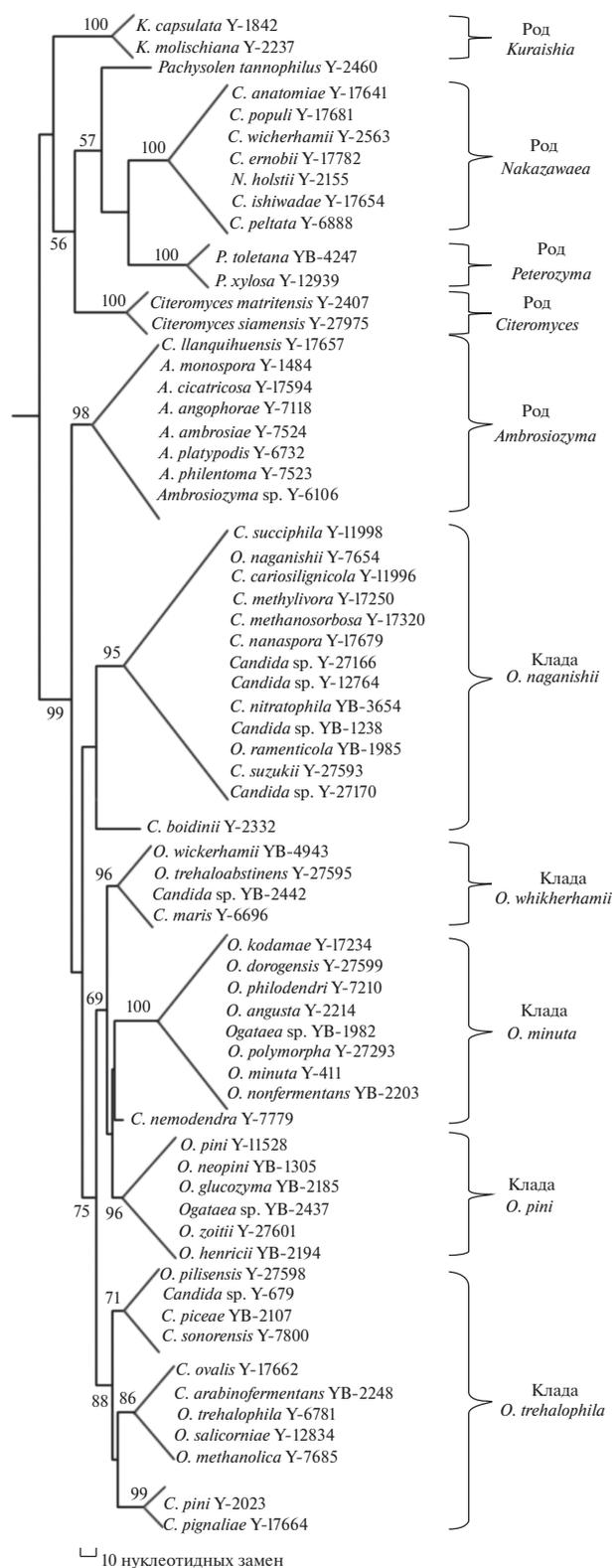


Рис. 1. Филогенетическое древо дрожжей *Ogataea* и родственных таксонов по Kurtzman (2011a) в нашей модификации в виде схемы. Приведен анализ последовательностей LSU рРНК, SSU рРНК, гена EF-1 α и митохондриальной SSU рРНК. Шкала соответствует 10 нуклеотидным заменам на 1000 нуклеотидных позиций. Приводятся значения бустрепа >50%.

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

Мультигенный анализ с применением четырех хромосомных молекулярных маркеров LSU рРНК, SSU рРНК, фактора элонгации трансляции EF-1 α и митохондриальной SSU рРНК позволил дифференцировать с высокой статистической поддержкой роды *Ogataea*, *Kuraiishia*, *Pachysolen*, *Nakazawaea*, *Peterozyma*, *Citeromyces*, *Ambrosiozyma*, *Komagataella* и *Phaffomyces* (Kurtzman, Robnett, 2010; Kurtzman, 2011a). На рис. 1 приводится наша схема филогенетического древа указанных родов согласно Kurtzman (2011a). Что касается рода *Ogataea*, то в представленном виде, на наш взгляд, он состоит из четко обособленных, по крайней мере, пяти клад: 1) клда *O. naganishii*; 2) клда *O. wickerhamii*; 3) клда *O. minuta*; 4) клда *O. pini*; 5) клда *O. trehalophila*. Надо принять во внимание, что последняя клда состоит из трех субклад. Следует отдать должное авторам Kurtzman и Robnett (2010), не исключивших возможность принадлежности клды № 1 к самостоятельному, так называемому “сестринскому” роду. Мы полагаем, что в состав гетерогенного рода *Ogataea* входит, по меньшей мере, пять самостоятельных родов. Уже основатели рода *Ogataea* (Yamada et al., 1994) обратили внимание на его филогенетическую гетерогенность, указав, что виды *O. glucozyma* и *O. henricii* существенно отличаются от остальных трех видов *O. minuta*, *O. philodendra* и *O. polymorpha* по 18S рРНК. Действительно, первые два вида находятся в клде *O. pini*, тогда как три другие (дополнительно *O. nonfermentans*) в клде *O. minuta* (рис. 1). Приведенный на рис. 1 состав сборного рода *Ogataea* включает 44 штамма. На основе лишь трех маркеров (LSU рРНК, SSU рРНК, EF-1 α) было опубликовано (Kurtzman, 2011b) еще одно частичное древо рода *Ogataea*, охватывающее только клды № 2, 3 и 4 (рис. 2). Несмотря на использование только трех маркеров, статистическая поддержка этих клд даже несколько выше, чем на рис. 1. К сожалению, при идентификации 25 остальных видов рода *Ogataea* был использован только один маркер – домен D1/D2 гена LSU рРНК или, реже, два маркера (D1/D2 и ITS), тогда как в некоторых работах, например, Santos et al. (2015), для одних видов только D1/D2, а для других – D1/D2 и ITS. Полученные результаты позволили идентифицировать новые виды *Ogataea*, но не давали возможность построить полноценные древа рода *Ogataea* sensu Kurtzman и Robnett (2010) с досто-

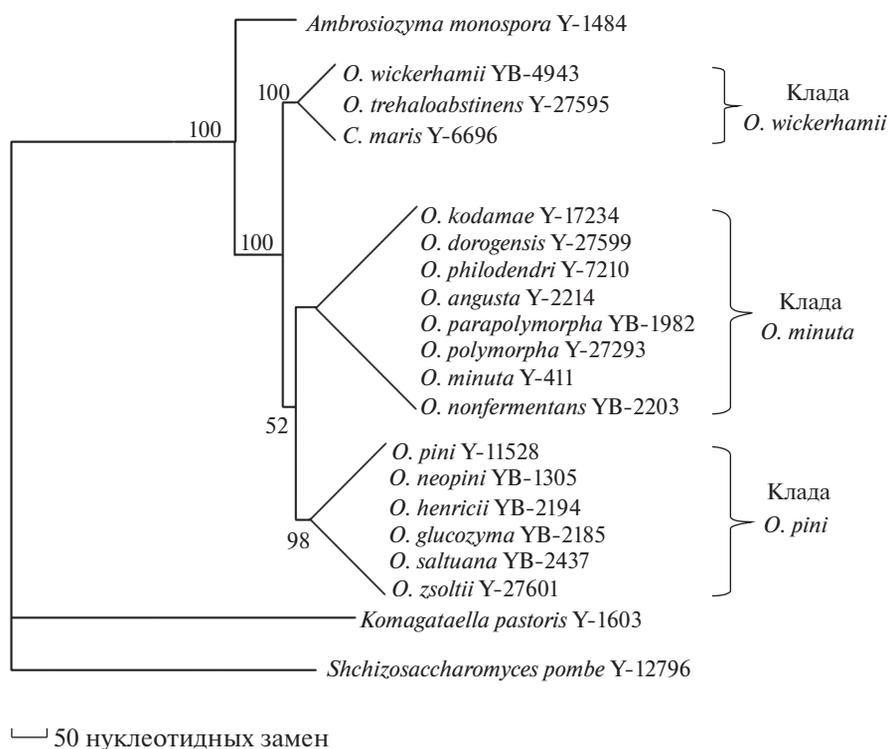


Рис. 2. Частичное филогенетическое древо дрожжей *Ogataea* в связи с описанием вида *O. parapolyomorpha* (Kurtzman 2011b) в нашей модификации в виде схемы. Приведен анализ только трех нуклеотидных последовательностей: LSU рРНК, SSU рРНК и EF-1 α . Шкала соответствует 50 нуклеотидным заменам на 1000 нуклеотидных позиций. Приводятся значения бустрепа >50%.

верными кладами. Надо отметить, что в последней работе не использовался маркер ITS.

В качестве примера приведем построенное нами древо *Ogataea* (со всеми известными в настоящее время видами), которое получено с использованием для одних видов трех маркеров (D1/D2, ITS1-5.8S-ITS2, EF-1 α), для других двух известных маркеров (D1/D2 и ITS1-5.8S-ITS2) или даже одного маркера (D1/D2), как это приведено в табл. 1 и на рис. 3. В отличие от схемы древа *Ogataea* (рис. 1), на нашем древе (рис. 3) нет достоверных многокомпонентных клад. Только комплекс *O. polymorpha*, где были использованы три маркера, образует достоверный кластер. Остальные клады перемешались. Таким образом, проблему ревизии гетерогенного рода *Ogataea*, очевидно, надо решать только с помощью мультигенного анализа всех составляющих его видов.

БИОГЕОГРАФИЯ И ЭКОЛОГИЯ

Дрожжи рода *Ogataea* распространены по всему миру: Австралия, Азия, Европа, Северная и Южная Америка. Обращает на себя внимание, что много видов *Ogataea* описано в Европе (Венгрия), Северной Америке (США) и Азии (Таиланд,

Япония), там, где проводилась интенсивная изоляция и изучение метанолусваивающих дрожжей (табл. 1). Распространение дрожжей *Ogataea* связано, прежде всего, с растительными субстратами (листья, гнилая древесина), насекомыми, повреждающими древесину, и почвой. Тем не менее, следует признать, что экология этих дрожжей изучена недостаточно. Даже большое количество штаммов *Ogataea* в основных, глобальных коллекциях идентифицировано только физиологическими тестами. Следует напомнить, что существенные различия по D1/D2 последовательности позволяют идентифицировать новые виды. Однако отсутствия различий по этим последовательностям недостаточно для однозначного определения видовой принадлежности штаммов и, как следствие, нельзя быть уверенным, что штаммы, имеющие различное географическое или экологическое происхождение, могут иметь одну и ту же видовую принадлежность. Недавнее изучение почти девяти тысяч штаммов дрожжей, хранящихся в коллекции CBS-KNAW, показало, что 9, 6 и 3% видов не различались, соответственно, по LSU, ITS и по обоим этим последовательностям (Vu et al., 2016). Здесь уместно также сослаться на более раннюю публикацию о невозможности дифференциации

Таблица 1. Виды и штаммы рода *Ogataea*, изученные мультigenным анализом

Вид	Типовой штамм	Происхождение	Регистрационный номер в GenBank			Ссылки
			D1/D2	ITS	EF-1alpha	
<i>O. allantospora</i>	CBS 10576	Лист дерева, Венгрия	EF471446	KY104390		Péter et al., 2007
<i>O. angusta</i>	NRRL Y-2214	Дрозofiла, США	EF550269	JF756588	EF552493	Blandin et al., 2000
<i>O. cecidiorum</i>	CBS 11522	Галл листа ивы, Россия	FJ897742	FJ897742		Glushakova et al., 2010
<i>O. chonburiensis</i>	CBS 10363	Почва, Таиланд	FY914941	FJ914924		Limtong et al., 2008
<i>O. corticis</i>	NBRC 1794	Кора дерева, Япония	AB440284	AB440278		Nagatsuka et al., 2008
<i>O. deakii</i>	NRRL Y-63656	Гнилая древесина, Венгрия	GQ265921	KC252610	HE963832	Čadéz et al., 2013
<i>O. dorogensis</i>	NRRL Y-27599	Гнилая древесина, Венгрия	EU011620	KY104394	EU014729	Kurtzman, Robnett, 2010
<i>O. falcaomoraisii</i>	NRRL Y-27756	Гнилая древесина, Венгрия	AY561260	KY104395		Morais et al., 2004
<i>O. ganodermae</i>	CBS 10646	Гриб на течи дерева, Китай	EU117201	EU117202		Ji, Bai, 2008
<i>O. glucozyma</i>	NRRL YB-2185	Ель Энгельмана, США	EU011626		EU014736	Kurtzman, Robnett, 2010
<i>O. haglerorum</i>	CBS 14645	Гниющий кактус, США	KY492605	KY492390	KY492601	Naumov et al., 2017
<i>O. henricii</i>	NRRL YB-2194	Помет птиц, США	EU011625		EU014735	Kurtzman, Robnett, 2010
<i>O. histriatica</i>	NRRL Y-63658	Оливковое масло, Словения	HE799677	HE799677	HE963834	Čadéz et al., 2013
<i>O. kanchanaburiensis</i>	CBS 12673	Лист манто, Таиланд	AB734090	AB734093		Limtong et al., 2013
<i>O. kodamae</i>	NRRL Y-17234	Экскременты насекомого, ЮАР	EU011616	KY104400	EU014725	Kurtzman, Robnett, 2010
<i>O. kolombanensis</i>	NRRL Y-63657	Оливковое масло, Словения	FR690079	HF559222	HE963833	Čadéz et al., 2013
<i>O. mangiferae</i>	CBS 13492	Лист манто, Бразилия	KF585022	KF585022		Santos et al., 2015
<i>O. methanolica</i>	NRRL Y-7685	Почва, Япония	EU011638		EU014748	Kurtzman, Robnett, 2010
<i>O. methylivora</i>	NRRL Y-17250	Гнилая древесина, Япония	EU011611		EU014720	Kurtzman, Robnett, 2010
<i>O. minuta</i>	NRRL Y-411	Ферментация гриба, США	EU011618		EU014727	Kurtzman, Robnett, 2010
<i>O. naganishii</i>	NRRL Y-7654	Течь камелии, Япония	EU011601		EU014710	Kurtzman, Robnett, 2010
<i>O. nakhonphanomensis</i>	CBS 10362	Течь дерева, Таиланд	FJ914925	FJ914942		Limtong et al., 2008
<i>O. neixiangensis</i>	CBS 14695	Гнилая древесина, Китай	KY213811			Lu et al., 2017
<i>O. neopini</i>	NRRL YB-1305	Экскременты насекомого, США	EU011624		EU014734	Kurtzman, Robnett, 2010
<i>O. nitratoversa</i>	NRRL Y-48449	Лист бука, Венгрия	EU327036	EU327032		Péter et al., 2008
<i>O. nonfermentans</i>	NRRL YB-2203	Река, США	EU011619	KY104413	EU014728	Kurtzman, Robnett, 2010
<i>O. paradorogensis</i>	CBS 10978	Экскременты насекомого, Япония	AB437093	AB437094		Nakase et al., 2008
<i>O. paraovalis</i>	CBS 14697	Гнилая древесина, Китай	KY213806			Lu et al., 2017
<i>O. parapolyomorpha</i>	NRRL YB-1982	Насекомое, США	EU011621	JF756591	EU014731	Kurtzman, Robnett, 2010
<i>O. philodendri</i>	NRRL Y-7210	Насекомое, ЮАР	EU011617		EU014726	Kurtzman, Robnett, 2010
<i>O. phyllophila</i>	CBS 12095	Лист дерева, Таиланд	AB600532	KY104421		Koowadjanakul et al., 2011
<i>O. pitlensis</i>	NRRL Y-27598	Гнилой дуб, Венгрия	EU011630		EU014740	Kurtzman, Robnett, 2010
<i>O. pini</i>	NRRL Y-11528	Жук-короед, США	EU011623		EU014733	Kurtzman, Robnett, 2010
<i>O. polymorpha</i>	NRRL Y-5445	Почва, Бразилия	GU397333	JF756589	GU397335	Kurtzman, Robnett, 2010
<i>O. populiabae</i>	NCAIM Y.01853	Течь тополя, Венгрия	EU872172			Péter et al., 2009
<i>O. ramenticola</i>	NRRL YB-1985	Экскременты насекомого, США	EU011608		EU014717	Kurtzman, Robnett, 2010
<i>O. salicorniae</i>	NRRL Y-12834	Соленая вода, Франция	EU011637		EU014747	Kurtzman, Robnett, 2010
<i>O. saltuana</i>	NRRL Y-48448	Гнилая древесина, Венгрия	EU327033	JF430477		Péter et al., 2011
<i>O. siamensis</i>	CBS 10095	Цветок Эвратамии, Таиланд	FJ914926	FJ914943		Limtong et al., 2008
<i>O. thermomethanolica</i>	CBS 10098	Почва, Таиланд	FJ914927	FJ914944		Limtong et al., 2008
<i>O. trehalobastinens</i>	NRRL Y-27595	Течь дуба, Венгрия	EU011614		EU014723	Kurtzman, Robnett, 2010

Таблица 1. Окончание

Вид	Типовой штамм	Происхождение	Регистрационный номер в GenBank			Ссылки
			D1/D2	ITS	EF-1alpha	
<i>O. trehalophila</i>	NRRL Y-6781	Течь тополя, США	EU011636		EU014746	Kurtzman, Robnett, 2010
<i>O. wangdongensis</i>	CBS 12674	Лист винограда, Таиланд	AB734091	AB734094		Limtong et al., 2013
<i>O. wickerhamii</i>	NRRL YB-4943	Почва, Финляндия	EU011612		EU014721	Kurtzman, Robnett, 2010
<i>O. zsolitii</i>	NRRL Y-27601	Гнилая шпала, Венгрия	EU011628		EU014738	Kurtzman, Robnett, 2010
<i>Ogataea</i> sp.	11-486	Неизвестно	JX515971	JX515970		GenBank
<i>Ogataea</i> sp.	LN18	Лист дерева, Таиланд	AB617900			Koowadjanakul et al., 2011
<i>Ogataea</i> sp.	UWOPS 00-149.2	Течь дерева, Коста-Рика	AF322056			Lachance et al., 2001
<i>Ogataea</i> sp.	NRRL Y-12764	Неизвестно	EU011605		EU014714	Kurtzman, Robnett, 2010
<i>Ogataea</i> sp.	NRRL Y-27166	Неизвестно	EU011603		EU014712	Kurtzman, Robnett, 2010
<i>Ogataea</i> sp.	NRRL Y-27170	Неизвестно	EU011599		EU014708	Kurtzman, Robnett, 2010
<i>Ogataea</i> sp.	NRRL Y-679	Неизвестно	EU011632		EU014742	Kurtzman, Robnett, 2010
<i>Ogataea</i> sp.	NRRL YB-1238	Неизвестно	EU011607		EU014716	Kurtzman, Robnett, 2010
<i>Ogataea</i> sp.	NRRL YB-2442	Неизвестно	EU011615		EU014724	Kurtzman, Robnett, 2010
<i>Ogataea</i> sp.	NRRL YB-2248	Экскременты насекомого, США	EU011635		EU014745	Kurtzman, Robnett, 2010
<i>C. arabinofermentans</i>	NRRL Y-2332	Дубильная жидкость, Испания	EU011598		EU014707	Kurtzman, Robnett, 2010
<i>C. boidinii</i>	NRRL Y-11996	Гнилая древесина, Япония	EU011609		EU014718	Kurtzman, Robnett, 2010
<i>C. cariositignicola</i>	CBS 12096	Лист дерева, Таиланд	AB604653			Koowadjanakul et al., 2011
<i>C. chumphonensis</i>	CBS 10307	Течь дуба, Венгрия	AY069955			Péter et al., 2006
<i>C. floccosa</i>	JCM 12266	Почва, Таиланд	AB120219			Limtong et al., 2004
<i>C. krabiensis</i>	NRRL Y-17657	Течь бука, Чили	EU011589		EU014698	Kurtzman, Robnett, 2010
<i>C. ilanquihuensis</i>	NRRL Y-6696	Морская вода, Австралия	EU011613		EU014722	Kurtzman, Robnett, 2010
<i>C. maris</i>	CBS 12097	Лист дерева, Таиланд	AB604652			Koowadjanakul et al., 2011
<i>C. mattranensis</i>	NRRL Y-17320	Сточная вода, Япония	EU011600		EU014709	Kurtzman, Robnett, 2010
<i>C. meihanosorbosa</i>	NRRL Y-17679	Обезьяна, Франция	EU011602		EU014711	Kurtzman, Robnett, 2010
<i>C. napaaspora</i>	NRRL Y-7779	Жук, ЮАР	EU011629		EU014739	Kurtzman, Robnett, 2010
<i>C. nemodendra</i>	NRRL YB-3654	Жук-короед, США	EU011606		EU014715	Kurtzman, Robnett, 2010
<i>C. nitratophila</i>	CBS 8843	Течь дерева, Коста-Рика	AF313350	KY102275		Lachance et al., 2001
<i>C. orntonii</i>	NRRL Y-17662	Почва, Япония	EU011634		EU014744	Kurtzman, Robnett, 2010
<i>C. ovalis</i>	NRRL YB-2107	Экскременты насекомого, США	EU011633		EU014743	Kurtzman, Robnett, 2010
<i>C. piceae</i>	NRRL Y-17664	Дубильная жидкость, Франция	EU011640		EU014750	Kurtzman, Robnett, 2010
<i>C. pignaliae</i>	NRRL Y-2023	Сосна, Швеция	EU011639		EU014749	Kurtzman, Robnett, 2010
<i>C. pini</i>	NRRL Y-7800	Кактус, Мексика	EU011631		EU014741	Kurtzman, Robnett, 2010
<i>C. sonorensis</i>	NRRL Y-11998	Почва, Япония	EU011597		EU014706	Kurtzman, Robnett, 2010
<i>C. succiphila</i>	NRRL Y-27593	Кора дерева, Тайвань	EU011610		EU014719	Kurtzman, Robnett, 2010
<i>C. suzukii</i>	ATCC 62898	Жук-короед, США	FJ381703	FJ381696		Suh, Zhou, 2010a
<i>C. xylosterini</i>	NRRL Y-2026	Неизвестно	EF550227	DQ104710		GenBank
<i>Pichia membranifaciens</i>						

Примечание. Названия основных коллекций: NRRL – ARS Culture Collection, National Center for Agricultural Utilization Research, Пеория, США; CBS – Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Утрехт, Нидерланды. Здесь и на рис. 3 используется название *Ogataea* sp. вместо *Candida* sp.

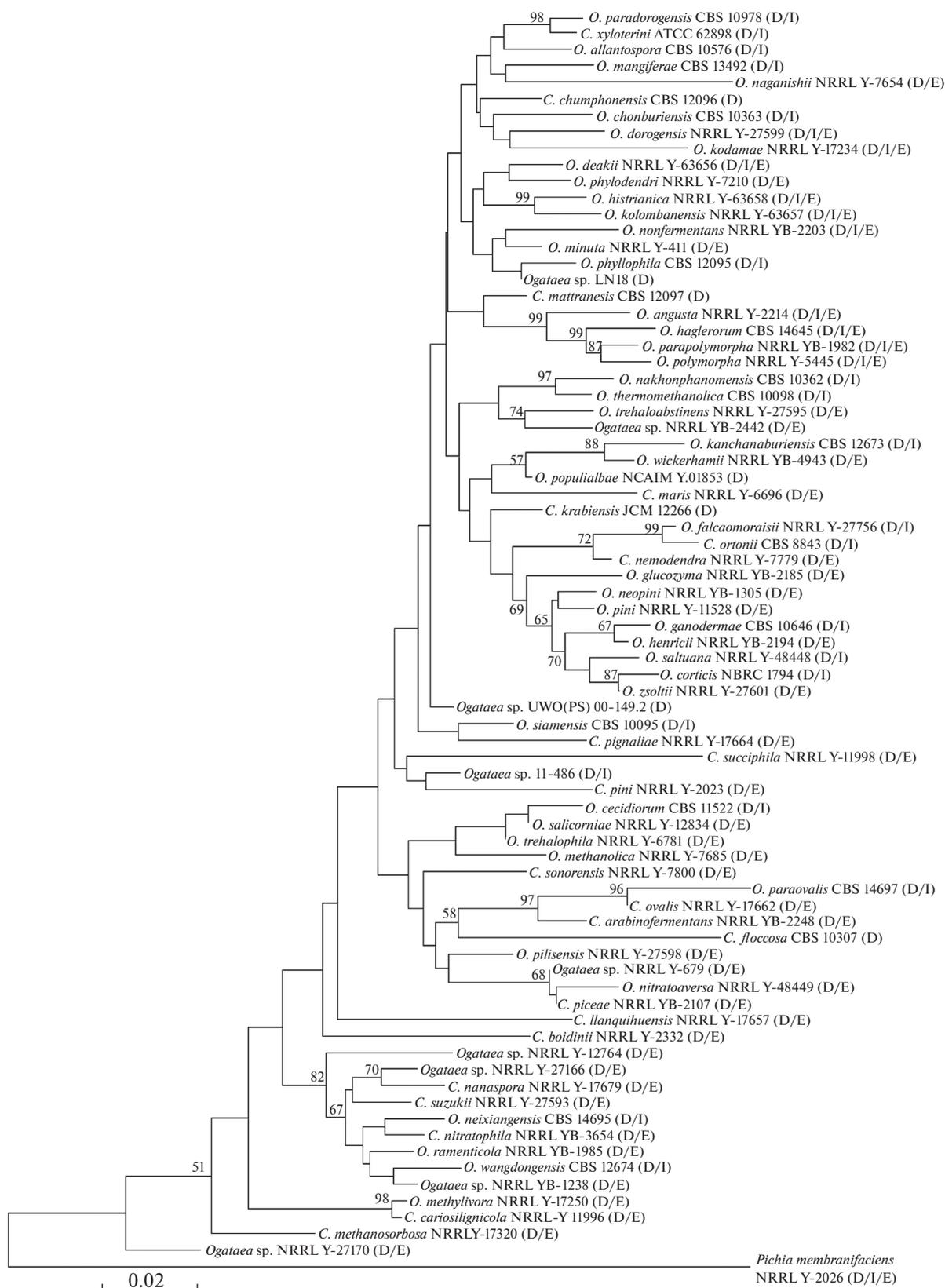


Рис. 3. Филогенетическое родство видов *Ogataea* согласно анализу нуклеотидных последовательностей домена D1/D2 гена 26S рРНК, а также при наличии (в GenBank) ITS-фрагмента, включающего ген 5.8S рРНК и внутренние транскрибируемые спейсеры ITS1/ITS2, и фактора элонгации трансляции EF-1 α . В качестве внешней группы использована типовая культура дрожжей *Pichia membranifaciens* NRRL Y-2026. Шкала соответствует 20 нуклеотидным заменам на 1000 нуклеотидных позиций. Приводятся значения бустрепа >50%. Множественные выравнивания нуклеотидных последовательностей проводили вручную, используя программу BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). Древо построено методом объединения соседей (Neighbor-Joining) с применением Кимура-2 параметра в программе MEGA 6 (Tamura et al., 2013). В скобках, после типовых штаммов, через косую линию приводятся обозначения использованных маркеров: D = D1/D2, I = ITS1-5.8S-ITS2, E = EF-1 α .

фенотипически близких индустриально-важных видов *Kluyveromyces lactis* и *Kluyveromyces marxianus* по нуклеотидным последовательностям домена D1/D2 (Lachance, 2011), несмотря на большие различия геномов этих дрожжей (Puson et al., 1987). Для правильной идентификации различных географических и экологических штаммов одного и того же вида необходим поиск и использование видоспецифичных молекулярных маркеров; большую помощь может также оказать микросателлитный анализ ДНК.

Показательным примером является изучение биогеографии и экологии дрожжей клады *O. minuta*, точнее, входящего в нее комплекса видов *O. polymorpha*. Многочисленные штаммы *O. angusta* и *O. parapolyomorpha*, согласно молекулярным маркерам, обнаружены только в Северной Америке (США) в различных источниках (их векторами могут быть различные насекомые), тогда как *O. polymorpha* – космополит и найден в США, Бразилии, Испании, Венгрии, Коста-Рике, Южной Корее, Украине, Таиланде и Тайване (Suh, Zhou, 2010b; Kurtzman, 2011b; Наумова и соавт., 2013; Naumov et al., 2017). Обращает на себя внимание биогеография и экология дрожжей *O. haglerorum* (Naumov et al., 2017). Этот вид ассоциирован с кактусами рода *Opuntia*, в основном, в пустынях на юго-западе США. В соответствии с данными по ДНК-ДНК реассоциации, более 30 штаммов *O. haglerorum* были изолированы из кактусов *Opuntia phaeacantha*, *Opuntia ficus-indica* и *Opuntia lindheimi* в южной Аризоне и Техасе; кроме того, два штамма были изолированы из некротической поверхности *Opuntia stricta*, которая колонизирует Квинсленд (Австралия) (Phaff, 1985; Starmer et al., 1986, 1990; Lachance, Starmer, 1988; Barker et al., 1984). Кактусовые штаммы *O. haglerorum*, включая типовой штамм, показали 99–100% ДНК-ДНК реассоциации независимо от их географического происхождения. С другой стороны, вид *O. haglerorum* не был обнаружен среди 721 изолята из колонновидных кактусов или посещающих их дрозофил в североамериканской пустыне Мексики (Starmer et al., 1982). Тогда как виды *O. angusta* и *O. parapolyomorpha*, как уже отмечали, в основном ассоциированы с повреждениями различных деревьев, вызванными насекомыми (Phaff et al., 1956; Kurtzman, 2011b).

Основатель молекулярной филогении дрожжей К.П. Курцман много сделал для того, чтобы внедрить мультигенный анализ в филогенетическую классификацию дрожжей и описание новых видов. Тем не менее, многие авторы игнорируют этот подход. В данной статье мы собрали все накопленные в литературе данные таких авторов, обработали их в виде филогенетического древа (рис. 3) и показали малую информативность древа, построенного на единичных маркерах по сравнению с древом Курцмана (рис. 1). Данные, представленные Kurtzman (2011), сами по себе позволяют абсолютно достоверно говорить о количестве родов в гетерогенной кладе *Ogataea*. Сам автор почему-то не решился провести большую ревизию клады *Ogataea*, допустив только возможность существования одного нового рода.

Еще раз обратим внимание на то, что прогресс в изучении филогенетики дрожжей *Ogataea*, равно как и других родов, прежде всего, связан с использованием мультигенного анализа, а не единичных генов. Поучительным примером может быть мультигенный анализ хорошо обособленного политипного рода *Komagataella* (Naumov et al., 2013). Для идентификации штаммов различного географического и экологического происхождения одного и того же вида целесообразно использовать видоспецифичные молекулярные маркеры.

Авторы признательны Д.Г. Наумову за ценные советы в процессе оформления статьи, замечания анонимного рецензента также были учтены. Исследование было поддержано совместным российско-тайваньским грантом РФФИ (№ 18-54-52002 МНТ_а) и MOST (№ 107-2923-B-007-001-MY3).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Наумова Е.С., Дмитрук К.В., Кшановская Б.В., Сибирный А.А., Наумов Г.И. Молекулярная идентификация индустриально-важного штамма *Ogataea parapolyomorpha* // Микробиология. 2013. Т. 82. № 4. С. 442–447.
- Naumova E.S., Dmytruk K.V., Kshanovska B.V., Sibirny A.A., Naumov G.I. Molecular identification of industrially important strain *Ogataea parapolyomorpha* // Microbiology (Moscow). 2013. V. 82. № 4. P. 453–458.
- Barker J.S.F., East P.D., Phaff H.J., Miranda M. The ecology of the yeast flora in necrotic *Opuntia* cacti and of associated *Drosophila* in Australia // Microb. Ecol. 1984. V. 10. P. 379–399.

- Blandin G., Llorente B., Malpertuy A., Wincker P., Artigue-nave F., Dujon B. Genomic exploration of the hemiascomycetous yeasts: 13. *Pichia angusta* // FEBS Letters. 2000. V. 487. P. 76–81.
- Čadéz N., Dlačny D., Raspor P., Péter G. *Ogataea kolombanensis* sp. nov., *Ogataea histrianica* sp. nov. and *Ogataea deakii* sp. nov., three novel yeast species from plant sources // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2013. V. 63. P. 3115–3123.
- Eldarov M.A., Mardanov A.V., Beletsky A.V., Ravin N.V., Skryabin K.G. Complete sequence and analysis of the mitochondrial genome of the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* DL-1 // FEMS Yeast Res. 2011. V. 11. P. 464–472.
- Fuson G.B., Presley H.L., Phaff H.J. Deoxyribonucleic acid base sequence relatedness among members of the yeast genus *Kluyveromyces* // Int. J. Syst. Bacteriol. 1987. V. 37. P. 371–379.
- Gellissen G. *Hansenula polymorpha* – Biology and Application. Weinheim: Wiley-VCH, 2002. 347 p.
- Gleeson M.A., Waites M.J., Sudbery P.E. Development of techniques for genetic analysis in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* // Microbial Growth on C1 Compounds / Eds. Crawford R.L., Hanson R.S. Washington DC: Am. Soc. Microbiol., 1984. P. 228–235.
- Gleeson M.A., Ortori G.S., Sudbery P.E. Transformation of the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* // J. Gen. Microbiol. 1986. V. 132. P. 3459–3465.
- Gleeson M.A., Sudbery P.E. Genetic analysis in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* // Yeast. 1988. V. 4. P. 293–303.
- Glushakova A.M., Maximova I.A., Kachalkin A.V., Yurkov A.M. *Ogataea cecidiorum* sp. nov., a methanol-assimilating yeast isolated from galls on willow leaves // Antonie van Leeuwenhoek. 2010. V. 98. P. 93–101.
- Ji Z.-H., Bai F.-Y. *Ogataea ganoderma* sp. nov., a methanol-assimilating yeast species isolated from basidiocarps of *Ganoderma* sp. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2008. V. 58. P. 1502–1506.
- Koowadjanakul N., Jindamorakot S., Yongmanitchai W., Limtong S. *Ogataea phyllophila* sp. nov., *Candida chumphonensis* sp. nov. and *Candida matranensis* sp. nov., three methylotrophic yeast species from phylloplane in Thailand // Antonie van Leeuwenhoek. 2011. V. 100. P. 207–217.
- Kunze G., Hang A.H., Gellissen G. *Hansenula polymorpha* (*Pichia angusta*): biology and applications // Yeast Biotechnology: Diversity and Potential Biotechnological Applications in Yeasts / Eds. Satyanarayana T., Kunze G. Berlin: Springer, 2009. P. 47–62.
- Kurtzman C.P. *Pichia E.C. Hansen* emend. Kurtzman // The Yeasts, A Taxonomic Study / Eds. Kurtzman C.P., Fell J.W. Amsterdam: Elsevier, 1998. P. 273–352.
- Kurtzman C.P. *Ogataea* Y. Yamada, K. Maeda & Mikata (1994) // The Yeasts, A Taxonomic Study / Eds. Kurtzman C.P., Fell J.W., Boekhout T. Amsterdam: Elsevier, 2011a. P. 645–671.
- Kurtzman C.P. A new methanol assimilating yeast, *Ogataea parapolyomorpha*, the ascospore state of *Candida parapolyomorpha* // Antonie van Leeuwenhoek. 2011b. V. 100. P. 455–462.
- Kurtzman C.P., Robnett C.J. Systematics of methanol assimilating yeasts and neighboring taxa from multigene sequence analysis and the proposal of *Peterozyma* gen. nov., a new member of the *Saccharomycetales* // FEMS Yeast Res. 2010. V. 10. P. 353–361.
- Lachance M.-A. *Kluyveromyces* van der Walt (1971) // The Yeasts, A Taxonomic Study / Eds. Kurtzman C.P., Fell J.W., Boekhout T. Amsterdam: Elsevier, 2011. P. 471–482.
- Lachance M.-A., Starmer W.T., Phaff H.J. Identification of yeasts found on decaying cactus tissue // Can. J. Microbiol. 1988. V. 34. P. 1025–1036.
- Lachance M.-A., Klemens J.A., Bowles J.M., Janzen D.H. The yeasts community of sap fluxes of Costa Rican *Maclura* (*Chlorophora*) *tinctorial* and description of two new yeast species, *Candida galis* and *Candida ortonii* // FEMS Yeast Res. 2001. V. 1. P. 87–92.
- Lahichev K. Basic genetics of *Hansenula polymorpha* // *Hansenula polymorpha*: Biology and Applications / Ed. Gellissen G. Weinheim: Wiley-VCH, 2002. P. 8–20.
- Limtong S., Srisuk N., Yongmanitchai W., Kawasaki H., Yurimoto H., Nakase T., Kato N. Three new thermotolerant methylotrophic yeasts, *Candida krabiensis* sp. nov., *Candida sithepensis* sp. nov., and *Pichia siamensis* sp. nov., isolated in Thailand // Gen. Appl. Microbiol. 2004. V. 50. P. 119–127.
- Limtong S., Srisuk N., Yongmanitchai W., Yurimoto H., Nakase T. *Ogataea chonburiensis* sp. nov. and *Ogataea nakhonphanomensis* sp. nov., thermotolerant, methylotrophic yeast species isolated in Thailand, and transfer of *Pichia siamensis* and *Pichia thermomethanolica* to the genus *Ogataea* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2008. V. 58. P. 302–307.
- Limtong S., Kaewwichia, R., Groenewald M. *Ogataea kanchanaburiensis* sp. nov. and *Ogataea wangdongensis* sp. nov., two novel methylotrophic yeast species from phylloplane in Thailand // Antonie van Leeuwenhoek. 2013. V. 103. P. 551–558.
- Lu Y.-F., Wang M., Zheng J., Hui F.-L. *Ogataea neixiangensis* sp. nov. and *Ogataea paraovalis* f.a., sp. nov., two methanol-assimilating yeast species isolated from rotting wood // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2017. V. 67. P. 3038–3042.
- Marri L., Tossolini G.M., Satta G. Chromosome polymorphisms among strains of *Hansenula polymorpha* (syn. *Pichia angusta*) // Appl. Environ. Microbiol. 1993. V. 59. P. 939–941.
- Morais P.B., Teixeira L.C.R.S., Bowles J.M., Lachance M.A., Rosa C.A. *Ogataea falcaomoraisii* sp. nov., a sporogenous methylotrophic yeast from tree exudates // FEMS Yeast Res. 2004. V. 5. P. 81–85.
- Nagatsuka Y., Saito S., Sugiyama J. *Ogataea neopini* sp. nov. and *O. corticis* sp. nov., with the emendation of the ascomycete yeast genus *Ogataea*, and transfer of *Pichia zsolitii*, *P. dorogensis*, and *P. trehaloabstinens* to it // J. Gen. Appl. Microbiol. 2008. V. 54. P. 353–365.
- Nakase T., Ninomiya S., Imanishi Y., Nakagiri A., Kawasaki H., Limtong S. *Ogataea paradorogensis* sp. nov., a novel methylotrophic ascomycetous yeast species isolated from galleries of ambrosia beetles in Japan, with a close relation to *Pichia dorogensis* // J. Gen. Appl. Microbiol. 2008. V. 54. P. 377–383.
- Naumov G.I., Naumova E.S., Kondratieva V.I., Bulat S.A., Mironenko N.V., Mendonça-Hagler L.C., Hagler A.N. Genetic and molecular delineation of three sibling species in the *Hansenula polymorpha* complex // Syst. Appl. Microbiol. 1997. V. 20. P. 50–56.
- Naumov G.I., Naumova E.S., Tyurin O.V., Kozlov D.G. *Komagataella kurtzmanii* sp. nov., a new sibling species of

- Komagataella (Pichia) pastoris* in accordance with multi-gene sequence analysis // Antonie van Leeuwenhoek. 2013. V. 104. P. 339–347.
- Naumov G.I., Naumova E. S., Lee Ch.-Fu. *Ogataea haglerorum* sp. nov., a novel member of the species complex, *Ogataea (Hansenula) polymorpha* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2017. V. 67. P. 2465–2469.
- Péter G., Dlačny D., Tornai-Lehoczki J. *Candida floccosa* sp. nov., a novel methanol-assimilating yeast species // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2006. V. 56. P. 2015–2018.
- Péter G., Tornai-Lehoczki J., Dlačny D. *Ogataea allantopora* sp. nov., an ascomycetous yeast species from phylloplane // Antonie van Leeuwenhoek. 2007. V. 92. P. 443–448.
- Péter G., Tornai-Lehoczki J., Dlačny D. *Ogataea nitrataversa* sp. nov., a methylotrophic yeast species from temperate forest habitats // Antonie van Leeuwenhoek. 2008. V. 94. P. 217–222.
- Péter G., Tornai-Lehoczki J., Dlačny D. *Ogataea populialbae* sp. nov., a yeast species from white poplar // FEMS Yeast Res. 2009. V. 9. P. 936–941.
- Péter G., Dlačny D., Tornai-Lehoczki J., Gouliamova D., Kurtzman C.P. *Ogataea saltuana* sp. nov., a novel methanol-assimilating yeast species // Antonie van Leeuwenhoek. 2011. V. 100. P. 375–383.
- Phaff H.J. Biology of yeasts other than *Saccharomyces* // Biology of Industrial Microorganisms / Eds. Demain A.L., Solomon N.A. London: The Benjamin/Cumming, 1985. P. 537–562.
- Phaff H.J., Miller M.W., Shifrine M. The taxonomy of yeasts isolated from *Drosophila* in the Yosemite region of California // Antonie van Leeuwenhoek. 1956. V. 22. P. 145–161.
- Ramezani-Rad M., Hollenberg C.P., Lauber J., Ramezani-Rad M., Hollenberg C.P., Lauber J., Wedler H., Griess E., Wagner C., Albermann K., Hani J., Piontek M., Dahlems U., Gellissen G. The *Hansenula polymorpha* (strain CBS 4732) genome sequencing and analysis // FEMS Yeast Res. 2003. V. 4. P. 207–215.
- Santos A.R., Faria E.S., Lachance M.A., Rosa C.A. *Ogataea mangiferae* sp. nov., a methylotrophic yeast isolated from mango leaves // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2015. V. 65. P. 1855–1859.
- Starmer W.T., Phaff H.J., Miranda M., Miller M.W., Heed W.B. The yeast flora associated with the decaying stems of columnar cacti and *Drosophila* in North America // Evol. Biol. 1982. V. 14. P. 269–295.
- Starmer W.T., Ganter P.E., Phaff H.J. Quantum and continuous evolution of DNA base composition in the yeast genus *Pichia* // Evolution. 1986. V. 40. P. 1263–1274.
- Starmer W.T., Lachance M.-A., Phaff H.J., Heed W.B. The biogeography of yeasts associated with decaying cactus tissue in North America, the Caribbean, and Northern Venezuela // Evol. Biol. 1990. V. 24. P. 253–296.
- Suh S.-O., Zhou J. Yeasts associated with the curculionid beetle *Xyloterinus politus*: *Candida xyloterini* sp. nov., *Candida palmyrensis* sp. nov. and three common ambrosia yeasts // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2010a. V. 60. P. 1702–1708.
- Suh S.-O., Zhou J.J. Methylotrophic yeasts near *Ogataea (Hansenula) polymorpha*: a proposal of *Ogataea angusta* comb. nov. and *Candida parapolymorpha* sp. nov. // FEMS Yeast Res. 2010b. V. 10. P. 631–638.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipowski A., Kumar S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0 // Mol. Biol. Evol. 2013. V. 30. P. 2725–2729.
- Yamada Y., Maeda K., Mikata K. The phylogenetic relationships of the hat-shaped ascospore-forming, nitrate-assimilating *Pichia* species, formerly classified in the genus *Hansenula* Sydow et Sydow, based on the partial sequences of 18S and 26S ribosomal RNAs (Saccharomycetaceae): the proposals of three new genera, *Ogataea*, *Kuraishia*, and *Nakazawaea* // Biosci. Biotechnol. Biochem. 1994. V. 58. P. 1245–1257.
- Vu D., Groenewald M., Szöke S., Cardinali G., Eberhardt U., Stielow B., de Vries M., Verkleij G.J., Crous P.W., Boekhout T., Robert V. DNA barcoding analysis of more than 9000 yeast isolates contributes to quantitative thresholds for yeast species and genera delimitation // Stud. Mycol. 2016. V. 85. P. 91–105.

Phylogenetics, Biogeography and Ecology of Methylotrophic Yeasts of the Heterogeneous Genus *Ogataea*: Achievements and Prospects

G. I. Naumov¹*, M. Yu. Shalamitskiy², E. S. Naumova¹, and Ch.-F. Lee³

¹State Research Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, NRC “Kurchatov Institute”, Moscow, Russia

²Magarach All-Russian National Institute for Wine and Winemaking, Russian Academy of Sciences, Yalta, Russia

³Department of Applied Science, National Tsing Hua University of Education, Hsinchu 30014, Taiwan

*e-mail: gnaumov@yahoo.com

Received December 27, 2017

Abstract—Analysis of the literature and GenBank data showed that the genus *Ogataea* is heterogeneous and includes at least five non-described genera. Comprehensive phylogenetic analysis of the present genus *Ogataea* may be conducted only based on multigene analysis of all the known species. Possibilities of molecular species identification in biogeographical and ecological studies of yeasts are discussed. The paper is dedicated to the memory of Cletus Kurtzman.

Keywords: the *Ogataea polymorpha* complex, methylotrophic yeasts, molecular phylogeny, multigene analysis, new genera, genus *Ogataea*

АЭРОБНАЯ БИОДЕГРАДАЦИЯ КОМПОНЕНТОВ СЫРОЙ
НЕФТИ АЦИДОФИЛЬНЫМИ МИКОБАКТЕРИЯМИ© 2018 г. А. Е. Иванова^а, *, И. А. Борзенков^а^аИнститут микробиологии им. С.Н. Виноградского, Федеральный исследовательский центр
“Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, Россия

*e-mail: a.e.ivanova@mail.ru

Поступила в редакцию 21.02.2018 г.

Исследована биодegradация компонентов сырой нефти штаммом AG_{S10} ацидофильных бактерий рода *Mycobacterium* в условиях экстремально высокой кислотности, pH 2.5. Показано, что в составе разных нефтей одни и те же углеводороды разрушаются бактериями в разной степени. При этом процесс биодegradации имеет одинаковую направленность: в окисленной нефти доля нормальных алканов сокращается, относительная доля разветвленных алканов – возрастает. С другой стороны, интенсивность процесса перераспределения метановых углеводородов в деградированной нефти существенно различается для разных нефтей, несмотря на отсутствие строгой зависимости от класса конкретной нефти. За 28 сут инкубации бактерий при температуре 30°C и pH 2.5 степень деструкции *n*-алканов и *изо*-алканов легкой маловязкой нефти Нижневартовского месторождения достигла 99 и 44% соответственно, средней по плотности нефти Московского нефтеперерабатывающего завода (МНПЗ) – 58 и 32% соответственно, тяжелых высоковязких нефтей Черемуховского и Усинского месторождений – 80 и 16%, 99 и 69% соответственно. Кроме того, с увеличением продолжительности культивирования штамм AG_{S10} полностью использовал алканы, а также значительную часть нафтеновой составляющей алифатической фракции нефти. Отличительной чертой исследуемых бактерий является их способность окислять широкий спектр метановых углеводородов, в том числе высокомолекулярные C₁₇–C₃₀ *n*-алканы, в разных по составу и свойствам нефтях. Дальнейшее изучение процесса биодеструкции штаммом AG_{S10} высокопарафинистых нефтей и вязких нефтей с повышенным содержанием парафина представляет интерес не только с научной точки зрения, но и для решения технических проблем, возникающих при их добыче и транспортировке, в связи с отложениями парафина.

Ключевые слова: ацидофильные микобактерии, биодegradация углеводородов, сырая нефть, тяжелая нефть, нормальные и *изо*-алканы, нафтены, газожидкостная хроматография (ГЖХ)

DOI: 10.1134/S0026365618040109

Среди множества известных углеводородокисляющих бактерий, у которых секвенирована нуклеотидная последовательность гена 16S рРНК, насчитывается всего несколько ацидофилов. Большинство из них выделено из кислых почв природных и природно-техногенных объектов (Gemmel, Knowles, 2000; Dore et al., 2003; Hamamura et al., 2005; Uyttebroek et al., 2007; Arulazhagan et al., 2017), один представитель – из серных карт газоперерабатывающего комплекса (Иванова и соавт., 2016).

В противоположность физиологической группе углеводородокисляющих бактерий в целом, ее ацидофильные представители не отличаются большим таксономическим разнообразием. В основном это грамотрицательные бактерии филума *Proteobacteria* (4 штамма), принадлежащие *Alphaproteobacteria* родов *Acidisphaera* (Hamamura et al., 2005) и *Acidocella* (Gemmel, Knowles, 2000;

Dore et al., 2003). Один из этих штаммов окислял нафталин (Dore et al., 2003), три других – *n*-додекан и *n*-гексадекан. Недавно появилось сообщение об ацидофильном штамме *Stenotrophomonas maltophilila* (филум *Proteobacteria*, класс *Gammaproteobacteria*), способном к деструкции ряда низкомолекулярных (нафталин, фенантрен, антрацен, флуорен) и высокомолекулярных (пирен, бензпирен и бензофлуорантин) полициклических ароматических углеводородов (Arulazhagan et al., 2017). Оставшиеся два представителя группы являются грамположительными организмами (филум *Actinobacteria*, род *Mycobacterium*) и относятся к филогенетической ветви медленно растущих микобактерий. Бактерия, близкая по последовательности гена 16S рРНК к *M. montefiorensis*, может утилизировать фенантрен и пирен (Uyttebroek et al., 2007). Другой ацидофильный представитель рода *Mycobacterium*, близкородственный

M. florentinum (уровень сходства по гену 16S рРНК 98%), отличается широкими метаболическими возможностями в отношении индивидуальных углеводов разного химического строения (Иванова и соавт., 2016, 2017).

Нефть, как природная горючая смесь углеводов различного строения и молекулярной массы и других соединений неуглеводородной природы, отличается разнообразием их состава и свойств. В связи с тем, что нефть является важнейшим источником энергии и, с другой стороны, приоритетным загрязнителем окружающей среды, биодеструкция нефти привлекает особое внимание. Долгое время считали, что процесс биодегradации нефти представляет собой последовательное ступенчатое окисление микроорганизмами ее компонентов, начиная с более лабильных (например, *n*-алканы со средней длиной углеродной цепи) к более труднодоступным. Согласно современным представлениям (Head et al., 2014), в ходе биодеструкции нефти может иметь место одновременное превращение углеводов разного химического строения и молекулярной массы. Однако их трансформация происходит с разной скоростью, что, в конечном итоге, и дает картину, характерную для биодegradированной нефти.

Микроорганизмы осуществляют биодegradацию нефти в аэробных и анаэробных условиях, и этот процесс играет важную роль в образовании тяжелых нефтей (Head et al., 2003), отличающихся от традиционных нефтей более высокой плотностью и вязкостью, повышенной концентрацией серы и асфальтово-смолистых веществ, пониженным содержанием светлых фракций (Leon, Kumar, 2005).

Процесс биодegradации нефти зависит от множества факторов, в том числе, от компонентного состава и свойств самой нефти, физико-химических параметров среды, в которой осуществляется ее преобразование, от биологических особенностей микроорганизмов-деструкторов. Как правило, оптимальными для этого процесса являются умеренные значения температуры, рН и солёности (Leahy, Colwell, 1990; Wenger et al., 2002).

Большинство исследований по проблеме биодegradации нефти проведено с участием нейтрофильных бактерий-деструкторов, активно функционирующих в диапазоне значений рН, характеризующих слабокислые и слабощелочные условия. Показано, что для микроорганизмов нефти с малой и средней плотностью являются лучшими субстратами, чем тяжелые (Sugiura et al., 1997; Aoshima et al., 2006). Величина вязкости определяет доступность компонентов нефти для микроорганизмов, поэтому маловязкие нефти подвергаются биодеструкции значительно легче, чем тяжелые высоковязкие (Lal, Khanna, 1996;

Гэрэлмаа, 2010). Вопрос о возможности биодegradации сырой нефти в условиях экстремально низких значений рН среды остается открытым.

В этой связи представляют интерес исследования микробного разнообразия и функциональной активности микробных сообществ кислых сульфатных почв в местах естественных нефтепроявлений на поверхности земли, ассоциированных с Радужными Источниками (Йеллоустонский национальный парк, США), и природными углеводородными сипами Дорсет (побережье пролива Ла-Манш, Великобритания) (Hamamura et al., 2005; Roling et al., 2006). Анализ нефти, отобранной из сипа Дорсет, показал, что она деградирована в высокой степени: нефть тяжелая, в ней отсутствуют не только алифатические углеводороды, *n*-алканы и изопреноиды, пристан и фитан, но и остаточное содержание полициклических ароматических углеводородов и дибензотиофенов составляет менее 1% по сравнению с исходной небиодegradированной нефтью побережья Дорсет (Roling et al., 2006). Напротив, нефть из кислых почв Йеллоустонского национального парка легкая, парафинистая, малосернистая и лишена низкомолекулярных углеводородов (до C₁₅H₃₂), не имеет признаков биодegradации, или они слабо выражены (Hamamura et al., 2005).

Несмотря на эти отличия и географическую удаленность исследуемых природных объектов, в библиотеках клонов из обоих сипов численно доминировали последовательности *Alphaproteobacteria*, включающие гены аэробных ацидофильных гетеротрофных бактерий родов *Acidisphaera*, *Acidiphilium* и *Acidocella*. Кроме того, из почвы Йеллоустонского сипа была выделена бактерия, *Acidisphaera* штамм С197, окисляющая *n*-алканы при рН 4.5 (Hamamura et al., 2005). Авторы предположили вовлеченность подобных бактерий в состав ацидофильных микробных сообществ в метаболизм углеводородов в кислой сульфатной почве Йеллоустонского сипа. Напротив, анализ ацидофильных нефтеокисляющих накопительных культур из сипа Дорсет, нефть которого сильно биодegradирована, свидетельствовал в пользу роли эукариот в окислении углеводородов: в накопительных культурах были выявлены микроскопические грибы при полном отсутствии бактерий (Roling et al., 2006). Нельзя также исключать возможность, что ацидофильные микробные сообщества природных углеводородных сипов функционально не связаны с деструкцией нефти, т.е. существуют независимо от этого процесса.

Таким образом, литературные данные не дают однозначного ответа на вопрос о возможности бактериального окисления нефти в природных экстремально кислых местообитаниях. Кроме того, отсутствуют экспериментальные доказательства биодegradации нефти при рН ниже 3.0, а

ацидофильные бактерии-деструкторы нефти не известны.

В последние годы исследования метаболизма и геномики медленно растущих ацидофильных микобактерий из серных карт выявили высокий катаболический потенциал этих микроорганизмов в отношении углеводов (Иванова и соавт., 2013, 2014, 2016, 2017) и позволили считать их перспективными кандидатами в разрушении компонентов нефти.

Целью настоящей работы было изучение особенностей биodeградации компонентов сырой нефти аэробными углеводородокисляющими микобактериями штамма AG_{S10} в условиях экстремальной кислотности.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Бактериальный штамм, состав сред, условия культивирования и учет численности бактерий. В работе использовали бактериальный штамм AG_{S10} ацидофильных медленно растущих микобактерий, выделенный ранее из серной карты Астраханского газоперерабатывающего комплекса, для которого показана способность к росту на широком спектре индивидуальных углеводов (Иванова и соавт., 2016) и некоторых сложных углеводородсодержащих смесях (газовый конденсат, вазелиновое масло, технический керосин).

Штамм AG_{S10} поддерживали в жидкой минеральной среде (Иванова и соавт., 2013) с C₁₄–C₁₇ *n*-алканами или скваланом (2,6,10,15,19,23-гексаметилтетракозан), которые вносили в количестве 0.5–1.0 об. %. Бактерии культивировали в статических условиях при температуре 30°C и начальном рН 2.5. В экспериментах по биodeградации компонентов нефти бактерии выращивали в течение 28–45 сут в аналогичных условиях на среде того же состава с той разницей, что единственным источником углерода служила сырая нефть (1.0 об. %). Соотношение объемов питательной среды и газовой фазы исключало лимитацию по кислороду. Для хроматографического анализа использовали второй последовательный пересев на соответствующий углеводородный субстрат.

Использование нефти в качестве субстрата и плотное “прилипание” к ней бактерий с высокой гидрофобностью клеточных стенок (Иванова и соавт., 2016) затрудняли учет численности микроорганизмов. Получение корректных результатов было возможно только на начальном этапе эксперимента (сразу после внесения в среду инокулята и непосредственно перед добавлением нефти) и на конечной стадии разрушения нефти при глубокой деградации последней, когда клетки из углеводородной фазы переходили в среду и частично оседали на дне культуральных флаконов. Для

определения численности микобактерий освобожденные от остаточной нефти (обработка гексаном и центрифугирование) разбавленные клеточные суспензии фильтровали через черные поликарбонатные фильтры (“Millipore”, США) с диаметром пор 0.2 мкм. Осажденные на фильтрах клетки фиксировали 96% этанолом и окрашивали флуоресцентным красителем 4,6-диамино-2-фенилиндолом (DAPI). Препараты просматривали под эпифлуоресцентным микроскопом Olympus BX 41 (Япония) с программным обеспечением Image Score Color M. Подсчет клеток осуществляли с экрана монитора в 20 полях зрения.

Характеристика образцов сырой нефти. В экспериментах по биodeградации в качестве источника углерода для бактерий были использованы образцы сырой нефти, различающиеся по своему составу и свойствам. Легкая нефть Нижневартовского месторождения отличалась наименьшими значениями плотности и динамической вязкости, а тяжелая нефть Усинского месторождения – наибольшими величинами тех же параметров. Нефти МНПЗ и Черемуховского месторождения по этим характеристикам занимали промежуточное положение. Эти и некоторые другие характеристики исследуемых нефтей (средние значения параметров) приведены ниже (табл. 1).

Аналитические методы исследования. Поверхностное натяжение измеряли на границе раздела фаз (исследуемая культуральная жидкость с клетками бактерий–воздух), а межфазное натяжение – на границе исследуемой жидкости с *n*-гексадеканом методом отрыва кольца на полуавтоматическом тензиометре Surface Tensiomat 21 (“Cole-Parmer”, США), как описано ранее (Иванова и соавт., 2016).

Групповой углеводородный состав нефти определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на приборе Waters Corporation 2414/1525 (“Waters Corporation”, США) с рефрактометрическим детектором. Разделение проводили на аналитической колонке с аминофазой. Элюентом служил *n*-гексан. Скорость потока элюента составляла 2 мл/мин.

Процесс биodeградации нефти оценивали по изменению содержания *n*-алканов и *изо*-алканов в алифатической фракции деградированного субстрата по сравнению с контролем (Борзенков и соавт., 2006). Контролем служила стерильная среда с нефтью, которую инкубировали в тех же условиях. После инкубации экстрагированную гексаном парафиново-нафтеновую фракцию нефти анализировали методом ГЖХ на хроматографе Кристалл 5000.1 (ЗАО “Хроматэк”, РФ) с пламенно-ионизационным детектором и капиллярной колонкой Zebtron™ ZB-1XT (30 м × 0.53 мм × 2.65 мкм) в режиме: начальная температура колонки 100°C, скорость

Таблица 1. Физико-химические характеристики исследованных нефтей

Показатель	Нефть			
	Нижневартовская	МНПЗ	Черемуховская	Усинская
Плотность при 20°C, г/см ³	0.835	0.863	0.931	0.962
Динамическая вязкость при 20°C, мПа·с	6.7	14.0	248	860
Содержание, % мас.:				
твердые парафины	2.1	Н.д.*	3.5	0.4
сера	1.0	2.5	4.2	2.0
смолы силикагелевые и асфальтены	5.0	Н.д.	25.0	26.6
Выход фракций, %:				
до 200°C	27	Н.д.	11	5
до 300°C	59	Н.д.	32	17

* “Н.д.” – нет данных.

нагрева – 5°C/мин, конечная – 320°C (10 мин). Газом-носителем служил гелий.

Остаточное содержание (%) нормальных и *изо*-алканов нефти рассчитывали на основе хроматографических данных по методу внутренней нормализации. В качестве внутреннего стандарта при обсчете серии хроматограмм алифатической фракции сырой нефти использовали суммарную площадь пиков пристана и фитана (*изо*-C₁₉ + *изо*-C₂₀). Обсчет считался корректным при сохранении в ходе экспериментов соотношения *изо*-C₁₉/*изо*-C₂₀, характерного для конкретного типа нефти. При изменении указанного соотношения в ходе эксперимента более чем на 5%, в качестве внутреннего стандарта использовали величину площади пика фитана.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

С целью выявления деструкции углеводородов нефти штаммом AG_{S10} в условиях экстремальной кислотности, бактерии выращивали в минеральной среде с начальным рН 2.5 и сырой нефтью в качестве единственного источника углерода. К концу экспериментов по биодеструкции в контрольных пробах среда оставалась прозрачной, а нефть, частично осевшая на стенках культуральных флаконов, оставалась на поверхности среды в виде пленки и визуально не изменилась. В то же время в пробах с бактериями среда становилась мутной, нефть сильно эмульгировалась и легко смывалась со стенок флаконов при слабом встряхивании. О степени деструкции судили по изменению профиля нормальных и *изо*преноидных алканов растворимой в гексане части нефти, т.к.

эти углеводороды наиболее “лабильны” и утилизируются бактериями в первую очередь.

Нижневартовская нефть. Нефть Нижневартовского месторождения относится к метаново-нафтеновому типу, легкая по плотности, маловязкая, малосмолистая, парафинистая, с высоким выходом легких фракций (табл. 1).

Из рис. 1а видно, что в контрольном образце нефти Нижневартовского месторождения представлен полный спектр *n*-алканов, от C₉ до C₃₂, с максимумом в области C₉–C₁₄ и равномерным снижением концентраций высокомолекулярных углеводородов. На хроматограмме также присутствуют пики *изо*-алканов, причем пики нормальных алканов заметно преобладают. По алканам *изо*преноидного строения концентрационный максимум приходится на *изо*-C₁₉ (пристан) и *изо*-C₂₀ (фитан). Отношение концентрации *изо*-C₁₉/*изо*-C₂₀ составляет 0.91, а отношение *изо*-C₁₉ + *изо*-C₂₀/C₁₇ + C₁₈ – 0.90 (табл. 2).

Рост штамма AG_{S10} на нефти Нижневартовского месторождения в течение 28 сут при температуре 30°C и рН 2.5 сопровождался увеличением численности клеток бактерий с 2 × 10⁵ до 6 × 10⁹ кл./мл и образованием биосурфактантов, о чем свидетельствовало снижение поверхностного натяжения против воздуха с 51.2 до 32.3 мН/м и межфазного натяжения на границе культуральной жидкости с *n*-гексадеканом с 39.1 до 0.8 мН/м. В составе биодegradированной нефти наблюдается практически полное исчезновение *n*-алканов (остаточное содержание составляет 1%), а деструкция *изо*-алканов достигает 44% (рис. 1б, табл. 2). На хроматограмме виден выраженный нафтеновый

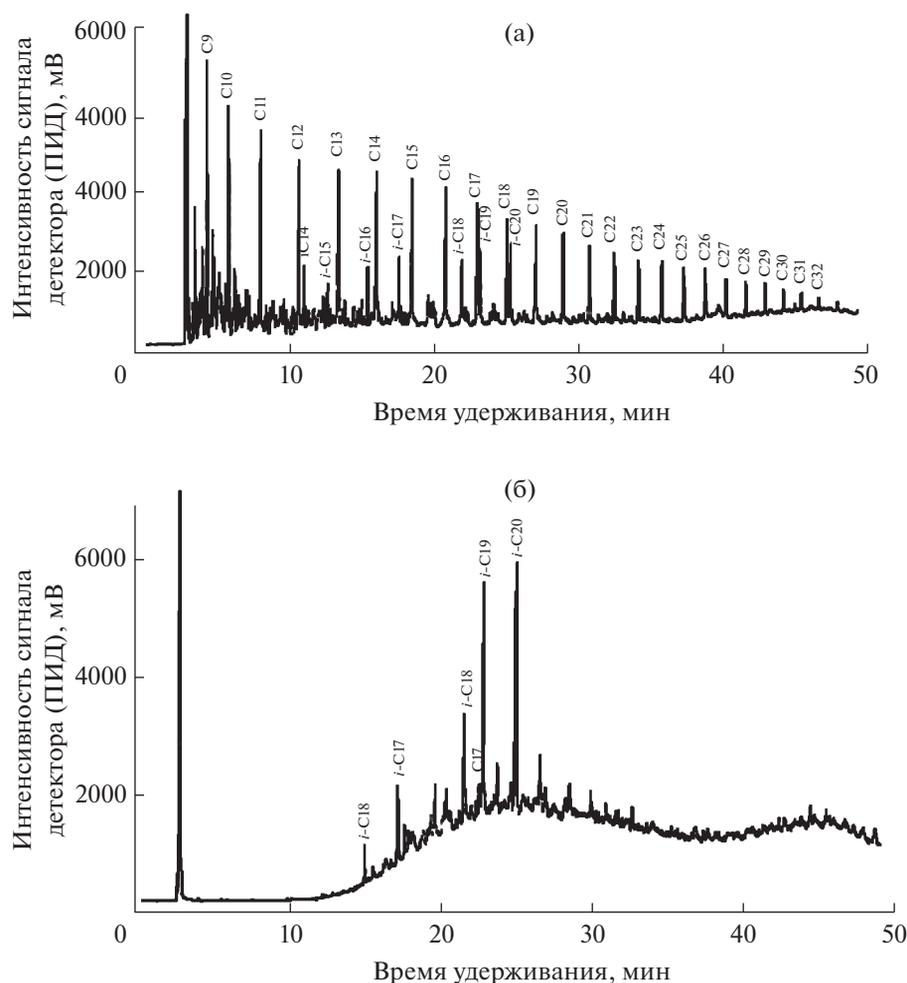


Рис. 1. Хроматограмма алифатической фракции нефти Нижневартовского месторождения до (а) и после биодegradации (б) штаммом AG_{S10} в течение 28 сут инкубации при температуре 30°C и рН 2.5.

“горб” неразделенных углеводородов, прослеживается тенденция увеличения относительного содержания фитана и пристана. Отношение концентрации *изо*-C₁₉/*изо*-C₂₀ остается практически неизменным – 0.93 против 0.91 в контроле, тогда как отношение *изо*-C₁₉ + *изо*-C₂₀/C₁₇ + C₁₈ резко возрастает – до 16.10 против 0.90 в контроле (табл. 2), что указывает на высокую степень биодegradированности нефти.

Анализ группового углеводородного состава нефти Нижневартовского месторождения до и после биодegradации показал, что в биодegradированной нефти увеличивается относительное содержание аренов, смол и асфальтенов на фоне значительного (40%) снижения концентрации парафино-нафтеновых углеводородов, что не противоречит результатам хроматографического анализа настоящего исследования.

Нефть МНПЗ. По своему составу и свойствам нефть МНПЗ близка к российской марке экспортной нефтяной смеси Urals. Она представляет

собой смесь из тяжелой высокосернистой нефти, добываемой в Башкортостане, Татарстане и Самарской области, с легкой нефтью Ханты-Мансийского и Ямало-Ненецкого автономных округов (табл. 1).

Вид кривых распределения насыщенных углеводородов контрольных образцов нефти МНПЗ (рис. 2а) и Нижневартовского месторождения (рис. 1а) однотипен, пики нормальных алканов преобладают над изопреноидными. В нефти МНПЗ отношение концентрации пристана к фитану составляет 0.97, а отношение *изо*-C₁₉ + *изо*-C₂₀/C₁₇ + C₁₈ – 0.70 (табл. 2).

В нефти МНПЗ, дegradированной штаммом AG_{S10} в течение 28 сут, степень деструкции нормальных и *изо*-алканов составила 58 и 32% соответственно, высота циклоалканового фона на хроматограмме несколько увеличилась (рис. 2б). В характере распределения *n*-алканов кардинальных изменений не наблюдалось, хотя более легкие представители ряда, C₉–C₁₁, были полностью элиминированы, а концентрационный максимум

Таблица 2. Изменение некоторых показателей нефти и содержания алканов под воздействием штамма AG_{S10} за 28 сут инкубации при температуре 30°C и pH 2.5

Проба	Показатель нефти		Деструкция (%) суммарного содержания:		
	<i>изо</i> -C ₁₉ / <i>изо</i> -C ₂₀	<i>изо</i> -C ₁₉ + <i>изо</i> -C ₂₀ /C ₁₇ + C ₁₈	<i>n</i> -алканов	<i>изо</i> -алканов	∑ <i>n</i> - и <i>изо</i> -алканов
Нефть Нижневартовского месторождения:					
контроль	0.91	0.90	0	0	0
культура AG _{S10}	0.93	16.10	99	44	89.1
Нефть МНПЗ:					
контроль	0.97	0.70	0	0	0
культура AG _{S10}	0.96	1.03	58	32	68.4
Нефть Черемуховского месторождения:					
контроль	0.57	0.66	0	0	0
культура AG _{S10}	0.57	2.41	80	16	53.8
Нефть Усинского месторождения:					
контроль	1.17	0.36	0	0	0
культура AG _{S10}	0.75	Н.д.*	99	69	95.0

Примечание. Величину отношения *изо*-C₁₉ + *изо*-C₂₀/C₁₇ + C₁₈ не определяли вследствие полного потребления *n*-алканов штаммом AG_{S10}.

* "Н.д." – нет данных.

переместился в область C₁₅–C₁₇-соединений. Отношение концентрации *изо*-C₁₉/*изо*-C₂₀ (0.96) по сравнению с контролем (0.97) сохранялось на прежнем уровне, а отношение *изо*-C₁₉ + *изо*-C₂₀/C₁₇ + C₁₈ повысилось до 1.03 (табл. 2), но не столь значительно, как в деградированной нефти Нижневартовского месторождения.

Увеличение времени инкубации нефти МНПЗ со штаммом AG_{S10} до 45 сут сопровождалось кардинальными изменениями в составе алифатической фракции нефти: полной деструкции подверглись не только *n*-алканы, но и изопренаны, в том числе фитан и пристан (рис. 2в). Практически исчез нафтеновый фон в режиме нагрева до 270°C. При этом резко возросла доля нафтенов, выходящих при более высокой температуре. Наблюдаемая картина свидетельствует о том, что с увеличением продолжительности культивирования штамм AG_{S10} частично окислял и нафтеновую составляющую алифатической фракции нефти МНПЗ.

Глубокая биodeградация нефти МНПЗ сопровождалась активным ростом бактерий: численность клеток возрастала с 5×10^5 до 6×10^7 кл./мл к концу 28 сут инкубации и составляла 8×10^9 кл./мл на 45-е сут.

Нефть Черемуховского месторождения. Исползованная в работе нефть Черемуховского нефтяного месторождения Татарстана (бобринский горизонт) относится к типу тяжелых и высоковязких (табл. 1). По химическому составу нефть парафинистая, высокосернистая, с высоким содержанием смол и асфальтенов и низким содержанием фракций, имеющих температуру кипения до 200°C (табл. 1).

Из рис. 3а видно, что кривая распределения насыщенных углеводородов контрольного образца нефти Черемуховского месторождения характеризуется наличием двух небольших максимумов. Концентрация алканов нормального строения возрастает от *n*-C₁₁ до *n*-C₁₅ (первый максимум), затем количество C₁₆–C₁₈ *n*-алканов немного снижается и далее, на *n*-C₁₉–*n*-C₂₀, при-

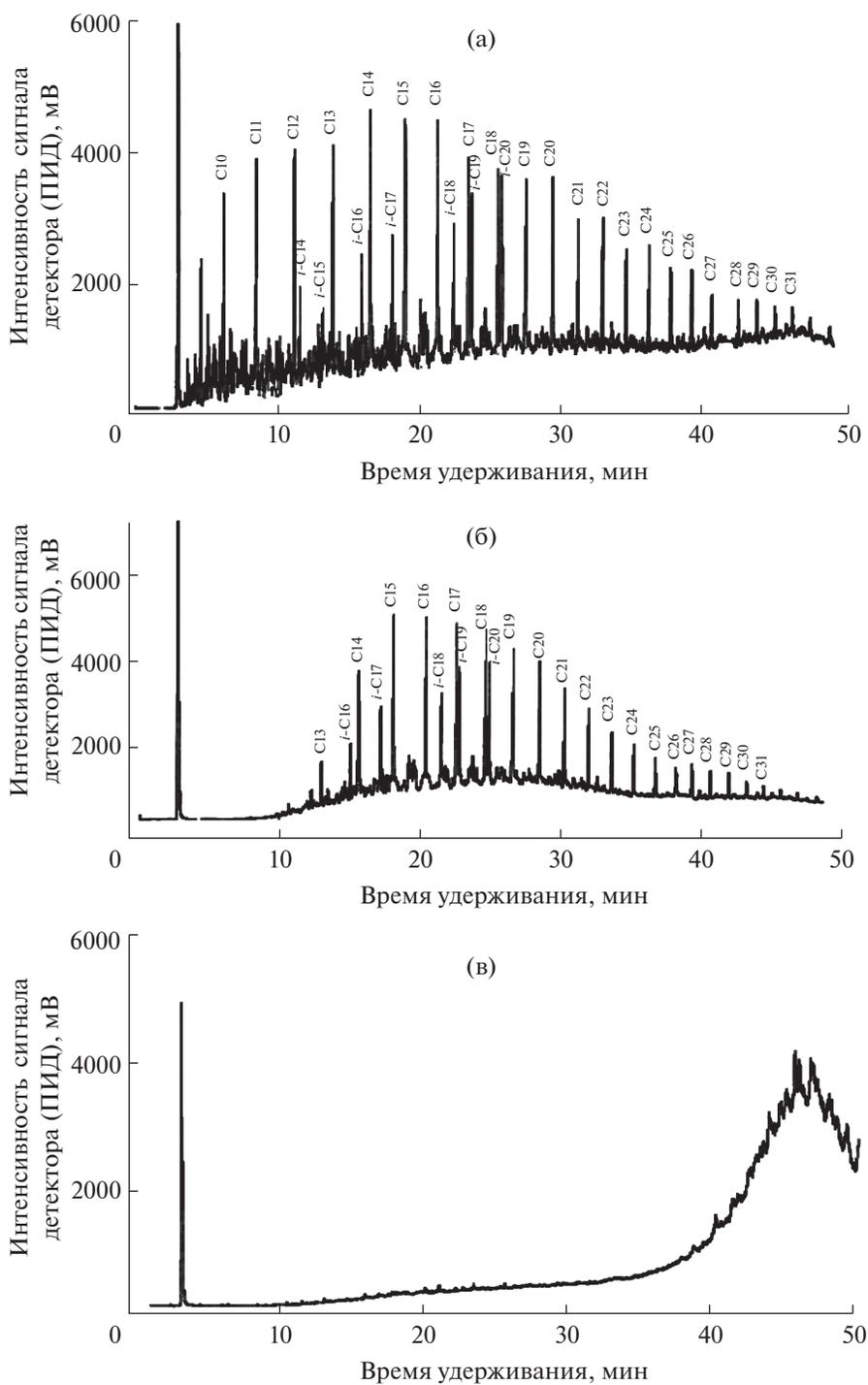


Рис. 2. Хроматограмма алифатической фракции нефти МНПЗ до (а) и после биодegradации (б, в) штаммом AG_{S10}. Условия инкубации: температура 30°C и рН 2.5 в течение 28 сут (а) и 45 сут (в).

ходится второй максимум, после которого происходит плавное снижение концентраций высокомолекулярных *n*-алканов. Отношение концентрации *изо*-C₁₉/*изо*-C₂₀ составляет 0.57, а отношение *изо*-C₁₉ + *изо*-C₂₀/C₁₇ + C₁₈ – 0.66 (табл. 2).

В деградированной нефти нафтеновый фон несколько увеличился (рис. 3б). В процессе биодegradации нефти Черемуховского месторождения наблюдались значительные изменения в составе *n*-алкановой фракции: C₁₁–C₁₃ *n*-алканы полностью потреблялись, содержание C₁₄–C₃₀

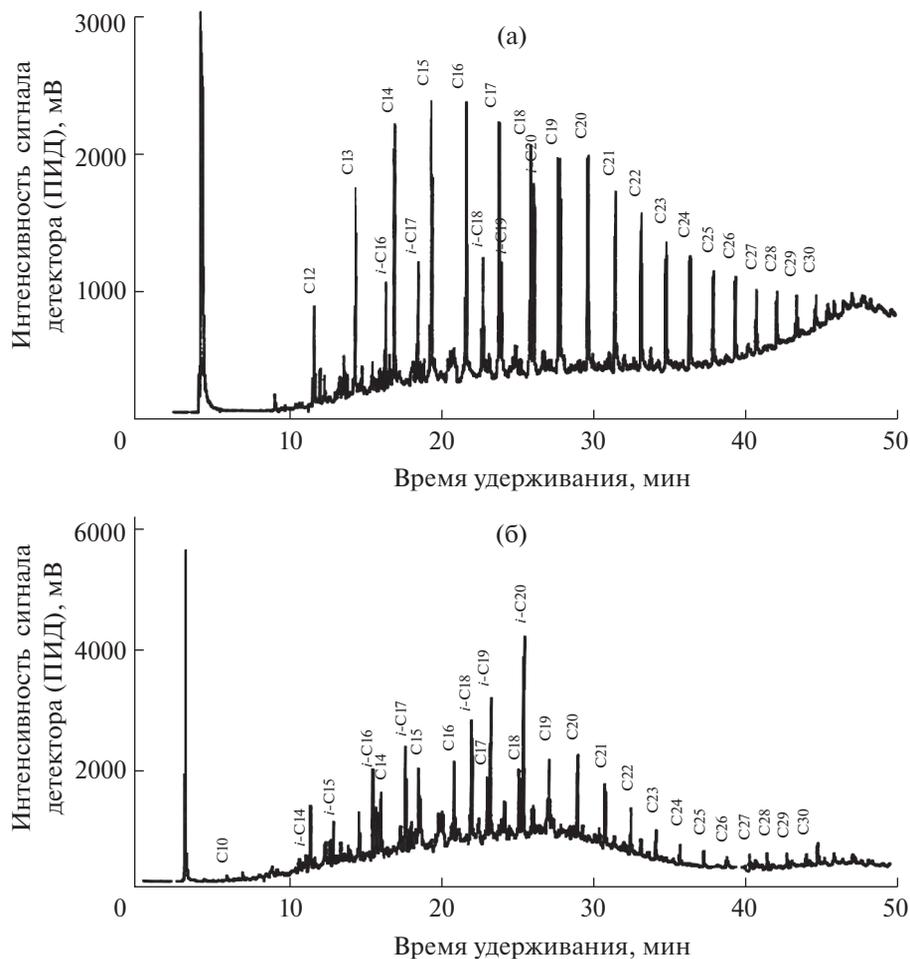


Рис. 3. Хроматограмма алифатической фракции нефти Черемуховского месторождения до (а) и после биодegradации (б) штаммом AG_{S10} в течение 28 сут инкубации при температуре 30°C и pH 2.5.

n-алканов значительно снижалось (общее потребление составляло 80%). Степень деструкции *изо*-алканов в целом составила 16%, при этом в общем пуле изопреноидов заметно увеличилась доля фитана и пристана (рис. 36). Отношение концентрации *изо*- C_{19} /*изо*- C_{20} (0.57) не изменилось, а отношение *изо*- C_{19} + *изо*- C_{20} / C_{17} + C_{18} выросло до 2.41 (табл. 2).

Сравнение особенностей разрушения различных нефтей разными микроорганизмами затруднено из-за сложности состава нефти и неопределенности влияния на этот процесс компонентов нефти. Однако анализ деструкции конкретной нефти разными бактериями вполне корректен и позволяет выявить предпочтительное использование тех или иных углеводородов. В работе Назиной и соавт. (2017) приведены данные по изменению содержания алканов в нефти из скважины 5452 Черемуховского нефтяного месторождения, деградированной штаммом *Gordonia amicalis* 6-1 (нейтрофильная бактерия) в течение 20 сут

при 23°C в присутствии 10 г/л нефти, по отношению к контролю. Биодegradации подвергались C_{11} – C_{13} (степень деструкции составила 74.5–82.3%), C_{15} – C_{18} (деструкция 55.0–59.1%), C_{19} – C_{21} (деструкция 10.0–27.5%) и C_{23} (деструкция 11.1%) *n*-алканы нефти; *изо*-алканы проявляли устойчивость к микробному воздействию. Сопоставив эти данные с результатами настоящего исследования можно сделать вывод, что ацидофильные микробактерии штамма AG_{S10} являются более эффективными деструкторами тяжелой высоковязкой нефти Черемуховского нефтяного месторождения.

Как показали микроскопические исследования, рост штамма AG_{S10} на тяжелой Черемуховской нефти сопровождался значительным увеличением численности клеток исследуемых бактерий, однако большая их часть оставалась в нефтяной фазе, что не позволило количественно оценить прирост клеток.

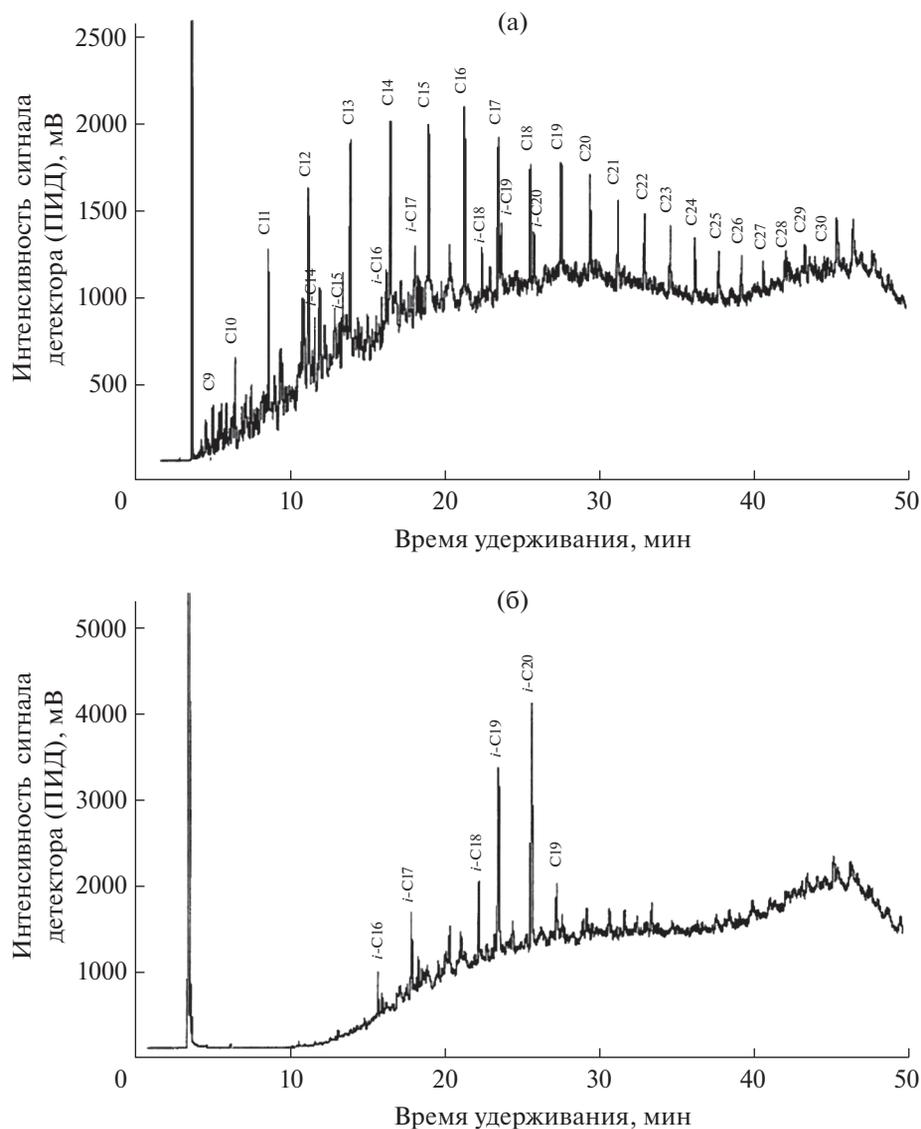


Рис. 4. Хроматограмма алифатической фракции нефти Усинского месторождения до (а) и после биодegradации (б) штаммом AG_{S10} в течение 28 сут инкубации при температуре $30^{\circ}C$ и pH 2.5.

Нефть Усинского месторождения. Используемая в работе нефть Усинского месторождения (пермо-карбоновая залежь) принадлежит к классу тяжелых высоковязких (табл. 1). Для нее характерно высокое содержание серы, смол и асфальтенов, но низкое содержание парафинов и легких фракций.

На хроматограмме контрольного образца нефти Усинского месторождения (рис. 4а) алканы нормального строения представлены рядом C_{10} – C_{30} , концентрационный максимум приходится на C_{13} – C_{16} . Пики нормальных алканов значительно преобладают над изопреноидными. Отношение концентрации $изо-C_{19}/изо-C_{20}$ составляло 1.17, а отношение $изо-C_{19} + изо-C_{20}/C_{17} + C_{18}$ – 0.36 (табл. 2). Характерной особенностью хромато-

граммы нефти является высокий нефтяной фон.

В ходе биодegradации нефти Усинского месторождения штаммом AG_{S10} в течение 28 сут n -алканы практически полностью потреблялись (рис. 4б). $Изо$ -алканы также в значительной степени использовались бактериями, при этом в ряду изопреноидных алканов доля пристана и фитана резко возросла. Степень деструкции n - и $изо$ -алканов составляла 99.0 и 69.0% соответственно (табл. 2). Вследствие полного потребления C_{17} и C_{18} n -алканов, определить отношение $изо-C_{19} + изо-C_{20}/C_{17} + C_{18}$ не представлялось возможным. В отличие от ранее исследованных нефтей, инкубация которых на протяжении 28 сут не влияла на отношение $изо-C_{19}/изо-C_{20}$, в деградированной нефти

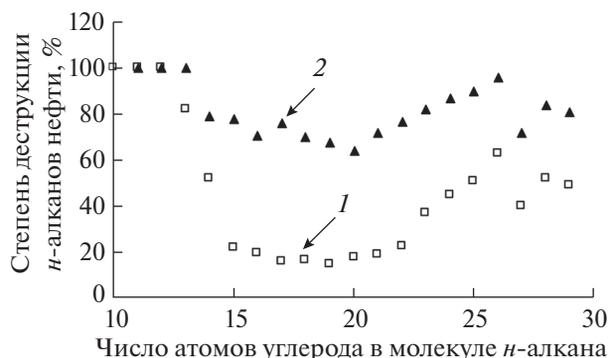


Рис. 5. Степень деструкции индивидуальных *n*-алканов нефти после культивирования штамма AG_{S10} в течение 28 сут при температуре 30°C и pH 2.5. Обозначения: 1 – нефть МНПЗ; 2 – нефть Черемуховского месторождения.

Усинского месторождения, по сравнению с контролем, величина этого параметра значительно снизилась с 1.17 до 0.75, что указывает на преимущественное окисление бактериями пристана.

Анализ полученных результатов показывает, что процесс биодegradации различных нефтей ацидофильными микобактериями штамма AG_{S10} имеет одинаковую направленность: доля нормальных алканов в их составе сокращается, относительная доля *изо*-алканов – возрастает. Эта общая тенденция характерна как для легких, так и для тяжелых высоковязких нефтей. В то же время строгая зависимость эффективности деструкции исследуемыми бактериями алифатической фракции нефти от класса конкретной нефти отсутствует. Так, в проведенных экспериментах за 28 сут культивирования штамма AG_{S10} при pH 2.5 суммарное потребление алканов (*n*- и *изо*-алканов) легкой метаново-нафтенной нефти Нижневартовского месторождения достигло 89.1%, а для тяжелой высоковязкой Усинской нефти этот показатель составил 95.0%. Для нефтей с промежуточными значениями плотности и вязкости эффективность деструкции составила 53.8% (нефть МНПЗ) и 68.4% (нефть Черемуховского месторождения) (табл. 2). Кроме того, увеличение времени культивирования медленно растущих микобактерий штамма AG_{S10} (45 сут инкубации с нефтью МНПЗ) приводило к полной деструкции не только алканов, но и значительной части нафтенной фракции.

Следует отметить, что в различных нефтях одни и те же углеводороды потреблялись ацидофильными микобактериями штамма AG_{S10} с разной скоростью, что согласуется с данными наблюдений для нейтрофильных бактерий (Sugiura et al., 1997). Одно из вероятных объяснений этого явления заключается в разной доступности этих углеводородов для бактерий в различных нефтях. С другой стороны, сравнение величин деструкции индивидуальных *n*-алканов в составе разных

нефтей позволяет выявить определенные закономерности в использовании этих соединений штаммом AG_{S10} (рис. 5). Максимальная скорость деструкции наблюдается для соединений в диапазоне *n*-C₁₀–*n*-C₁₃. С увеличением числа углеродных атомов в молекуле *n*-алкана вплоть до *n*-C₁₉–*n*-C₂₀, происходит снижение степени деструкции углеводородов с последующим монотонным повышением этой величины для высокомолекулярных алканов состава *n*-C₂₁–*n*-C₂₆. Резкое снижение величины деструкции характерно для C₂₇ *n*-алкана, после чего этот показатель медленно повышался для C₂₈–C₃₀ *n*-алканов. Наблюдаемая картина может отражать различную кинетику окисления индивидуальных *n*-алканов ферментными системами бактерий. Детальное изучение этого вопроса должно быть предметом самостоятельного исследования.

Таким образом, в настоящей работе впервые представлены экспериментальные доказательства биодegradации сырой нефти ацидофильной культурой бактерий в условиях экстремальной кислотности. Приведенные результаты позволяют считать штамм AG_{S10} эффективным деструктором как легких, так и тяжелых высоковязких нефтей при pH 2.5. Отличительной особенностью исследуемых бактерий является их способность к катаболизму широкого спектра алканов нормального строения и *изо*-алканов, в том числе высокомолекулярных, как в виде индивидуальных соединений (Иванова и соавт., 2016), так и в составе нефтей разных классов. Поэтому дальнейшие исследования биодеструкции штаммом AG_{S10} вязких нефтей с высоким содержанием парафина и высокопарафинистых нефтей представляют интерес не только с микробиологической точки зрения, но и для решения технических проблем, возникающих при их добыче и транспортировке, в связи с отложениями парафина.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 16-14-00028).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Борзенков И.А., Милехина Е.И., Готоева М.Т., Розанова Е.П., Беляев С.С. Свойства углеводородокисляющих бактерий, изолированных из нефтяных месторождений Татарстана, Западной Сибири и Вьетнама // Микробиология. 2006. Т. 75. № 1. С. 82–89.
- Borzenkov I.A., Milekhina E.I., Gotoeva M.T., Rozanova E.P., Belyaev S.S. The properties of hydrocarbon-oxidizing bacteria isolated from the oilfields of Tatarstan, Western Siberia, and Vietnam // Microbiology (Moscow). 2006. V. 75. P. 66–72.
- Гэрэлмаа Т. Исследование процессов биodeградации вязких нефтей Монголии для создания методов увеличения нефтеотдачи и рекультивации нефтезагрязненных почв. Автореферат дис. ... канд. биол. наук, 26.05.2010. Томск: Институт химии нефти СО РАН, 2010. 26 с.
- Иванова А.Е., Кизилова А.К., Кравченко И.К., Канатьева А.Ю., Курганов А.А., Беляев С.С. Окисляющая углеводороды ацидофильная термотолерантная ассоциация бактерий из серных карт // Микробиология. 2013. Т. 82. № 4. С. 464–472.
- Ivanova A.E., Kizilova A.K., Kanat'eva A.Yu., Kravchenko I.K., Kurganov A.A., Belyaev S.S. A hydrocarbon-oxidizing acidophilic thermotolerant bacterial association from sulfur blocks // Microbiology (Moscow). 2013. V. 82. P. 482–489.
- Иванова А.Е., Сухачева А.Е., Канатьева А.Ю., Кравченко И.К., Курганов А.А. Углеводородокисляющий потенциал и гены биodeградации *n*-алканов новой ацидофильной ассоциации микобактерий из серных карт // Микробиология. 2014. Т. 83. № 6. С. 667–676.
- Ivanova A.E., Sukhacheva M.V., Kanat'eva A.Yu., Kravchenko I.K., Kurganov A.A. Hydrocarbon-oxidizing potential and the genes for *n*-alkane biodegradation in a new acidophilic mycobacterial association from sulfur blocks // Microbiology (Moscow). 2014. V. 83. P. 764–772.
- Иванова А.Е., Соколова Д.Ш., Канатьева А.Ю. Биodeградация углеводородов и образование поверхностно-активных соединений ацидофильными микобактериями // Микробиология. 2016. Т. 85. № 3. С. 300–308.
- Ivanova A.E., Sokolova D.Sh., Kanat'eva A.Yu. Hydrocarbon biodegradation and surfactant production by acidophilic mycobacteria // Microbiology (Moscow). 2016. V. 85. P. 317–324.
- Иванова А.Е., Канатьева А.Ю., Курганов А.А., Селифанова М.В., Пурьгин П.П. Аэробная биodeградация адмантанов в условиях высокой кислотности // Микробиология. 2017. Т. 86. № 3. С. 307–316.
- Ivanova A.E., Kanat'eva A.Yu., Kurganov A.A., Selifanova M.B., Purygin P.P. Aerobic degradation of adamantanes at highly acidic conditions // Microbiology (Moscow). 2017. V. 86. P. 330–337.
- Назина Т.Н., Соколова Д.Ш., Бабич Т.Л., Семенова Е.М., Еришов А.П., Биджиева С.Х., Борзенков И.А., Полтараус А.Б., Хисаметдинов М.Р., Турова Т.П. Микроорганизмы низкотемпературных месторождений тяжелой нефти (Россия) и возможность их применения для вытеснения нефти // Микробиология. 2017. Т. 86. № 6. С. 748–761.
- Nazina T.N., Sokolova D.Sh., Babich T.L., Semenova T.M., Ershov A.P., Bidzheeva S.Kh., Borzenkov I.A., Poltaraus A.B., Khisametdinov M.R., Tourova T.P. Microorganisms of low-temperature heavy oil reservoirs (Russia) and their possible application for enhanced oil recovery // Microbiology (Moscow). 2017. V. 86. P. 773–785.
- Aoshima H., Hirase T., Tada T., Ichimura N. Improvement of heavy oil degradation by *Rhodococcus erythropolis* C2 // J. Environ. Biotechnol. 2006. V. 5. P. 107–109.
- Arulazhagan P., Al-Shekri K., Huda Q., Godon J.J., Basahi J.M. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by an acidophilic *Stenotrophomonas maltophilia* strain AJH1 isolated from a mineral mining site in Saudi Arabia // Extremophiles. 2017. V. 21. P. 163–174.
- Dore S.Y., Clancy Q.E., Rylee S.M., Kulpa C.F. Naphthalene-utilizing and mercury-resistant bacteria isolated from an acidic environment // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2003. V. 63. P. 194–199.
- Hamamura N., Olson S.H., Ward D.M., Inkskeep W.P. Diversity and functional analysis of bacterial community associated with natural hydrocarbon seeps in acidic soils at Rainbow Springs, Yellowstone National Park // Appl. Environ. Microbiol. 2005. V. 71. P. 5943–5950.
- Head I.M., Gray N.D., Larten S.R. Life in the slow lane; biogeochemistry of biodegraded petroleum containing reservoirs and implications for energy recovery and carbon management // Front. Microbiol. 2014. V. 5. Article 566.
- Head I.M., Jones D.M., Larten S.R. Biological activity in the deep subsurface and the origin of heavy oil // Nature. 2003. V. 426. P. 344–352.
- Lal B., Khanna S. Degradation of crude oil by *Acinetobacter calcoaceticus* and *Alcaligenes odorans* // J. Appl. Biotechnol. 1996. V. 81. P. 355–362.
- Leachy J.G., Colwell R.R. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment // Microbiol. Rev. 1990. V. 54. P. 305–315.
- Leon V., Kumar M. Biological upgrading of heavy oil // Biotechnol. Bioprocess. Eng. 2005. V. 10. P. 471–481.
- Roling W.F.M., Ortega-Lucach S., Larter S.R., Head J.M. Acidophilic microbial communities associated with a natural, biodegraded hydrocarbon seepage // J. Appl. Microbiol. 2006. V. 101. P. 290–299.
- Sugiura K., Ishirama M., Shimauchi T., Harayama S. Physicochemical properties and biodegradability of crude oil // Environ. Sci. Technol. 1997. V. 31. P. 45–51.
- Uytbroek M., Vermeir S., Wattiau P., Ryngaert A., Springael D. Characterization of cultures enriched from acidic polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil for growth on pyrene at low pH // Appl. Environ. Microbiol. 2007. V. 73. P. 3159–3164.
- Wenger L.M., Davis C.L., Isaksen G.H. Multiple controls on petroleum biodegradation and impact on oil quality // CPE Reservoir Evaluation & Eng. 2002. P. 375–383.

Aerobic Biodegradation of Crude Oil Components by Acidophilic Mycobacteria

A. E. Ivanova^{1, *} and I. A. Borzenkov¹

I Winogradsky Institute of Microbiology, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

**e-mail: a.e.ivanova@mail.ru*

Received February 21, 2018

Abstract—Biodegradation of crude oil components by strain AG_{S10}, an acidophilic member of the genus *Mycobacterium*, was studied under extremely acidic conditions (pH 2.5). The degree of degradation of the same hydrocarbons in different kinds of oil was found to be different. The direction of biodegradation was, however, the same: the share of *n*-alkanes in oxidized oil decreased, while the share of branched alkanes increased. At the same time, the degree of redistribution of methane hydrocarbons in degraded oil varied significantly for different oils, although no strict dependence on the type of oil was found. After 28 days of incubation at 30°C and pH 2.5, the degradation of *n*- and *iso*-alkanes was 99 and 44%, respectively for the light, low-viscosity oil of the Nizhnevartovsk deposit, 58 and 32%, respectively for the medium-density oil of the Moscow oil-processing plant, and 80 and 16% and 99 and 69%, respectively for the heavy, viscous oils of the Chermukhovskoe and Usinkoye oil fields. Moreover, after extended cultivation time strain AG_{S10} completely utilized alkanes, as well as a significant part of the naphthene component of the aliphatic fraction. The studied strain was characterized by ability to oxidize a broad spectrum of methane hydrocarbons, including high-molecular C₁₇–C₃₀ *n*-alkanes, in oils of different properties and composition. Apart from its scientific interest, farther investigation of biodegradation of high-paraffin oils and viscous oils with elevated paraffin content by strain AG_{S10} may be useful in view of the technical issues associated with paraffin accumulation in the course of recovery and transportation of these oils.

Keywords: acidophilic mycobacteria, hydrocarbon biodegradation, crude oil, heavy oil, normal and *iso*-alkanes, naphthenes, gas-liquid chromatography

НОВЫЕ ШТАММЫ *BACILLUS SUBTILIS* КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ПРОБИОТИКИ

© 2018 г. Г. Ф. Хадиева^{а, *}, М. Т. Лутфуллин^а, Н. К. Мочалова^а, О. А. Ленина^б,
М. Р. Шарипова^а, А. М. Марданова^а

^аКазанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

^бИнститут органической и физической химии им. А.Е. Арбузова
Казанского научного центра Российской академии наук, Казань, Россия

*e-mail: g.h95@mail.ru

Поступила в редакцию 14.02.2018 г.

Исследованы свойства новых штаммов *Bacillus subtilis* GM2 и GM5 с высокой антимикробной активностью, изолированных из ризосферы картофеля, и охарактеризован их потенциал для использования в качестве пробиотиков: устойчивость к желчи и широкому диапазону pH среды. Штаммы *B. subtilis* GM2 и GM5 обладают протеолитической и фитатгидролизующей активностями и безопасны для модельных животных, характеризуются антагонистическими свойствами против фитопатогенных микромицетов, патогенных и условно-патогенных энтеробактерий. Сделано заключение, что штаммы *B. subtilis* GM2 и GM5 перспективны для использования в качестве пробиотиков.

Ключевые слова: *Bacillus subtilis* GM2 и GM5, характеристика штаммов, протеолитическая активность, антимикробная активность, пробиотики

DOI: 10.1134/S0026365618040110

Пробиотики – это живые микроорганизмы, использование которых положительно влияет на многие функции организма, в частности, они предотвращают инвазию различных патогенов. *Salmonella enterica* является одним из возбудителей желудочно-кишечных расстройств человека, а их основным источником являются сельскохозяйственные животные и домашняя птица, которые представляют собой резервуары *S. enterica*. Одним из путей борьбы с распространением возбудителей является разработка различных пробиотиков как альтернативы антибиотикам (Huyghebaert et al., 2011; Li et al., 2016; Bai et al., 2017). В качестве пробиотиков, как правило, используют автохтонные молочнокислые бактерии, принадлежащие к родам *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*, а также грамположительные спорообразующие бактерии рода *Bacillus* (Huyghebaert et al., 2011). Бактерии рода *Bacillus* способны образовывать эндоспоры, позволяющие им сохранять жизнеспособность в экстремальных условиях: при высоких или низких температурах, радиации, неоптимальных pH, давлении и в присутствии токсичных химических веществ, которые повреждают вегетативные клетки (Oh et al., 2017; Bernardeau et al., 2017). Плотная многослойная оболочка спор помогает бациллам сохранять активность при прохождении транзитом через желудочно-кишечный тракт (ЖКТ), некоторые участки которого представляют собой токсичную

среду для *Bacillus* вследствие условий аноксии, низкого pH и солей желчи, а также чрезвычайно высокой концентрации комменсальных бактерий (до 10^{12} клеток в 1 г содержимого толстой кишки), которые конкурируют за питательные вещества и экологическое пространство (Bernardeau et al., 2017). В экспериментах на мышах доказано, что споры *B. subtilis* способны прорасти, а клетки размножаться и вновь образовывать споры в кишечнике животных (Hoa et al., 2001; Bernardeau et al., 2017). Штаммы *B. subtilis*, как потенциальные пробиотики, широко изучаются на генетическом и физиологическом уровнях (Cutting et al., 2011).

Исследования показывают, что помимо устойчивости пробиотических штаммов *Bacillus* к действию желчных кислот, они обладают способностью к иммуностимуляции при желудочно-кишечных расстройствах (Endres et al., 2011). Способность к синтезу антибиотиков, бактериоцинов, циклических липопептидов и литических ферментов с антимикробной активностью обеспечивают пробиотическую активность бактерий рода *Bacillus* (Sorokulova, 2013). Также показано, что штаммы *B. subtilis* и *B. coagulans* в качестве пробиотиков оказывают ростостимулирующее и профилактическое действие на цыплят-бройлеров (Guo et al., 2017; Oh et al., 2017).

Из ризосферы картофеля нами были выделены два штамма *B. subtilis* с высокой антимикробной активностью (Mardanova et al., 2017). Целью работы было охарактеризовать свойства новых штаммов и оценить потенциал их использования в качестве пробиотиков.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования были штаммы *B. subtilis* GM2 и GM5 с высокой антимикробной активностью (Mardanova et al., 2017). В качестве тест-культур использовали условно-патогенные бактерии кишечной группы – *Salmonella enterica* serotype Typhimurium ATCC14028s, *Klebsiella oxytoca*, *Escherichia coli* и микромицеты *Fusarium avenaceum*, *F. oxysporum*, *F. redolens*, *F. solani*.

Питательные среды и условия культивирования. Для культивирования использовали следующие среды: (1) среда LB (Лурия–Бертони) (г/л): триптон – 10.0, дрожжевой экстракт – 5.0, NaCl – 5.0; (2) среда LA (г/л): триптон – 10.0, дрожжевой экстракт – 5.0, NaCl – 5.0, агар – 20.0; (3) среда № 1 (г/л): мальтоза – 20.0, пептон – 10.0, CaCl₂ – 1.0; (4) среда № 2 (г/л): соевая мука – 30.0, NaNO₃ – 3.0, K₂HPO₄ – 1.0, MgSO₄ – 0.2, KCl – 0.2; (5) среда № 3 (г/л): кукурузный экстракт – 20.0, лактоза 10.0; (6) среда дизоксихлоратный цитратный агар для культивирования сальмонелл. Бактерии культивировали в термостате при температуре 37°C и в термостате-шейкере фирмы “IKA®KS 4000” (Германия) при 37°C и интенсивности качания 200 об./мин. Оптическую плотность культуры измеряли на спектрофотометре “Bio-Rad” (США) при длине волны 590 нм.

Динамику роста бактерий и образования спор исследовали на средах LB и среде № 1. Бактерии культивировали в течение 48 ч в термошейкере при 37°C, 200 об./мин. Через каждые 2 ч проводили отбор культуры бактерий для измерения оптической плотности на спектрофотометре при длине волны 590 нм и определения внеклеточной протеолитической активности. Количество образовавшихся спор считали в камере Горяева “Optical Market” (Украина), начиная с 10 ч культивирования бактерий. Бактерии микроскопировали с помощью микроскопа MICROS AUSTRIA MC 300 (Австрия).

Способность к росту при различных pH среды исследовали в колбах Эрленмейера объемом 250 мл, содержащих 50 мл среды LB (pH 2–10). Бактерии культивировали в термошейкере (37°C, 200 об./мин с аэрацией) и определяли оптическую плотность культур на 24 ч роста.

Устойчивость спор к pH и способность к прорастанию *in vitro* исследовали по методу, описанному в работе Haller et al. (2001). Споры бацилл получали нагреванием 2-сут бактериальной культуры

при 60°C в течение 90 мин для элиминации вегетативных клеток. Начальная концентрация спор составляла 4×10^7 КОЕ/мл. Суспензию спор в среде LB инкубировали при различных pH при 40°C. Споры инкубировали при pH 5.0 в течение 60 мин, концентрировали центрифугированием (6000 об./мин в течение 10 мин), супернатант удаляли, осадок спор переносили в такой же объем свежей среды LB (pH 3.0) и инкубировали в течение 90 мин. Отбирали 0.1 мл суспензии и прогревали при 60°C в течение 90 мин, готовили серию разведений и высевали газоном на среду LA для подсчета КОЕ/мл. Оставшуюся суспензию спор концентрировали центрифугированием и переносили в среду LB с pH 7.0, инкубировали 150 мин. Отбирали аликвоту (0.1 мл), которую прогревали в течение 90 мин при 60°C и определяли КОЕ/мл. Для подсчета количества вегетативных клеток, прорастающих из спор непрогретой суспензии, готовили серию разведений и высевали на среду LA.

Устойчивость спор бактерий к желчи исследовали *in vitro* по методу, описанному в работе Cenci et al. (2006). Использовали желчь цыплят-бройлеров, которую стерилизовали фильтрованием через стерильный фильтр Millipore (0.22 мкм). Споры вносили в среду LB после добавления желчи (1 и 10%) и доведения pH до 7.5. Суспензию спор инкубировали при 40°C в течение 6 ч и затем определяли КОЕ/мл.

Протеолитическую активность в культуральной жидкости бактерий определяли по расщеплению азоказеина (“Sigma”, США) (Demidyuk et al., 2006). Ингибиторный анализ проводили в присутствии 1,10-фенантролина (“Serva”, Германия), специфического ингибитора металлопротеиназ, и PMSF (“Serva”, Германия), специфического ингибитора сериновых протеиназ. Ингибиторы добавляли к культуральной жидкости бацилл в концентрации 1.5 мМ, инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре и определяли остаточную активность по гидролизу азоказеина. Активность выражали в процентах относительно контроля – активности в отсутствие ингибиторов, которую принимали за 100%.

Фитатгидролизующую активность определяли с использованием селективной питательной среды для фитатдеградирующих бактерий – *phytase-screening medium* (PSM) по методике Миттеля (Mittal et al., 2011). О способности гидролизовать фитат Na судили по наличию зон гидролиза вокруг колоний бактерий.

Определение вирулентности, токсичности и токсигенности бактерий проводили на мышах обоего пола линии ICR (CD-1) в лаборатории химико-биологических исследований ИОФХ им. А.Е. Арбузова КазНЦ РАН. Мыши содержались в стандартных условиях вивария, для кормления использовали

стандартный гранулированный комбинированный корм. Для каждой экспериментальной группы были отобраны по 6 мышей одного возраста массой 16 ± 0.5 г.

Вирулентность штаммов изучали при однократном пероральном или внутрибрюшинном введении мышам 1 сут культуры бактерий в физиологическом растворе в дозах 10^6 , 10^7 и 10^8 КОЕ на одно животное. Токсичность штаммов изучали путем внутрибрюшинного введения мышам взвеси 18-часовой культуры микроорганизмов в стерильном физиологическом растворе, инактивированной нагреванием при 60°C в течение 90 мин. Токсигенность штаммов бацилл изучали путем внутрибрюшинного и перорального введения стерильного фильтрата культуральной жидкости 3-х и 7-сут культур. Животным контрольных групп вводили стерильную жидкую питательную среду. За всеми животными наблюдали в течение 30 сут, после чего забирали биоматериал для дальнейшего исследования. Из каждой опытной группы были отобраны случайным образом по 3 мыши. Животных усыпляли при помощи внутрибрюшинного введения раствора хлоральгидрата в дозе 8 мг/0.1 мл раствора на 20 г массы животного. Забор образцов тканей проводили в стерильных условиях. Обследовали внутренние органы на выявление патологий и производили посев крови из сердца, печени и селезенки на среде LA.

Все эксперименты были выполнены с соблюдением биоэтических норм. Содержание, питание, уход за животными и выведение их из эксперимента осуществляли в соответствии с требованиями Министрства и среднего специального образования СССР Приказ № 742 от 13.11.1984 г., утвердившего «Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных», которые действуют по настоящее время, и Директивой Европейского парламента и Совета от 22 сентября 2010 г. по защите животных, используемых для научных целей (Directive 2010/63/UE on the protection of animals used of scientific purposes).

Антагонистическую активность бактерий *B. subtilis* GM2 и GM5 по отношению к тест-культурам определяли методом лунок, двойного агара и методом блоков (Егоров, 2004). Об уровне антагонистической активности бактерий и экзометаболических судили по диаметрам зон задержки роста тест-культур вокруг лунок с культуральной жидкостью или колоний бактерий-антагонистов.

Выделение циклических липопептидов из культуральной жидкости бактерий проводили методом (Gong et al., 2006), с модификациями, описанными в работе (Mardanov et al., 2017). Антагонистическую активность в отношении тест-культур жидкой суммарной фракции липо-

пептидов исследовали с помощью диско-диффузионного метода (Егоров, 2004).

Статистический анализ проводили с использованием программы Microsoft Excel. Для описания и сравнения признаков использовали построения 95%-ных доверительных интервалов для средних.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Динамику роста бактерий, биосинтеза протеиназ и спорообразования исследовали на среде LB и среде с добавлением мальтозы. Стационарную фазу роста культуры штамма *B. subtilis* GM2 наблюдали после 14–16 ч роста (рис. 1а, 1б), для штамма GM5 после 16–20 ч роста на среде LB и среде с добавлением мальтозы (рис. 1в, 1г). На среде LB наблюдали более быстрый переход культур к стадии отмирания. Исследование динамики спорообразования штамма GM2 показало, что появление свободных спор в среде с добавлением мальтозы наблюдали после 8 ч, а в среде LB после 24 ч культивирования; у штамма GM5, растущего в среде с добавлением мальтозы – после 12 ч, а в среде LB – после 16 ч роста. Оба штамма GM2 и GM5 на среде с добавлением мальтозы переходили к споруляции быстрее, чем на среде LB. В среде с добавлением мальтозы у обоих штаммов GM2 и GM5 небольшое количество спор (15–20% от общего числа клеток) наблюдали уже в конце экспоненциальной фазы роста бактерий. На 46–48 ч роста штаммов GM2 и GM5 количество спор на обеих средах достигало 50–70%.

Морфологически бактерии обоих штаммов были представлены с палочками с закругленными концами, образующими цепочки (рис. 2). Штаммы различались по морфологии колоний. Бактерии штамма GM2 на среде LA образовывали серовато-белые, матовые, сухие колонии с неправильными ризоидными краями, врастающими в агар. Бактерии штамма GM5 образовывали белые, гладкие, блестящие колонии с неправильными круглыми краями слизистой консистенции.

Изучали рост штаммов *B. subtilis* GM2 и GM5 на разных субстратах – компонентах кормов цыплят-бройлеров (средах с добавлением соевой муки и среда с добавлением кукурузной муки). В качестве контроля использовали богатую питательную среду LB. При росте на жидких питательных средах, содержащих соевую муку и кукурузную муку, бактерии практически не различались продуктивностью (табл. 1), но оптимальной для образования спор была среда с добавлением мальтозы. Среда, содержащая 3% соевую муку (№ 2) может быть использована для накопления биомассы вместо сред со сложным составом (LB и среда с добавлением мальтозы).

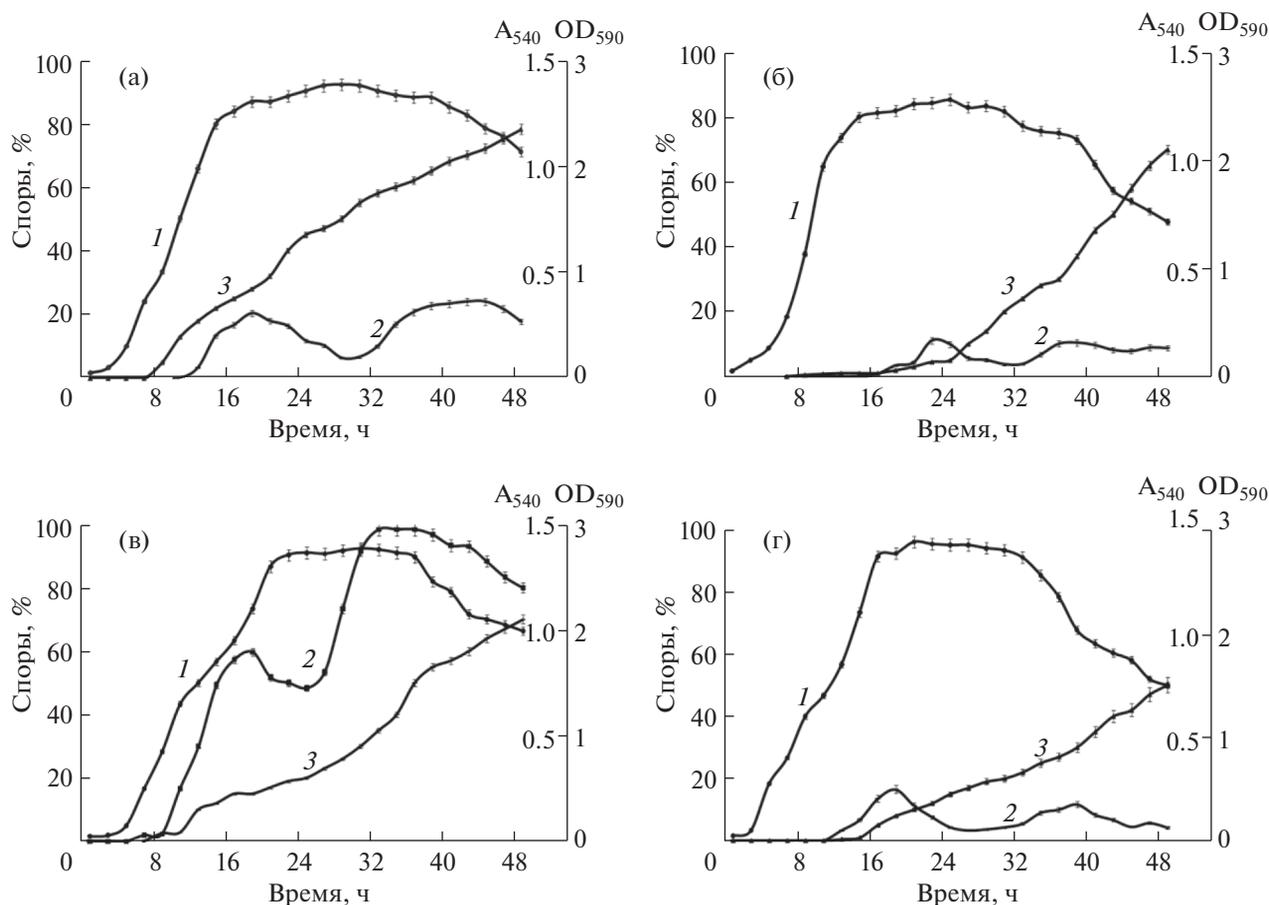


Рис. 1. Динамика роста клеток (1), накопления протеолитической активности (2) и образования спор (3) штаммами *B. subtilis* GM2 (а, в) и GM5 (б, г) на среде № 1 (а, б) и среде LB (в, г).

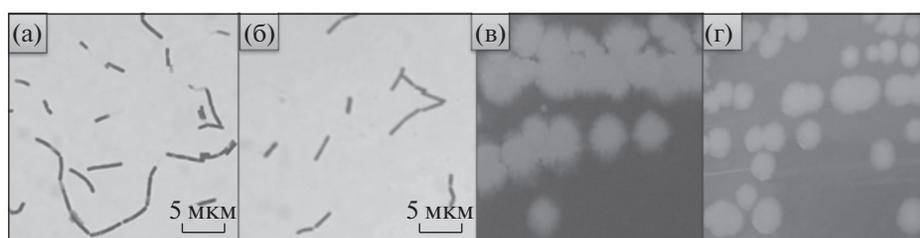


Рис. 2. Морфология клеток и колоний штаммов *B. subtilis* GM2 (а, в) и GM5 (б, г). Окраска по Граму (а, б), увеличение ×1000.

Для определения влияния pH среды на накопление биомассы использовали среду LB с pH от 2.0 до 10.0 (рис. 3). Оба штамма были способны к росту в широком диапазоне pH с оптимумом роста для обоих штаммов при pH среды от 6.0 до 8.0. Рост штаммов не ингибировался при pH 2.0–4.0 и 10.0, что свидетельствовало о способности бактерий адаптироваться к широкому диапазону pH среды. При этом в интервале значений pH 2.0–6.0 рост культур *B. subtilis* GM2 и GM5 был одинаковым, однако при pH 8.0 и 10.0 рост штамма *B. sub-*

tilis GM5 был выше, чем штамма GM2 (на 60–70% соответственно), что свидетельствовало о большей устойчивости штамма GM5 к щелочным значениям pH среды.

Устойчивость к кислотам и желчи ЖКТ является важным свойством пробиотиков. Инкубация суспензии спор *B. subtilis* GM2 и GM5 (4×10^7 КОЕ/мл) в среде LB, содержащей 1 и 10% желчи, в течение 6 ч показала их устойчивость (табл. 2). В среде, содержащей 1% желчь, ингибирование роста штамма GM2 составило 40%, штамма GM5 – 39%, в

Таблица 1. Рост *Bacillus subtilis* GM2 и GM5 на разных средах

Среда	Оптическая плотность культур, 24 ч, 590 нм	
	GM2	GM5
Контроль – среда LB	2.12 ± 0.42	2.56 ± 0.39
Среда № 2	2.01 ± 0.57	2.30 ± 0.41
Среда № 3	0.76 ± 0.15	0.78 ± 0.25

присутствии 10% желчи – 70 и 56% относительно контроля соответственно.

Отметим, что использованная концентрация желчи 10% была значительно выше, чем принято при исследовании устойчивости спор бактерий, применяемых в качестве пробиотиков. Концентрация желчи, равная 1% считается критическим уровнем для оценки устойчивости споровых форм пробиотиков (Hugonimus et al., 2000). Многие бациллы, например, *B. clausii*, обладают высокой устойчивостью к действию желчи, по сравнению с лакто- и бифидобактериями (Charteris et al., 2000). У бактерий разных видов рода *Bacillus*: *B. stratosphericus*, *B. aerophilus*, *B. licheniformis*, *Solibacillus silvestris*, устойчивых к желчному соку, с увеличением концентрации желчи наблюдалось снижение жизнеспособности. Бактериальные штаммы выживали после 1.5 ч воздействия различных концентраций желчного сока (2–20%) в диапазоне значений pH 5.5–7.0 (Mukherjee, 2016). Значение pH для желчи и панкреатического сока, секретруемых в кишечнике, около pH 8.0 (Huang, Adams, 2004). Согласно полученным нами данным штамм GM5 преимущественно растет при pH 8.0 и более устойчив к высокой концентрации желчи (10%), что определяет его перспективность для использования в качестве пробиотика.

Способность спор к прорастанию при разных значениях pH *in vitro*. Имитацию транзита спор *B. subtilis* GM2 и GM5 через ЖКТ кур *in vitro* проводили в среде LB при значениях pH 5.0, 3.0 и 7.0 и длительности инкубации от 60 до 150 мин (рис. 4). Начальная концентрация спор составляла 4×10^7 КОЕ/мл. После инкубирования в течение 1 ч при pH 5.0 количество спор штаммов GM2 и GM5 снижалось до 1.4×10^6 , 1.1×10^6 КОЕ/мл соответственно, что свидетельствовало о способности спор обоих штаммов активно переходить в вегетативные формы. При культивировании в течение 1.5 ч при pH 3.0 количество спор уменьшалось на 14.3% у GM2, 72.7% у GM5 и составляло 1.2×10^6 , 3.0×10^5 КОЕ/мл соответственно. После инкубации спор при pH 7.0 в течение 2.5 ч их количество снижалось до 5.6×10^4 КОЕ/мл у штамма GM2, 6.5×10^3 КОЕ/мл у GM5, что соответствовало 0.14 и 0.02% от начальной концентрации спор бактерий. В то же время количество вегетативных клеток в случае штамма GM2 со-

ставляло 1.1×10^6 КОЕ/мл, а GM5 – 1.2×10^6 КОЕ/мл, что свидетельствовало об активном прорастании спор. Таким образом, споры *B. subtilis* способны сохранять жизнеспособность при различных значениях pH и прорасти в вегетативные клетки, которые могут оказывать пробиотическое действие. Количество спор *B. subtilis* в кишечнике после 4 сут превышало ожидаемую величину, что указывало на прорастание спор в вегетативные формы *in vivo* (Hoa et al., 2001; Casula, Cutting, 2002).

Таким образом, устойчивость спор исследуемого штамма к низким значениям pH среды и способность быстро прорасти при слабощелочном и нейтральном pH позволяет рекомендовать изолированные штаммы к использованию в качестве пробиотиков. Процесс развития культур, выросших из спор, сопровождается продукцией физиологически активных веществ, антибиотиков, лизоцима, аминокислот, витаминов и протеолитических ферментов, необходимых для проявления пробиотических свойств штамма (Bernardeau et al., 2017).

Протеолитическую активность штаммов определяли по гидролизу азоказеина (рис. 1). При исследовании динамики ее накопления в культуральной жидкости у бактерий *B. subtilis* GM2 и GM5 обнаружили два пика активности: у штамма GM2 – на 16–24 и 36–46 ч роста на среде с добав-

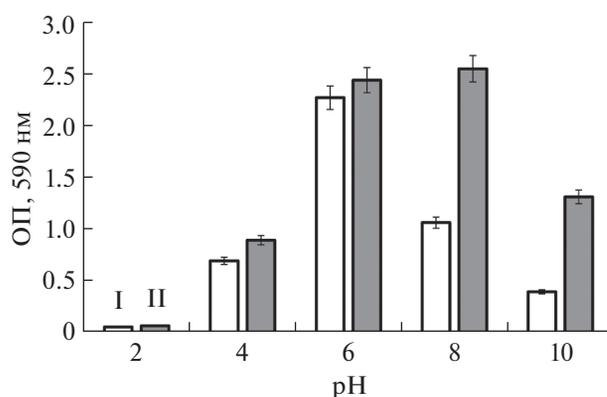


Рис. 3. Рост бактерий *B. subtilis* GM2 (I) и GM5 (II) на среде LB при разных значениях pH, оптическая плотность культур на 24 ч роста.

Таблица 2. Устойчивость спор *B. subtilis* GM2 и GM5 к желчи

Концентрация желчи, %	КОЕ/мл, 6 ч	
	GM2	GM5
0	4.15×10^7	4.23×10^7
1	2.47×10^7	2.58×10^7
10	1.24×10^7	1.85×10^7

лением мальтозы и на 22–24 и 34–42 ч роста на среде LB. У штамма GM5 протеолитическая активность в культуральной жидкости была выше в 2 раза на среде LB и в 4 раза на среде с добавлением мальтозы, чем у штамма GM2, и внеклеточная активность также накапливалась в виде двух пиков: на среде с добавлением мальтозы на 14–20 и 30–46 ч роста, а на среде LB – 16–20 и 34–40 ч роста (рис. 1).

Методом ингибиторного анализа протеолитической активности на 20 ч роста бактерий (соответствует первому пику активности) показано, что в основном она связана с действием сериновых протеиназ, на долю которых у штаммов на обеих средах приходится 68–75% от общей активности и на долю металлопротеиназ – 25–30% (рис. 5). Таким образом, оба штамма секретируют в среду сериновые и металлопротеиназы.

Способность к использованию фитата. Исследовали способность штаммов использовать фитат в качестве единственного источника фосфора, поскольку до 80% от общего фосфора в зерновых кормах содержится в форме фитата (Humer et al., 2015). Штаммы GM2 и GM5 высевали на агаризованную среду PSM и культивировали до появления зон гидролиза. Оба штамма показали эффективный рост и образовывали выраженные зоны

просветления вокруг колоний на среде PSM, что свидетельствовало о способности бактерий гидролизовать фитат, который является трудноперевариваемым источником фосфора в кормах (рис. 6).

Таким образом, способность исследуемых штаммов к синтезу внеклеточных протеиназ и фитаз может иметь большое значение для улучшения перевариваемости кормов и повышения их усвояемости (Wu et al., 2015; Wealleans et al., 2017).

Важным этапом в оценке пробиотической эффективности бактерий является изучение их безопасности. Исследование на белых мышах вирулентности, токсичности и токсигенности бактерий показали, что штаммы *B. subtilis* GM2 и GM5 являются безопасными для жизнедеятельности мышей. Наблюдения за опытными и контрольными группами мышей проводили на протяжении 30 сут после инъекций или перорального введения бактериальной суспензии или бесклеточной среды. В этот период все животные оставались активными, хорошо поедали пищевые рационы, физиологические отправления и поведенческие реакции у них не изменялись. Вес мышей в опытных группах сохранялся в норме относительно мышей контрольных групп (табл. 3). При пероральном введении суспензии спор *B. subtilis* GM2 в количестве 10^7 и 10^8 КОЕ/животное наблюдался прирост их массы на 13.67 ± 0.68 и $14.13 \pm 0.71\%$, а *B. subtilis* GM5 – на 8.60 ± 0.43 и $7.54 \pm 0.37\%$ относительно контроля. При вскрытии мышей повреждений и патологических изменений внутренних органов не выявили. Результаты микробиологических посевов крови из сердца и печени были отрицательными. Полученные данные свидетельствуют о безопасности штаммов *B. subtilis* GM2 и GM5 для модельных животных. Положительный эффект на прирост биомассы позволил сделать вывод о возможности использования исследуемых бактерий в качестве пробиотиков.

Антагонистическая активность бактерий *B. subtilis* GM2 и GM5 в отношении бактерий *Salmonella typhimurium* была исследована методом лунок и двойного слоя агара (рис. 7а). Вокруг лунок, в которые вносили культуральную жидкость 72-часовых культур бацилл, через 24 ч культивирования наблюдали зоны подавления роста тест-культуры шириной 2.1 и 2.4 мм для штаммов GM2 и GM5, соответственно. При использовании метода двойного слоя в верхнем агаре, содержащем суспензию тест-культуры, наблюдали образование зоны просветления диаметром 2.5 мм вокруг колонии бацилл, что свидетельствовало о подавлении роста сальмонелл метаболитами бацилл.

Штаммы *B. subtilis* GM2 и GM5 проявляли антагонистическую активность в отношении фитопатогенных микромицетов *Fusarium avenaceum*, *F. oxysporum*, *F. redolens* и *F. solani* (табл. 4). Наиболее интенсивно оба штамма ингибировали рост

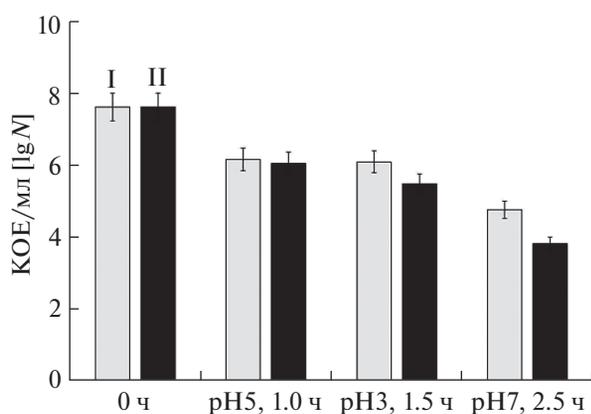


Рис. 4. Устойчивость спор *B. subtilis* GM2 (I) и GM5 (II) к действию различных pH среды. Споры инкубировали при pH, характерных для различных отделов пищеварительного тракта цыплят.

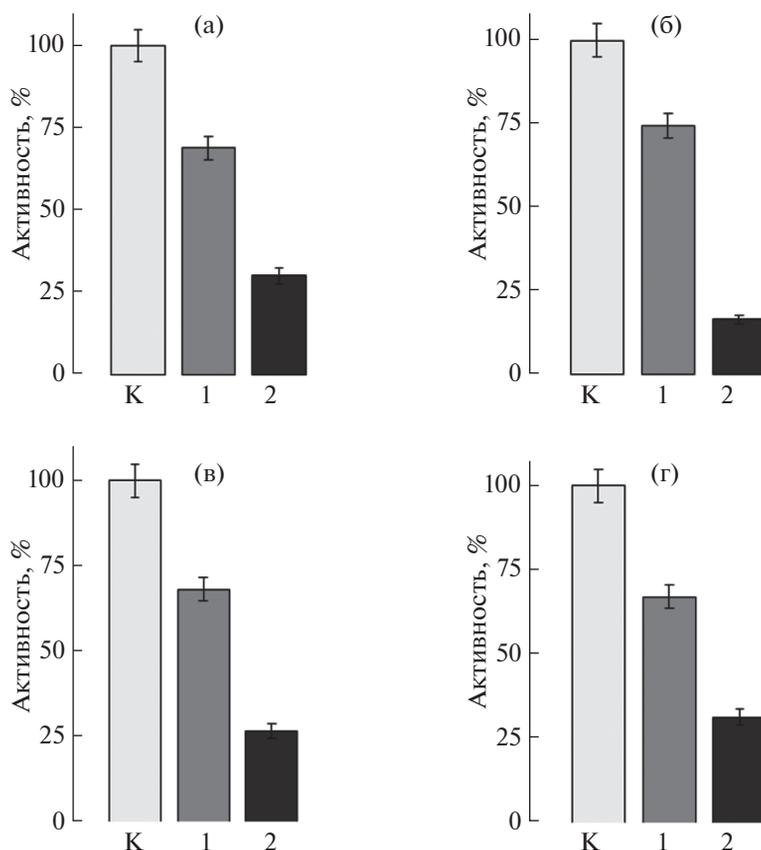


Рис. 5. Ингибиторный анализ протеолитической активности в культуральной жидкости штаммов *B. subtilis* GM2 (а, б), В – GM5 (в, г) в среде № 1 (а, в) и среде LB (б, г) на 20 ч. К (контроль) – активность в культуральной жидкости без ингибиторов (100%). 1 – остаточная активность в присутствии 1,10-фенантролина, 2 – остаточная активность в присутствии PMSF.

колонии микромицета *F. avenaceum* (рис 7в). Штамм *B. subtilis* GM5 на 19–29% эффективнее ингибировал рост всех исследуемых микромицетов, по сравнению со штаммом GM2 (табл. 4).

Способность бактерий *B. subtilis* GM2 и GM5 ингибировать рост не только грамотрицательных бактерий, но и фитопатогенных микромицетов является важной характеристикой пробиотиков, поскольку корма (пшеница, кукуруза и другое растительное сырье) могут быть заражены фитопатогенными грибами, многие из которых являются продуцентами микотоксинов (Oldenburg et al., 2017; Karlsson et al., 2017). Микромицеты рода *Fusarium* относятся к одной из важнейших групп продуцентов различных микотоксинов (Moretti et al., 2013).

В геноме штамма GM2 нами идентифицированы гены, ответственные за синтез циклических липопептидов итурина А, бацилломицина L и сурфактина, а также дипептидного антибиотика бацилизина; в геноме штамма GM5 идентифицированы гены, ответственные за синтез циклических антибиотиков фенгицина и сурфактина (Mardanov et al., 2017).

Исследовали антибактериальную активность фракции липопептидов *B. subtilis* GM2 и GM5, которую выделяли из культуральной жидкости бактерий, выращенных на среде, содержащей мальтозу (среда № 1), в течение 72 ч. Ингибирующую активность липопептидов исследовали диско-диффузионным методом в отношении разных видов энтеробактерий – *Salmonella typhimurium*, *E. coli*, *K. oxytoca* (табл. 5). Липопептиды *B. subtilis*

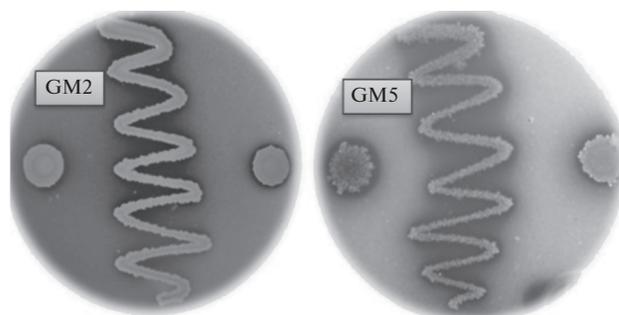


Рис. 6. Фитатгидролизующая активность *B. subtilis* GM2 и GM5, рост бактерий на среде PSM, 37°C.

Таблица 3. Прирост массы тела мышей на 21 сут при пероральном введении взвеси бактерий *B. subtilis* GM2 и GM5

<i>B. subtilis</i> GM2, КОЕ/животное			<i>B. subtilis</i> GM5, КОЕ/животное		
10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸
4.20 ± 0.30	13.67 ± 0.68	14.13 ± 0.71	2.60 ± 0.13	8.60 ± 0.43	7.54 ± 0.37

Таблица 4. Ингибирование* роста микромицетов штаммами *B. subtilis* GM2 и GM5

	Микромицеты	Радиус колонии микромицета, мм		
		Контроль	<i>B. subtilis</i> GM2	<i>B. subtilis</i> GM5
1	<i>F. avenaceum</i>	42 ± 2.5	18 ± 1.0	24 ± 1.5
2	<i>F. oxysporum</i>	37 ± 2.0	17 ± 1.0	21 ± 1.3
3	<i>F. redolens</i>	38 ± 2.0	13 ± 0.7	17 ± 1.0
4	<i>F. solani</i>	43 ± 2.5	14 ± 0.8	19 ± 1.0

* Метод блоков.

Таблица 5. Ингибирование* роста энтеробактерий суммарной фракцией липопептидов *B. subtilis* GM2 и GM5

Тест-культура	Диаметр зоны подавления роста, мм	
	<i>B. subtilis</i> GM2	<i>B. subtilis</i> GM5
<i>S. enterica typhimurium</i>	14.2 ± 0.71	17.4 ± 0.87
<i>E. coli</i>	15.0 ± 0.79	15.0 ± 0.75
<i>K. oxytoca</i>	14.2 ± 0.71	18.2 ± 0.91

* Диска-диффузионный метод.

GM2 и GM5 проявляли антагонистическую активность в отношении всех исследованных тест-культур, однако в случае штамма *B. subtilis* GM5 ингибирующий эффект был выше, что свидетельствовало о его более высокой антибактериальной и антигрибной активности.

Таким образом, изолированные из ризосферы штаммы *B. subtilis* GM2 и GM5 характеризуются антагонистическими свойствами против фитопатогенных микромицетов, патогенных и условно-патогенных энтеробактерий, что может быть обусловлено действием липопептидов. За счет этих

метаболитов бациллы способны подавлять патогенную и условно-патогенную микрофлору. Споры исследуемых бактерий обладали устойчивостью к желчи и широкому диапазону pH среды. Вегетативные клетки бацилл обладали способностью к синтезу протеолитических и фитатгидролизующих ферментов, что важно для повышения пищеварительных функций при добавлении штаммов в корма. На основании полученных результатов можно сделать заключение, что штаммы *B. subtilis* GM2 и GM5 перспективны для использования в качестве пробиотиков.

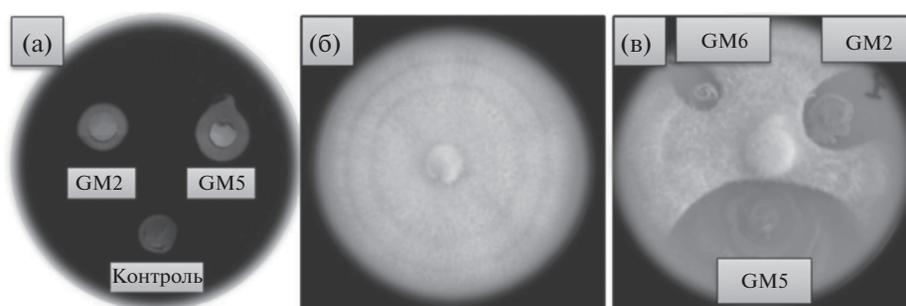


Рис. 7. Антагонистическая активность *B. subtilis* GM2 и GM5 в отношении *Salmonella typhimurium* (а) и *F. avenacium* (б, в).

Работа выполнена в рамках государственной программы повышения конкурентоспособности Казанского (Приволжского) федерального университета среди ведущих мировых научно-образовательных центров и поддержана грантом РФФ № 16-16-04062.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках. М.: Наука, 2004. 528 с.
- Bai K., Huang Q., Zhang J., He J., Zhang L., Wang T. Supplemental effects of probiotic *Bacillus subtilis* fmbJ on growth performance, antioxidant capacity, and meat quality of broiler chickens // *Poult. Sci.* 2017. V. 96. P. 74–82.
- Bernardeau M., Lehtinen M.J., Forssten S.D., Nurminen P. Importance of the gastrointestinal life cycle of *Bacillus* for probiotic functionality // *J. Food Sci. Technol.* 2017. V. 54. P. 2570–2584.
- Casula G., Cutting S.M. *Bacillus* probiotics: spore germination in the gastrointestinal tract // *Appl. Environ. Microbiol.* 2002. V. 68. P. 2344–2352.
- Cenci G., Trotta F., Caldini G. Tolerance to challenges miming gastrointestinal transit by spores and vegetative cells of *Bacillus clausii* // *J. Appl. Microbiol.* 2006. V. 101. P. 1208–1215.
- Cutting M. *Bacillus* probiotics // *Food Microbiol.* 2011. V. 28. P. 214–220.
- Charteris W.P., Kelly P.M., Morelli L., Collins J.K. Effect of conjugated bile salts on antibiotic susceptibility of bile salt-tolerant *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* isolates // *J. Food Protect.* 2000. V. 63. P. 1369–1376.
- Demidyuk I.V., Kalashnikov A.E., Gromova T.Y., Gasanov E.V., Safina D.R., Zabolotskaya M.V., Rudenskaya G.N., Kostrov S.V. Cloning, sequencing, expression, and characterization of protealysin, a novel neutral proteinase from *Serratia proteamaculans* representing a new group of thermolysin-like proteases with short N-terminal region of precursor // *Protein. Expr. Purif.* 2006. V. 47. P. 551–561.
- Endres J.R., Qureshi I., Farber T., Hauswirth J., Hirka G., Pasics I. One-year chronic oral toxicity with combined reproduction toxicity study of a novel probiotic, *Bacillus coagulans*, as a food ingredient // *Food Chem. Toxicol.* 2011. V. 49. P. 1174–1182.
- Gong M., Wang J.D., Zhang J., Yang H., Lu X.F., Pel Y., Cheng J.Q. Study of the antifungal ability of *Bacillus subtilis* strain PY-1 *in vitro* and identification of its antifungal substance (iturin A) // *Acta Biochim. Biophys. Sinica.* 2006. V. 38. P. 233–240.
- Guo J.R., Dong X.F., Liu S., Tong J.M. Effects of long-term *Bacillus subtilis* CGMCC 1.921 supplementation on performance, egg quality, and fecal and cecal microbiota of laying hens // *Poultry Sci.* 2017. V. 96. P. 1280–1289.
- Haller D., Colbus H., Gänzle M. G., Scherenbacher P., Bode C., Hammes W. P. Metabolic and functional properties of lactic acid bacteria in the gastro-intestinal ecosystem: a comparative *in vitro* study between bacteria of intestinal and fermented food origin // *Syst. Appl. Microbiol.* 2001. V. 24. P. 218–226.
- Hoa T.T., Duc L.H., Isticato R., Baccigalupi L., Ricca E., Van P.H., Cutting S.M. Fate and dissemination of *Bacillus subtilis* spores in a murine model // *Appl. Environ. Microbiol.* 2001. V. 67. P. 3819–3823.
- Huang Y., Adams M.C. *In vitro* assessment of the upper gastrointestinal tolerance of potential probiotic dairy propionibacteria // *Int. J. Food Microbiol.* 2004. V. 91. P. 253–260.
- Humer E., Schwarz C., Schedle K. Phytate in pig and poultry nutrition // *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl.)* 2015. V. 99. P. 605–625.
- Huyghebaert G., Ducatell R., Van Immerseel F. An update on alternatives to antimicrobial growth promoters for broilers // *Vet. J.* 2011. V. 187. P. 182–188.
- Hyronimus B., Le Marrec C., Hadj Sassi A., Deschamps A. Acid and bile tolerance of spore-forming lactic acid bacteria // *Int. J. Food Microbiol.* 2000. V. 61. P. 193–197.
- Karlsson I., Friberg H., Kolseth A.K., Steinberg C., Persson P. Agricultural factors affecting *Fusarium* communities in wheat kernels // *Int. J. Food Microbiol.* 2017. V. 252. P. 53–60.
- Li Y.B., Xu Q., Huang Z. Effects of *Bacillus subtilis* CGMCC 1.1086 on the growth performance and intestinal microbiota of broilers // *J. Appl. Microbiol.* 2016. V. 120. P. 195–204.
- Mardanov A.M., Hadiyeva G.F., Lutfullin M.T., Khilyas I.V., Minnullina L.F., Gilyazeva A.G., Bogomolnaya L.M., Sharipova M.R. *Bacillus subtilis* strains with antifungal activity against the phytopathogenic fungi // *Agric. Sci.* 2017. V. 8. P. 1–20.
- Mittal A., Singh G., Goyal V., Yadav A., Aneja K.R., Gautam S.K., Aggarwal N.K. Isolation and biochemical characterization of acido-thermophilic extracellular phytase producing bacterial strain for potential application in poultry feed // *J. Microbiol.* 2011. V. 4. P. 273–282.
- Moretti A., Susca A., Mulé G., Loqrieco A.F., Proctor R.H. Molecular biodiversity of mycotoxigenic fungi that threaten food safety // *Int. J. Food Microbiol.* 2013. V. 167. № 1. P. 57–66.
- Mukherjee A., Dutta D., Banerjee S., Ringø E., Breines E.M., Hareide E., Chandra G., Ghosh K. Characterization, pathogen inhibitory activity, partial characterization of bacteriocin and production of exoenzymes // *Res. Vet. Sci.* 2016. V. 108. P. 76–84.
- Oh J.K., Pajarillo E.A.B., Chae J.P., Kim I.H., Yang D.S., Kang D.-K. Effects of *Bacillus subtilis* CSL2 on the composition and functional diversity of the faecal microbiota of broiler chickens challenged with *Salmonella gallinarum* // *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 2017. V. 8. P. 1–9.
- Oldenburg E., Höppner F., Ellner F., Weinert J. *Fusarium* diseases of maize associated with mycotoxin contamination of agricultural products intended to be used for food and feed // *Mycotoxin Res.* 2017. V. 33. P. 167–182.
- Sorokulova I. Modern status and perspectives of *Bacillus* bacteria as probiotics // *Prob. Health.* 2013. V. 1. № 4. P. 1–5.
- Wealleans A.L., Walsh M.C., Romero L.F., Ravindran V. Comparative effects of two multi-enzyme combinations and a *Bacillus* probiotic on growth performance, digestibility of energy and nutrients, disappearance of non-starch polysaccharides, and gut microflora in broiler chickens // *Poult. Sci.* 2017. V. 96. P. 4287–4297.
- Wu L., Wu H.J., Qiao J., Gao X., Borriss R. Novel routes for improving biocontrol activity of *Bacillus* based bioinoculants // *Front. Microbiol.* 2015. V. 6. P. 1395.

New *Bacillus subtilis* Strains as Promising Probiotics**G. F. Khadieva^{1,*}, M. T. Lutfullin¹, N. K. Mochalova¹, O. A. Lenina²,
M. R. Sharipova¹, and A. M. Mardanova¹**¹*Kazan Federal University, Kazan, Russia*²*Arbuzov Institute of Organic and Physical Chemistry, Kazan Scientific Center, Russian Academy of Sciences, Kazan, Russia***e-mail: g.h95@mail.ru*

Received February 14, 2018

Abstract—The properties of new *B. subtilis* strains, GM2 and GM5, isolated from potato rhizosphere and possessing high antimicrobial activity, were investigated and their potential use as probiotics was characterized. Bacterial spores were resistant to bile and a wide pH range of the medium. *B. subtilis* strains GM2 and GM5 were shown to possess proteolytic and phytatehydrolyzing activities and proved to be safe for model animals. The strains were also characterized by antagonistic properties against phytopathogenic micromycetes, as well as against pathogenic and opportunistic enterobacteria. It is concluded that strains of *B. subtilis* GM2 and GM5 are promising for use as probiotics.

Keywords: *Bacillus subtilis* GM2 and GM5, characteristics of strains, proteolytic activity, antimicrobial activity, probiotics

***THERMOSULFURIMONAS MARINA* SP. NOV. – АВТОТРОФНАЯ
СЕРОДИСПРОПОРЦИОНИРУЮЩАЯ
И НИТРАТВОССТАНАВЛИВАЮЩАЯ БАКТЕРИЯ, ВЫДЕЛЕННАЯ
ИЗ МЕЛКОВОДНОЙ МОРСКОЙ ГИДРОТЕРМЫ**

© 2018 г. А. А. Фролова^а, Г. Б. Слободкина^б, Р. В. Баслеров^б,
А. А. Новиков^с, Е. А. Бонч-Осмоловская^а, А. И. Слободкин^{а, *}

^аИнститут микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия

^бИнститут биоинженерии, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия

^сРоссийский государственный университет нефти и газа им. И.М. Губкина, Москва, Россия

*e-mail: aslobodkin@hotmail.com

Поступила в редакцию 21.02.2018 г.

Термофильная анаэробная хемолитоавтотрофная бактерия (штамм SU872^T) выделена из мелководной морской гидротермы острова Кунашир. Клетки штамма SU872^T подвижные, грамтрицательные, овальные или палочковидные, 0.5–0.6 мкм толщиной и 1.5–2.0 мкм длиной, растущие одиночно или парами. Штамм SU872^T растет при температуре от 50 до 79°C (оптимум 74°C), значениях pH от 5.0 до 8.0 (оптимум 6.7–7.0) и концентрации NaCl 1.5–4.5%. Штамм SU872^T способен расти за счет диспропорционирования элементной серы, тиосульфата или сульфита; единственным источником углерода служит CO₂/HCO₃⁻. Рост стимулируется в присутствии ферригидрита (слабокристаллический оксид Fe(III)) в качестве вещества, химически связывающего сульфид. Сульфат не используется в качестве акцептора электронов. Штамм SU872^T также растет с элементной серой, тиосульфатом или сульфитом, но не сульфидом, в качестве донора электронов и нитратом в качестве акцептора электронов, образуя сульфат и аммоний. Анализ нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК штамма SU872^T показал 97.8% сходства с типовым штаммом *Thermosulfurimonas dismutans* S95^T (филум *Thermodesulfobacteria*). По результатам ДНК–ДНК гибридизации уровень сходства геномной ДНК штаммов SU872^T и *T. dismutans* S95^T составил 48%. На основании фенотипических характеристик и данных филогенетического анализа предлагается отнести данный изолят к новому виду рода *Thermosulfurimonas*, как *Thermosulfurimonas marina* sp. nov. с типовым штаммом SU872^T (=DSM 104922^T, =VKM B-3177^T, =UNIQEM SU872^T).

Ключевые слова: термофильные бактерии, анаэробы, автотрофные микроорганизмы, диспропорционирование серы, аммонификация нитрата, *Thermodesulfobacteria*

DOI: 10.1134/S0026365618040080

Микроорганизмы, диспропорционирующие соединения серы (элементная сера, тиосульфат, сульфит), играют заметную роль в биогеохимическом цикле серы современной биосферы и, возможно, участвовали в трансформации серных соединений в ранние эпохи существования Земли (Bak, Sypionka, 1987; Thamdrup et al., 1993; Philippot et al., 2007; Wacey et al., 2011). К настоящему времени описано около 30 видов бактерий, способных получать энергию для роста за счет диспропорционирования соединений серы. Большинство мезофильных серодиспропорционаторов, населяющих пресноводные и морские осадки, содовые озера и антропогенные экосистемы, относятся к классу *Deltaproteobacteria* (Fin-

ster, 2008). Термофильные серодиспропорционирующие микроорганизмы известны среди представителей филумов *Proteobacteria*, *Thermodesulfobacteria* и *Firmicutes*. Местообитаниями этих термофилов являются глубоководные и мелководные морские гидротермы и континентальные горячие источники (Slobodkin et al., 2012, 2013, 2016; Kojima et al., 2016; Slobodkina et al., 2016, 2017b). Шесть из семи описанных термофильных серодиспропорционаторов – облигатные автотрофы; таким образом, эти микроорганизмы могут потенциально выполнять функцию первичных продуцентов органического вещества в термальных экосистемах.

В настоящей работе приводится описание штамма экстремально-термофильного, автотрофного, серодиспропорционирующего микроорганизма, выделенного из мелководной морской гидротермы острова Кунашир, и отнесенного нами к новому виду рода *Thermosulfurimonas*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Источник выделения. Образец донного осадка и гидротермального флюида был отобран из мелководной морской гидротермы, расположенной на глубине 12 м в Охотском море, в 250 м от берега острова Кунашир (Сахалинская обл., РФ). GPS координаты – 44°29.469' N, 146°06.247' E. Температура в месте отбора варьировала от 60 до 84°C, рН составлял 6.0–6.5.

Среды и культивирование. Для выделения и рутинного культивирования штамма SU872^T использовали анаэробную среду морской солёности, содержащую элементную серу (FLAKES sulfur (Aerosol), “Sigma-Aldrich”, 5 г/л) и ферригидрит (слабокристаллический оксид Fe(III), 90 ммоль Fe(III)/л). Среда также содержала микроэлементы и витамины, конечный рН составлял 6.7–6.8. Состав и способы приготовления среды полностью идентичны описанным в статье (Slobodkin et al., 2012). Культивирование проводили в анаэробных пробирках Хангейта объемом 17 мл, заполненных 10 мл среды; газовая фаза CO₂ (100%).

Физиология роста. Определение диапазонов температуры, рН и солёности проводили на среде, применявшейся для выделения. Среды с различными значениями рН создавали путем внесения в отдельные пробирки стерильных растворов 3 N HCl или 5% NaOH; рН измеряли как до внесения инокулята, так и в выросшей культуре. Ввиду значительной буферной емкости среды, изменения рН в процессе роста не превышали ±0.15 ед. Возможность использования органических субстратов проверяли в присутствии дрожжевого экстракта (0.2 г/л). Эксперименты по использованию акцепторов электронов проводили в отсутствие элементной серы или ферригидрита.

Другие методы. Световая и электронная микроскопия, анализ Fe(II), выделение ДНК, определение Г + Ц и ДНК–ДНК-гибридизация проводились по методикам, описанным ранее (Slobodkin et al., 1999). Сульфид и аммоний определялись колориметрически, а сульфат и нитрат – с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии, как описано в статье Слободкиной и соавт. (Slobodkina et al., 2017a). Состав клеточных жирных кислот анализировали методом хромато-масс-спектрометрии (Zhilina et al., 2012).

Филогенетический анализ. Выделение геномной ДНК, амплификация гена 16S рРНК и его секвени-

рование выполняли по методикам, описанным в статьях Слободкиной и соавт. (Slobodkina et al., 2012, 2013). Нуклеотидную последовательность гена собирали из полученных фрагментов длиной 500–800 п.н. с помощью программы BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall, 1999). Сравнение нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК выделенных чистых культур с последовательностями генов 16S рРНК, содержащимися в базе данных GenBank NCBI (Benson et al., 1999), проводили при помощи программ BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, Altschul et al., 1990) или EzTaxon-e server (<http://www.ezbiocloud.net/eztaxon>, Yoon et al., 2017). Выравнивание последовательностей генов 16S рРНК выбранных родственных микроорганизмов проводили с помощью программ CLUSTAL W или MUSCLE, входящих в пакет программ для филогенетического анализа MEGA (Tamura et al., 2013). Этот же пакет программ использовали для построения филогенетических деревьев. Нуклеотидная последовательность гена 16S рРНК штамма SU872^T депонирована в GenBank под номером KY953157.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Получение чистой культуры. Накопительные культуры были получены путем внесения природного образца (около 10% об.) в стерильную анаэробную среду, содержащую элементную серу и ферригидрит. После инкубации накопительных культур при 65°C в течение 7 сут цвет ферригидрита изменился с коричневого на черный, указывая на восстановление Fe(III); сера также изменила цвет с желтого на серый. После трех последовательных пересевов (5% об.) культура была посеяна методом 10-кратных серийных разведений в жидкой среде того же состава. В последнем разведении, показавшем рост (10⁻⁸), наблюдался только один морфологический тип клеток. Десятикратные разведения были повторены еще дважды, и культура, выросшая в последнем разведении, получила обозначение штамм SU872^T. Результаты секвенирования гена 16S рРНК подтвердили чистоту культуры. Попытки получить рост колоний в анаэробных условиях на твердой среде методом roll-tube или в толще 1% Gelrite gellan gum или 1% агара, не привели к положительным результатам.

Характеристики клеток. Клетки штамма SU872^T представляли собой овалы или короткие палочки, 0.5–0.6 мкм толщиной и 1.5–2.0 мкм длиной, растущие одиночно или парами, и были подвижны за счет единичного полярного жгутика (рис. 1а). Образование эндоспор не наблюдалось на протяжении 30 сут культивирования. Ультратонкие срезы выявили, что штамм SU872^T обладает грамтрицательным типом клеточной стенки (рис. 1б).

Физиология роста. Штамм SU872^T рос при температурах от 50 до 79°C, с оптимумом роста при 74°C. Рост не наблюдался при 89°C и выше и при 42°C и ниже, при инкубации в течение 20 сут. Диапазон pH для роста составлял 5.0–8.0 (оптимум 6.7–7.0), роста не отмечалось при pH 4.2 или 8.5. Штамм SU872^T рос при концентрации NaCl в среде от 1.5 до 4.5% (вес/об.); при 1.0 и 5.0% NaCl роста не происходило.

Литоавтотрофный рост. Штамм SU872^T рос литоавтотрофно с элементной серой (5 г/л) в качестве единственного источника энергии и CO₂/HCO₃⁻ в качестве единственного источника углерода. Рост клеток сопровождался диспропорционированием элементной серы с образованием сульфата и сульфида. Рост за счет диспропорционирования был возможен только в присутствии в среде культивирования ферригидрита (слабокристаллический оксид Fe(III)), который химически связывал образующийся сульфид и восстанавливался при этом в черный немагнитный осадок, предположительно гидротроилит (FeS · nH₂O). В этих условиях максимальная плотность клеток через 24–27 ч культивирования составляла 1.0–1.1 × 10⁸ клеток/мл, а время удвоения – 50 мин⁻¹. В присутствии ферригидрита, штамм SU872^T также был способен расти за счет диспропорционирования тиосульфата (10 мМ) или сульфита (5 мМ), образуя сульфат и сульфид. Добавление дрожжевого экстракта (0.2 г/л) не стимулировало рост при диспропорционировании элементной серы, тиосульфата или сульфита. Штамм SU872^T был способен расти литоавтотрофно с элементной серой (5 г/л), тиосульфатом (10 мМ) или сульфитом (5 мМ) в качестве донора электронов и нитратом (10 мМ) в качестве акцептора электронов, образуя сульфат и аммоний в качестве конечных продуктов. Единственным источником углерода, как и при росте за счет диспропорционирования соединений серы, являлся CO₂/HCO₃⁻. При росте с элементной серой и нитратом из 10 ± 0.52 мМ нитрата образовывалось 9.85 ± 0.52 мМ аммония. В этих условиях максимальная плотность клеток через 46–50 ч культивирования составляла 2.0–2.1 × 10⁸ клеток/мл, а время удвоения 8.4 ч. При присутствии ферригидрита в среде культивирования для роста штамма SU872^T за счет восстановления нитрата не требовалось. Количественные определения при росте с сульфитом и тиосульфатом были затруднены тем, что эти соединения частично химически окисляются в присутствии нитрата или ферригидрита. При инкубации неинкулированных контролей с нитратом (10 мМ) при 65°C в течение 7 сут концентрация сульфита уменьшалась приблизительно на 40%, а тиосульфата – на 30%. Однако оставшегося количества

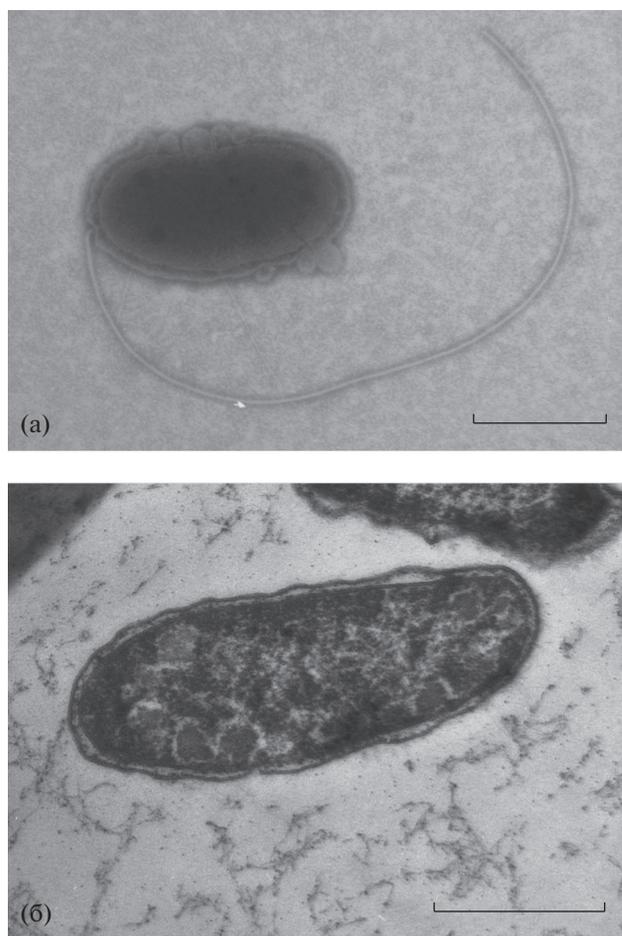


Рис. 1. Электронные микрофотографии штамма SU872^T: а – негативно окрашенные клетки со жгутиком; б – ультратонкие срезы, показывающие тип клеточной стенки. Длина масштабной линейки – 1 мкм.

сульфита и тиосульфата хватало для устойчивого роста штамма SU872^T.

Неиспользуемые доноры и акцепторы электронов. Добавление H₂/CO₂ (80 : 20 об./об. в газовой фазе), формиата, метанола, этанола, н-пропанола, *изо*-пропанола, бутанола, ацетата, пропионата, бутирата, лактата, пирувата, фумарата, сукцината, тартрата, оксалата, цитрата, глицерина, глицина, аланина (каждый субстрат 10 мМ) или пептона (2.5 г/л) в среду, содержащую элементную серу и ферригидрит, не стимулировало рост штамма SU872^T. Штамм SU872^T не рос с тиосульфатом (10 мМ) в качестве акцептора электронов и H₂/CO₂ (80 : 20 об./об. в газовой фазе) в качестве донора электронов. Штамм не сбраживал глюкозу, фруктозу, мальтозу, лактозу, сахарозу, целлобиозу, арабинозу и малат (каждый субстрат 20 мМ). Штамм SU872^T не восстанавливал сульфат, фумарат, Fe(III) цитрат, 9,10-антрахинон 2,6-дисульфонат (каждый субстрат 10 мМ), ферригидрит (90 ммоль Fe(III)/л) и кислород

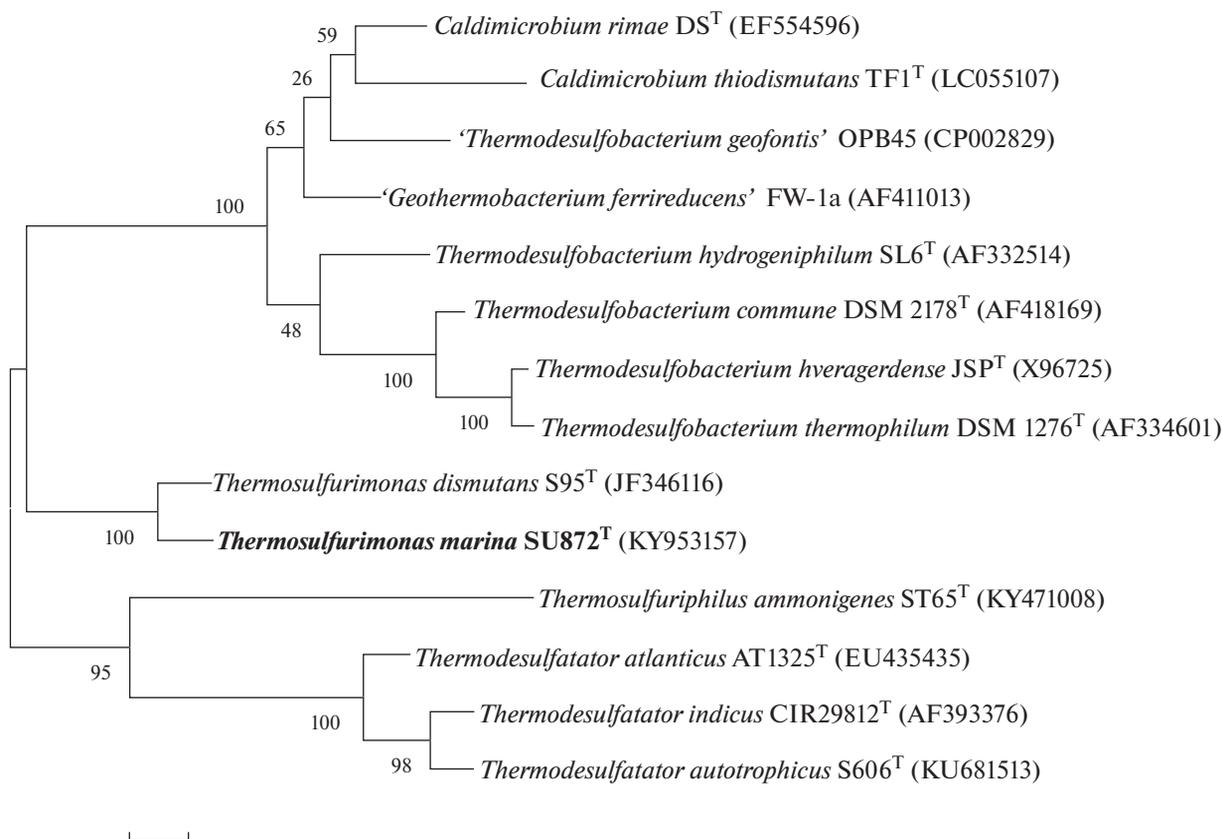


Рис. 2. Филогенетическое дерево, построенное на основании нуклеотидных последовательностей гена 16S рНК, показывающее положение штамма SU872^T и ближайших родственных организмов. Длина масштабной линейки соответствует одной замене на 100 нуклеотидов.

(3.0 или 20% об./об. в газовой фазе) с ацетатом, лактатом, этанолом, пируватом, малатом, пептоном или H₂ в качестве доноров электронов.

Состав клеточных жирных кислот. Клеточные жирные кислоты штамма SU872^T были представлены смесью насыщенных и мононенасыщенных линейных и разветвленных (*изо*- и *антеизо*-) кислот. Основными кислотами являлись *антеизо*-C_{17:0} и C_{18:0} (соответственно, 38.9 и 25.0% от общего количества жирных кислот). В значительном количестве присутствовали C_{17:0} (9.9%), C_{16:0} (9.2%) и *изо*-C_{16:0} (6.1%).

Г + Ц состав и филогенетический анализ. Содержание Г + Ц в геномной ДНК штамма SU872^T составляло 54.9 мол. % (T_m). Сравнение 1537 нуклеотидов гена 16S рНК штамма SU872^T с нуклеотидными последовательностями, депонированными в GenBank, показало 97.8% сходства с геном 16S рНК типового вида рода *Thermosulfurimonas* — *T. dismutans* S95^T (филум *Thermodesulfobacteria*) (рис. 2). По результатам ДНК–ДНК-гибридизации уровень сходства геномной ДНК штаммов SU872^T и *T. dismutans* S95^T составил 48%.

ОБСУЖДЕНИЕ

Штамм SU872^T выделен из мелководной морской гидротермы, расположенной вблизи острова Кунашир. Экологическую зону, в которой находится этот гидротермальный выход, можно классифицировать как талассосублитораль островной дуги. Мелководные морские гидротермы имеют ряд черт, присущих как наземным, так и глубоководным термальным системам; микробные сообщества мелководных морских гидротерм изучены менее подробно, чем глубоководных (Price, Giovannelli, 2017). Интересно, что из той же самой природной пробы недавно был выделен другой термофильный серодиспропорционирующий микроорганизм — *Dissulfurirhabdus thermomarina*, относящийся к классу *Deltaproteobacteria* (Slobodkina et al., 2016). *Dissulfurirhabdus thermomarina* развивается в температурном интервале 25–58°C (оптимум 50°C) и, в отличие от штамма SU872^T, не способен расти за счет восстановления нитрата с использованием соединений серы в качестве донора электронов. Таким образом, штамм SU872^T является первым микроорганизмом, обитающим в мелководных морских гидротермах, для которого показана

Таблица 1. Дифференцирующие характеристики штамма SU872^T и *Thermosulfurimonas dismutans* S95^T

Характеристика	Штамм SU872 ^{T*}	<i>T. dismutans</i> S95 ^{T**}
Местообитание	Мелководная морская гидротерма	Глубоководная морская гидротерма
Диапазоны роста:		
температура, °С (оптимум)	50–79 (74)	50–92 (74)
pH (оптимум)	5.0–8.0 (7.0)	5.5–8.0 (7.0)
концентрация NaCl, % об.	1.5–4.5	1.5–3.5
Рост на H ₂ /S ₂ O ₃ ²⁻	–	+
Содержание Г + Ц (мол. %)	48	52

* Данные настоящего исследования.

** Данные из статьи Slobodkin et al., 2012.

способность к диссимиляционной аммонификации нитрата, идущего с окислением серных соединений, – процесса, недавно обнаруженного у бактерий из глубоководных морских гидротерм (Slobodkina et al., 2017a).

Результаты анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК однозначно определяют штамм SU872^T как представителя рода *Thermosulfurimonas*. К настоящему времени род *Thermosulfurimonas* включает единственный вид – *T. dismutans*, выделенный из глубоководной морской гидротермы, расположенной в срединном центре Лау, Тихий океан (Slobodkin et al., 2012). По своим основным физиологическим свойствам, таким как способность расти за счет диспропорционирования соединений серы или нитратредукции, сопряженной с анаэробным окислением серных соединений, штамм SU872^T сходен с *T. dismutans*. Дифференцирующие характеристики штамма SU872^T и *T. dismutans* представлены в табл. 1. Наиболее заметными отличиями являются неспособность штамма SU872^T к росту с молекулярным водородом в качестве донора электронов и тиосульфатом в качестве акцептора электронов, а также более низкая температурная граница роста. Кроме этого, результаты ДНК–ДНК-гибридизации между штаммами SU872^T и *T. dismutans* S95^T указывают на принадлежность данных микроорганизмов к разным видам. Таким образом, на основании генотипических и фенотипических характеристик мы предлагаем отнести штамм SU872^T к новому виду рода *Thermosulfurimonas* – *Thermosulfurimonas marina* sp. nov.

Описание *Thermosulfurimonas marina* sp. nov.

Thermosulfurimonas marina (ma.ri'na. Лат. жен. прил. морской, относится к месту обитания).

Клетки овальные или палочковидные, 0.5–0.6 мкм толщиной и 1.5–2.0 мкм длиной, растущие одиночно или парами. Подвижны за счет единичного полярного жгутика. Тип клеточной стенки грамотрицательный. Рост при температуре от 50 до 79°C (оптимум 74°C), значениях pH от 5.0 до 8.0 (оптимум 6.7–7.0) и концентрации NaCl 1.5–4.5%. Растет хемолитоавтотрофно за счет диспропорционирования элементной серы, тиосульфата или сульфита с образованием сульфата и сульфида; единственным источником углерода служит CO₂/HCO₃⁻. Рост стимулируется в присутствии ферригидрита (слабокристаллический оксид Fe(III)) в качестве вещества, химически связывающего сульфид. Растет с элементной серой, тиосульфатом или сульфитом в качестве донора электронов и нитратом в качестве акцептора электронов, образуя сульфат и аммоний. Не использует H₂, формиат, метанол, этанол, н-пропанол, *изо*-пропанол, бутанол, ацетат, пропионат, бутират, лактат, пируват, фумарат, сукцинат, тартрат, оксалат, цитрат, глицерин, глицин, аланин и пептон в качестве донора электронов с элементной серой или ферригидритом в качестве акцептора электронов. Не растет с тиосульфатом в качестве акцептора электронов и H₂ в качестве донора электронов. Не сбраживает глюкозу, фруктозу, мальтозу, лактозу, сахарозу, целлобиозу, арабинозу и малат. Не восстанавливает сульфат, ферригидрит, Fe(III) цитрат, фумарат, 9,10-антрахинон 2,6-дисульфонат и кислород (3.0 или 20% об./об. в газовой фазе) с ацетатом, лактатом, этанолом, пируватом, малатом, пептоном и H₂ в качестве доноров электронов.

Типовой штамм SU872^T (=DSM 104922^T, =VKM В-3177^T, =UNIQEM SU872^T) выделен из мелководной морской гидротермы острова Ку-

нашир. Содержание Г + Ц в геномной ДНК 54.9 мол. % (T_m).

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 17-74-30025. Штамм поддерживается в Коллекции уникальных и экстремофильных микроорганизмов различных физиологических групп биотехнологического назначения ("UNIQEM") с присвоением ему каталожного номера SU872^T. Анализ липидов выполнен при поддержке гранта Президента РФ МК-3801.2018.4.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J.* Basic local alignment search tool // *J. Mol. Biol.* 1990. V. 215. P. 403–410.
- Bak F., Cypionka H.* A novel type of energy metabolism involving fermentation of inorganic sulphur compounds // *Nature.* 1987. V. 326. P. 891–892.
- Benson D.A., Boguski M., Lipman D.J., Ostell J., Ouellette B.F., Rapp B.A., Wheeler D.L.* GenBank // *Nucleic Acids Res.* 1999. V. 27. P. 12–17.
- Finster K.* Microbiological disproportionation of inorganic sulfur compounds // *J. Sulfur. Chem.* 2008. V. 29. P. 281–292.
- Hall T.A.* BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98 NT // *Nucleic Acids Symp.* 1999. Ser. 41. P. 95–98.
- Kojima H., Umezawa K., Fukui M.* *Caldimicrobium thiodismutans* sp. nov., a sulfur-disproportionating bacterium isolated from a hot spring, and emended description of the genus *Caldimicrobium* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2016. V. 66. P. 1828–1831.
- Price R.E., Giovannelli D.* A review of the geochemistry and microbiology of marine shallow-water hydrothermal vents // *Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences.* 2017. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409548-9.09523-3>.
- Philippot P., Van Zuilen M., Lepot K., Thomazo C., Farquhar J., Van Kranendonk M.J.* Early Archaean microorganisms preferred elemental sulfur, not sulfate // *Science.* 2007. V. 317. P. 1534–1537.
- Slobodkin A.I., Tourova T.P., Kuznetsov B.B., Kostrikina N.A., Chernyh N.A., Bonch-Osmolovskaya E.A.* *Thermoanaerobacter siderophilus* sp. nov., a novel dissimilatory Fe(III)-reducing, anaerobic, thermophilic bacterium // *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1999. V. 49. P. 1471–1478.
- Slobodkin A.I., Reysenbach A.-L., Slobodkina G.B., Basterov R.V., Kostrikina N.A., Wagner I.D., Bonch-Osmolovskaya E.A.* *Thermosulfurimonas dismutans* gen. nov., sp. nov. a novel extremely thermophilic sulfur-disproportionating bacterium from a deep-sea hydrothermal vent // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2012. V. 62. P. 2565–2571.
- Slobodkin A.I., Reysenbach A.-L., Slobodkina G.B., Kolganova T.V., Kostrikina N.A., Bonch-Osmolovskaya E.A.* *Dissulfuribacter thermophilus* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic autotrophic sulfur-disproportionating deeply branching deltaproteobacterium from a deep-sea hydrothermal vent // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2013. V. 63. P. 1967–1971.
- Slobodkin A.I., Slobodkina G.B., Panteleeva A.N., Chernyh N.A., Novikov A.A., Bonch-Osmolovskaya E.A.* *Dissulfurimicrobi-*
- um hydrothermale* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, autotrophic, sulfur-disproportionating deltaproteobacterium isolated from a hydrothermal pond of Uzon Caldera, Kamchatka // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2016. V. 66. P. 1022–1026.
- Slobodkina G.B., Kolganova T.V., Kostrikina N.A., Bonch-Osmolovskaya E.A., Slobodkin A.I.* *Caloribacterium cisternae* gen. nov., sp. nov., an anaerobic thermophilic bacterium from an underground gas storage // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2012. V. 62. P. 1543–1547.
- Slobodkina G.B., Panteleeva A.N., Kostrikina N.A., Kopitsyn D.S., Bonch-Osmolovskaya E.A., Slobodkin A.I.* *Tepidibacillus fermentans* gen. nov., sp. nov.: a moderately thermophilic anaerobic and microaerophilic bacterium from an underground gas storage // *Extremophiles.* 2013. V. 17. P. 833–839.
- Slobodkina G.B., Kolganova T.V., Kopitsyn D.S., Viryasov M.B., Bonch-Osmolovskaya E.A., Slobodkin A.I.* *Dissulfurirhabdus thermomarina* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, autotrophic, sulfite-reducing and disproportionating deltaproteobacterium isolated from a shallow-sea hydrothermal vent // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2016. V. 66. P. 2515–2519.
- Slobodkina G.B., Mardanov A.V., Ravin N.V., Frolova A.A., Chernyh N.A., Bonch-Osmolovskaya E.A., Slobodkin A.I.* Respiratory ammonification of nitrate coupled to anaerobic oxidation of elemental sulfur in deep-sea autotrophic thermophilic bacteria // *Front. Microbiol.* 2017a. 8:87.
- Slobodkina G.B., Reysenbach A.-L., Kolganova T.V., Novikov A.A., Bonch-Osmolovskaya E.A., Slobodkin A.I.* *Thermosulfuriphilus ammonigenes* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, chemolithoautotrophic bacterium capable of respiratory ammonification of nitrate with elemental sulfur // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2017b. V. 67. P. 3474–3479.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipinski A., Kumar S.* MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0 // *Mol. Biol. Evol.* 2013. V. 30. P. 2725–2729.
- Thamdrup B., Finster K., Hansen J.W., Bak F.* Bacterial disproportionation of elemental sulfur coupled to chemical reduction of iron or manganese // *Appl. Environ. Microbiol.* 1993. V. 59. P. 101–108.
- Wacey D., Kilburn M.R., Saunders M., Cliff J., Brasier M.D.* Microfossils of sulphur-metabolizing cells in 3.4-billion-year-old rocks of Western Australia // *Nat. Geosci.* 2011. V. 4. P. 698–702.
- Yoon S.H., Ha S.M., Kwon S., Lim J., Kim Y., Seo H., Chun J.* Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA and whole genome assemblies // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2017. V. 67. P. 1613–1617.
- Zhilina T.N., Zavarzina D.G., Panteleeva A.N., Osipov G.A., Kostrikina N.A., Tourova T.P., Zavarzin G.A.* *Fuchsiella alkaliacetigena* gen. nov., sp. nov., an alkaliphilic, lithoautotrophic homoacetogen from a soda lake // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2012. V. 62. P. 1666–1673.

***Thermosulfurimonas marina* sp. nov., an Autotrophic Sulfur-Disproportionating and Nitrate-Reducing Bacterium Isolated from a Shallow-Sea Hydrothermal Vent**

A. A. Frolova¹, G. B. Slobodkina¹, R. V. Baslerov², A. A. Novikov³,
E. A. Bonch-Osmolovskaya¹, and A. I. Slobodkin^{1, *}

¹Winogradsky Institute of Microbiology, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

²Institute of Bioengineering, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

³Gubkin Russian State University of Oil and Gas, Moscow, Russia

*e-mail: aslobodkin@hotmail.com

Received February 21, 2018

Abstract—A thermophilic, anaerobic, chemolithoautotrophic bacterium (strain SU872^T) was isolated from a shallow-sea hydrothermal vent at Kunashir Island. The cells were motile, gram-negative, oval or rod-shaped 0.5–0.6 µm thick and 1.5–2.0 µm long, occurring singly or in pairs. Strain SU872^T grew at 50 to 79°C (optimum at 74°C), pH from 5.0 to 8.0 (optimum at 6.7–7.0), and NaCl concentration of 1.5–4.5%. Strain SU872^T was able to grow by disproportionation of elemental sulfur, thiosulfate, or sulfite, with CO₂/HCO₃⁻ as the sole carbon source. Growth was enhanced in the presence of ferrihydrite (poorly crystalline Fe(III) oxide) as a sulfide-scavenging agent. Sulfate was not used as an electron acceptor. Growth also occurred with elemental sulfur, thiosulfate, or sulfite (but not sulfide) as electron donors and nitrate as an electron acceptor, with production of sulfate and ammonium. Analysis of the 16S rRNA gene sequence revealed 97.8% similarity between strain SU872^T and the type strain *Thermosulfurimonas dismutans* S95^T (phylum *Thermodesulfobacteria*). According to the results of DNA–DNA hybridization, the similarity of genomic DNA of the strains SU872^T and *T. dismutans* S95^T was 48%. Based on its phenotypic characteristics and the results of phylogenetic analysis, it is proposed to assign the isolate to a new species of the genus *Thermosulfurimonas*, — *Thermosulfurimonas marina* sp. nov., with the type strain SU872^T (=DSM 104922^T, =VKM B-3177^T, =UNIQEM SU872^T).

Keywords: thermophilic bacteria, anaerobes, autotrophic microorganisms, sulfur disproportionation, nitrate ammonification, *Thermodesulfobacteria*

РАЗНООБРАЗИЕ ЦИАНОБАКТЕРИЙ И ИХ УЧАСТИЕ В ОБРАЗОВАНИИ МИНЕРАЛОВ В ГИДРОТЕРМАХ БАУНТОВСКОЙ ГРУППЫ (БАЙКАЛЬСКАЯ РИФТОВАЯ ЗОНА)

© 2018 г. Д. Д. Цыренова^{a, *}, Д. Д. Бархутова^a, С. П. Бурюхаев^a,
Е. В. Лазарева^b, А. В. Брянская^c, Л. В. Замана^d

^aИнститут общей и экспериментальной биологии СО РАН, Улан-Удэ, Россия

^bИнститут геологии и минералогии СО РАН, Новосибирск, Россия

^cИнститут цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

^dИнститут природных ресурсов, экологии и криологии СО РАН, Чита, Россия

*e-mail: baldanovad@rambler.ru

Поступила в редакцию 30.03.2017 г.

Проведено комплексное исследование воды и цианобактериальных матов в Могойском и Шуриндинском источниках азотных терм (Байкальская рифтовая зона) гидрохимическими, химическими, микробиологическими и минералогическими методами. Дано детальное описание местонахождения источников и выявлены их характерные особенности. По химическому составу источники отнесены к фторидно-гидрокарбонатному (Могойский) и гидрокарбонатно-сульфатному (Шуриндинский) типам с высоким содержанием фтора, что объясняется процессами взаимодействия инфильтрационных вод с вмещающими породами. В исследованных источниках выявлено 7 родов и 14 видов цианобактерий. Развитие цианобактерий в микробных матах наблюдалось на выходах вод при температуре 37.8–76.6°C. В микробных матах исследованных источников доминирует хлорофилл *a*, что указывает на преобладание цианобактерий в составе мата. В микробных матах обнаружено отложение пирита различной формы, целестина (SrSO₄), флюорита (CaF₂), карбоната кальция, самородной серы, барита, аморфного кремнезема.

Ключевые слова: цианобактерии, минералообразование, гидротермы

DOI: 10.1134/S0026365618040171

Изучение азотных термальных вод Байкальской рифтовой зоны (БРЗ) было начато в прошлом столетии, но в основном исследования ограничивались определением их температурных и гидрохимических характеристик (Албагачиева, 1965; Ткачук и соавт., 1957; Ломоносов, 1974; Борисенко, Замана, 1978). В последние десятилетия начались более активные исследования микробиологии и гидрохимии этих источников (Намсараев, 2006; Лазарева и соавт., 2010; Намсараев и соавт., 2011; Плюснин и соавт., 2013; Шварцев и соавт., 2015). Начаты исследования видового разнообразия цианобактериальных сообществ термальных экосистем БРЗ, изучено влияние температуры и других физико-химических факторов на их развитие (Брянская, 2002; Намсараев, 2006; Лазарева и соавт., 2010; Намсараев и соавт., 2011, Цыренова и соавт., 2011). В этой связи представляло интерес исследование ранее детально не изученных из-за труднодоступности гидротерм Баунтовского района Республики Бурятия также относящихся к БРЗ. Это Могойский источник, имеющий максимальные для азотных терм БРЗ температуру и со-

держание фтора, а также высокотемпературный Шуриндинский источник.

На выходе многих термальных источников наблюдается образование карбонатной (травертиновой) постройки, которую связывают непосредственно с деятельностью микробного сообщества (Татаринов и соавт., 2005). Кроме аккумуляции отдельных элементов, микроорганизмы создают благоприятные условия для биогенного осаждения таких минералов, как карбонаты, сульфаты, фосфаты, силикаты. При этом вследствие сдвига карбонатного равновесия, цианобактерии вносят наибольший вклад в осаждение карбонатов кальция (Орлеанский, Герасименко, 1982; Заварзин, 2002; Chafetz et al., 1991). Ранее участие микроорганизмов в минералообразовании исследовалось в термальных источниках Японии (Tazaki et al., 1995), Йеллоустона (Guidry, Chafetz, 2003), Южного Китая (Peng et al., 2007), Камчатки (Лазарева и соавт., 2012) и др. Также было изучено минералообразование в цианобактериальных матах щелочных гидротерм Баргузинской впадины (Брян-

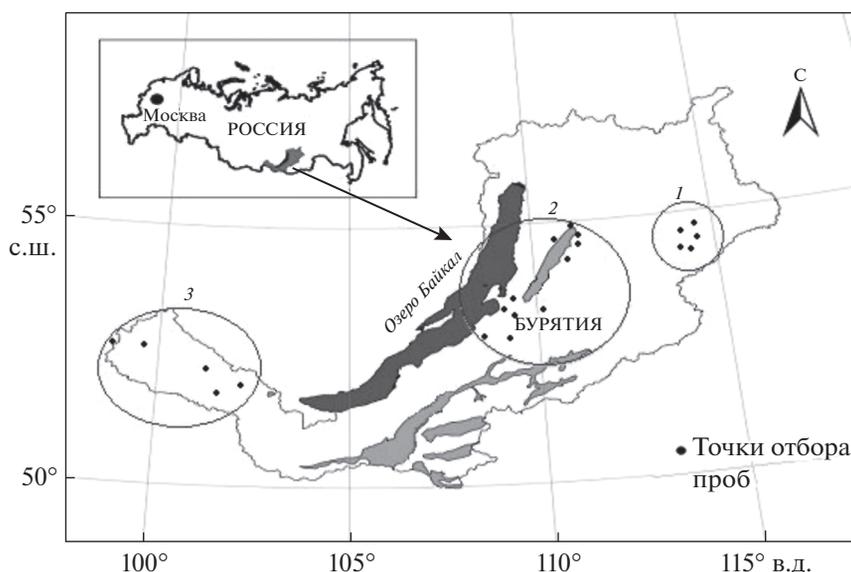


Рис. 1. Карта Байкальской рифтовой зоны с указанием основных гидротерм Бурятии: 1 – гидротермы Баунтовской группы; 2 – гидротермы Баргузинской долины; 3 – гидротермы Восточных Саян.

ская и соавт., 2006; Лазарева и соавт., 2010; Цыренова и соавт., 2013; Будагаева и соавт., 2014), и видовое разнообразие цианобактериальных сообществ экосистем Байкальской рифтовой зоны (Брянская, 2002; Намсараев, 2006; Цыренова и соавт., 2011). Исследования рассматриваемых термальных источников не только расширят данные по биологическому разнообразию и физико-химическим условиям развития цианобактериальных сообществ, но и дадут новые сведения по экстремофильному биогенному минералообразованию.

Исходя из этого, целью данной работы являлось изучение видового разнообразия цианобактерий в азотных термах Могойского и Шуриндинского источников, входящих в Баунтовскую группу (Замана, Аскарлов, 2010), и определение их роли в минералообразовании.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В ноябре 2009 г. из источников Могойский и Шуриндинский, расположенных в бассейне р. Ципа Баунтовского района Республики Бурятия, были отобраны пробы для гидрохимического и микробиологического анализа (рис. 1).

Могойский источник ($55^{\circ}28.436'$ с.ш., $113^{\circ}26.337'$ в.д.) расположен на левобережной террасе р. Могой. В литературе он описан также как Ципинский, Уакитский, Францевский (Ткачук и соавт., 1957). Последнее название принято среди местного населения. Источник представляет собой термальное поле с многочисленными (около 40) выходами, сгруппированными в две полосы субширотного простирания, разделенные невы-

соким (до 1 м) песчано-гравийным куполом. Самые высокотемпературные струи находятся между полосами ближе к западной части поля, в двух термы непрерывно и интенсивно газифицируются. Сток из них направлен в противоположные стороны в термальные ручьи с расходами 20–25 и 50–60 л/с, соответственно, в северном и южном потоках. Общая протяженность термального поля 170–180 м при ширине до 100 м. Максимальная температура источника оказалась выше известной по литературным данным – 83.7°C против $81–82^{\circ}\text{C}$ (Борисенко, Замана, 1978).

Для источника характерны обильные бактериальные образования в виде многослойных лежащих на грунте или прикрепленных к берегам ручьев матов зеленого, белого, бурого, коричневого цветов с полупрозрачным студенистым нижним слоем. В выходе с температурой 76.6°C наблюдались не встречавшиеся на других выходах грязно-серые нитчатые образования, одним концом прикрепленные к грунту, свободно плавающие в потоке. В другом выходе с температурой 65.3°C также наблюдали необычные нитевидные образования бурого цвета.

Пробы воды, микробных матов и донных отложений были отобраны на 5 станциях непосредственно на выходах термальных вод (Мог 1–5). Максимальная температура воды (83.7°C) отмечена на станции Мог 1, температура воды источника на других станциях уменьшается до 37.8°C .

Шуриндинский источник ($55^{\circ}13.565'$ с.ш., $113^{\circ}30.743'$ в.д.) представлен многочисленными выходами в русле р. Горячая правобережного притока р. Ципа в ее приустьевой части. Русло и

береговые уступы реки сложены полевошпатовыми песками с гравием. Общая протяженность площадки, на которой разгружаются термальные воды, составляет 0,8–1,0 км. Температура в исследованных выходах изменялась от 41,6 до 70,6°C. В отдельных выходах источника образовался черный ил и илистый песок с запахом сероводорода. Общий расход источника 35–40 л/с. Пробы воды, микробных матов и донных отложений были отобраны на 3 станциях также на выходах термальных вод (Shur 1–3). На станции Shur 1 температура воды составила 70,6°C; вниз по ручью она понижалась до 57°C.

Температура воды в источниках измерялась термометром Checktemp 1 (“Hanna Instruments”), рН – портативным потенциометром (рН-Meter CG 837), окислительно-восстановительный потенциал – портативным измерителем редокс-потенциала ORP (Португалия). Общая минерализация рассчитывалась по сумме основных ионов. Пробы воды, микробных матов, донных осадков и илов отбирали в стерильные емкости. В лабораторных условиях пробы хранили при температуре 10°C.

Основной ионный, макро- и микроэлементный состав вод определяли в сертифицированной лаборатории ИПРЭК СО РАН. Содержание основных катионов, Fe, Sr и Ba определяли атомно-абсорбционным методом на спектрофотометре SOLAAR-6M (Германия) в ацетиленовом пламени и с электротермической атомизацией (ГОСТ 31870-2012), фтора и хлора – потенциометрически с применением ионоселективных электродов, HCO_3^- и CO_3^{2-} – потенциометрическим титрованием, SO_4^{2-} – турбидиметрическим (РД 52.24.360-2008), кремния, форм азота и фосфора – спектрофотометрическими методами (ПНД Ф 14.1:264.215-06, 14.1:2.1-95, 14.1:2.4.3-95, 14.1:2.4.4-95, 14.1:2.106:4.215-06). Для определения сероводорода пробы на месте консервировали 2% раствором ацетата цинка. На гидросульфид-ион пробы анализировали фотометрическим методом с N,N' -диметил-*n*-фенилдиамином (микроколичество) (метод 8131 НАСН Lange) или потенциометрически (макроколичество) (ГОСТ 22387.2-2014) с предварительной фиксацией антиоксидантным буфером (смесь трилона Б с аскорбиновой кислотой и едким натром). Приборы калибровались по стандартным образцам.

Определение таксономической принадлежности цианобактерий на основании морфологических признаков проводили по Еленкину, Голлербаху (Еленкин, 1949; Голлербах и соавт., 1953). Микроскопирование проб осуществляли при помощи световых микроскопов Axiostar Plus и Axioskop 2 Plus (“Carl Zeiss, Германия”).

Хлорофилла *a* экстрагировали по стандартной методике (Чербарджи, 1973). Концентрации пиг-

мента рассчитаны по формуле, предложенной в статье Намсараева (2009). Численность цианобактерий определяли по методу Гензена подсчитыванием клеток в капле воды объемом 0,1 мл в десяти полях зрения (Нетрусов и соавт., 2005). Пробы микробных матов для исследования состава и микроморфологии минералов упаковывали с сохранением структуры, затем в лабораторных условиях разделяли на слои и сушили. Изучение состава минеральных фаз проводили при помощи сканирующего электронного микроскопа Leo Oxford 1430VP (Германия) в Институте геологии и минералогии СО РАН.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

По результатам химико-аналитических исследований изученные источники относятся к фторидно-гидрокарбонатному (ист. Могойский) и гидрокарбонатно-сульфатному типам (ист. Шуриндинский). По величине рН воды источников щелочные (8,85 в ист. Могойский при температуре воды 83,7°C, 8,88 в ист. Шуриндинский при температуре воды 67,0°C). Минерализация ист. Могойский составляет 406 мг/дм³, ист. Шуриндинский чуть выше – 570 мг/дм³. В большинстве случаев на выходах термальные воды имели восстановительный Eh – в ист. Могойский –230 мВ, –35 мВ в ист. Шуриндинский, что определялось концентрацией сероводорода (до 14,5 мг/дм³ в ист. Могойский и 7,9 мг/дм³ в ист. Шуриндинский) (Замана и соавт., 2010). В катионном составе доминировал ион натрия (115,3–124,5 мг/дм³), в анионом – гидрокарбонат- (140,4–180,0 мг/дм³) или сульфат-ион (136,0–175,0 мг/дм³) (табл. 1). Полученные данные по содержанию фтора в термах Могойского источника (26,4–27,0 мг/дм³) подтверждают установленные ранее значения – до 26,7 мг/дм³ (Ломоносов, 1974). Высокие концентрации фтора в источниках объясняются одними исследователями частичным поступлением с глубинными флюидами (Алексеев, 1956; Ломоносов, 1974; Сафронов и соавт., 1998), другими – процессами взаимодействия инфильтрационных вод с вмещающими породами (Посохов, 1957; Шварцев и соавт., 2015). Мы разделяем точку зрения последних и рассматривали высокое содержание фтора в термах как следствие замещения его группой OH^- в темноцветных минералах, в особенности слюдах, – основных носителях фтора в алюмосиликатных породах, и гидролиза этих минералов. В обычных для термальных вод БРЗ количествах обнаружен Sr (490–1650 мкг/дм³). Концентрация кремния колебалась в пределах 28,9–49,6 мг/дм³. Содержание P, Fe и Ba было незначительно (табл. 1).

В рассматриваемых источниках наблюдалось интенсивное развитие цианобактериальных матов.

Таблица 1. Химические компоненты воды азотных терм Баунтовской группы (в мг/дм³, Fe, Ba – мкг/дм³)

Компонент/ Станция	ист. Могойский					ист. Шуриндинский		
	Mog 1	Mog 2	Mog 3	Mog 4	Mog 5	Shur 1	Shur 2	Shur 3
T, °C	83.7	76.6	65.3	46.4	37.8	70.6	67.0	57.0
Na ⁺	124.3	115.3	120.7	121.9	124.5	178.5	178.5	155.5
K ⁺	4.11	4.16	4.27	4.16	4.03	4.20	4.33	4.06
Ca ²⁺	2.12	2.13	2.14	2.38	2.24	6.14	5.73	5.18
Mg ²⁺	0.12	0.12	0.11	0.11	0.11	0.15	0.12	0.13
NH ₄ ⁺	2.70	2.25	2.50	0.23	0.12	0.10	0.10	<0.10
HCO ₃ ⁻	180.0	180.0	177.0	170.9	143.4	143.4	143.4	140.4
CO ₃ ²⁻	15.0	9.0	13.5	9.0	12.0	9.0	9.0	3.0
SO ₄ ²⁻	32.8	30.0	40.4	57.5	81.5	175.0	171.0	136.0
HS ⁻	13.2	14.5	8.2	11.8	0.20	7.9	0.03	0.13
Cl ⁻	23.9	15.5	14.6	14.0	12.5	42.0	39.6	38.1
F ⁻	24.9	24.9	25.4	27.0	25.0	19.0	19.5	17.0
NO ₃ ⁻	0.80	1.08	0.78	1.08	0.90	0.86	0.90	0.98
Si	46.2	49.6	45.0	46.9	43.3	28.9	29.4	28.7
Sr	1.24	0.53	0.51	0.53	0.49	0.25	1.35	1.65
P	0.062	0.050	0.055	0.070	0.055	0.062	0.062	0.058
Fe	29.3	26.9	35.5	23.1	32.9	51.7	46.2	46.5
Ba	8.0	11.0	10.0	11.0	10.0	2.1	8.4	9.1

Они характеризовались многослойной структурой различной окраски – от зеленого, бурого до коричневого цвета. Располагались маты на грунте или были прикреплены к берегам ручьев. В источнике Могойский микробные маты обнаружены на протяжении всего термального поля, температурный диапазон которого варьировал от 37.8°C вплоть до 83.7°C. Однако структура микробных матов различалась. При высоких значениях температуры (76.6°C) развивались маты ярко-зеленого цвета, толщиной 1–2 мм. При понижении температуры (37.8–65.3°C) обнаружены микробные маты зеленого цвета, покрытые белым налетом. Их толщина достигала 1 см. В Шуриндинском источнике микробные маты были обнаружены на всех трех станциях с температурным диапазоном 57.0–70.6°C. При повышении температуры изменялась структура мата и уменьшалась его толщина. Данные маты имели различную толщину (0.1–2.0 см) и характеризовались большим разнообразием цианобактерий (рис. 2). Всего на обоих источниках выявлены представители 7 ро-

дов и 14 видов цианобактерий (табл. 2). Наибольшим количеством видов представлен род *Phormidium* (7 видов).

В источнике Могойский обнаружено 5 представителей рода *Phormidium*, 2 вида рода *Synechococcus*, единично представлены роды *Gloeocapsa*, *Microcystis*, и *Nostoc*. Наиболее часто встречаемыми видами являлись *Synechococcus elongates*, *Synechococcus cedrorum*, *Phormidium angustissimum* и *Ph. valderiae*. Наиболее богатым по видовому составу была проба со станции Mog 4 (9 видов) с температурой воды 46.4°C, что оптимально для развития цианобактерий. При дальнейшем повышении или понижении температуры разнообразие уменьшалось. В выходе с температурой 65.3°C (Mog 3), где наблюдались необычные нитевидные образования бурого цвета, цианобактерии были представлены 6-ю видами. В выходе с температурой 76.6°C, где наблюдались не встречавшиеся в других источниках грязно-серые нитчатые образования, разнообразие цианобактерий состояло всего из 3 видов.

По сравнению с источником Могойский, в ист. Шуриндинский видовое разнообразие цианобактерий было меньше. Характерным обитателем источника Шуриндинский являлся *Phormidium valderiae*, обнаруженный на всех станциях. В данном источнике наблюдается определенная зависимость развития цианобактерий от температуры. Наибольшее количество видов (5) отмечено на станции Shur 1 с температурой воды 57.0°C. При увеличении температуры воды видовое разнообразие заметно уменьшалось. На ст. Shur 2 при повышении температуры на 10°C разнообразие цианобактерий сократилось до 3 видов и было представлено только нитчатыми формами.

Таким образом, исследованные источники характеризуются достаточно богатым видовым разнообразием цианобактерий. Температура воды источников является одним из основных факторов, влияющих на формирование и развитие цианобактериального сообщества. Развитие цианобактерий в микробных матах наблюдалось в ручье по изливу термальных вод при температуре 37.8–76.6°C. В данном диапазоне развиваются как нитчатые, так и одноклеточные виды. При увеличении температуры разнообразие цианобактерий уменьшается, преобладают нитчатые формы.

В экстрактах из проб цианобактериальных матов исследованных источников было определено содержание хлорофилла *a* (рис. 3). Оно составляло 18.58–437.16 мкг/см². Его максимальная концентрация зафиксирована в источнике Могойский (ст. Mog 4), где отмечено наибольшее разнообразие

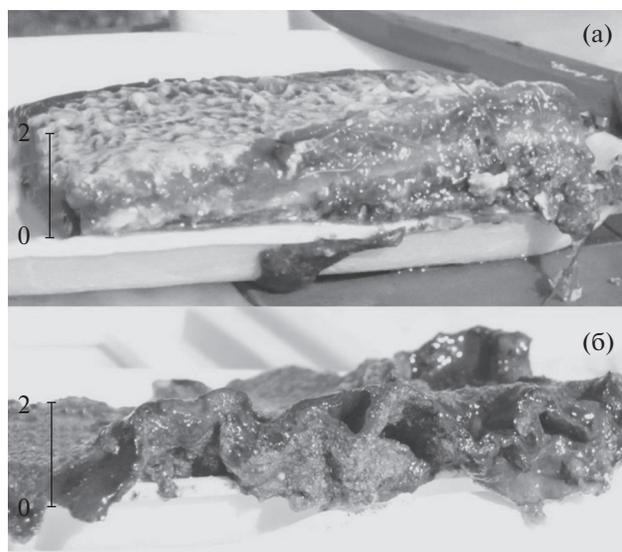


Рис. 2. Фото микробных матов источников Баунтовской группы (масштаб соответствует 2 см): мат ист. Могойский (а); мат ист. Шуриндинский (б).

цианобактерий (9 видов). Максимальное значение их численности было равным 123.42 млн кл./мл. Минимальное содержание хлорофилла *a* выявлено в микробных матах станции Mog 5, где также было отмечено наименьшие значения численности (32.56 млн кл./мл), но богатый видовой состав цианобактерий (6 видов). Это можно объяснить тем, что в видовом составе Mog 5 преобладают од-

Таблица 2. Таксономический спектр цианобактерий азотных терм Баунтовской группы

Таксон/Станция	Mog 2	Mog 3	Mog 4	Mog 5	Shur 1	Shur 2	Shur 3
Температура, °C	76.6	65.3	46.4	37.8	70.6	67.0	57.0
pH	8.88	8.92	8.86	8.92	8.87	8.88	8.62
<i>Borzia</i> sp.							+
<i>Gloeocapsa bituminosa</i>		+	+	+			
<i>G. magma</i>					+		
<i>Microcystis pulvereae</i>		+	+	+			
<i>Nostoc</i> sp.				+			
<i>Phormidium angustissimum</i>	+		+		+	+	
<i>Ph. valderiae</i>		+	+	+	+	+	+
<i>Ph. laminosum</i>		+	+	+			
<i>Ph. fragile</i>					+	+	
<i>Phormidium</i> sp.			+				
<i>Phormidium</i> sp. 2	+		+	+			
<i>Synechococcus elongates</i>	+	+	+				
<i>S. cedrorum</i>		+	+				
<i>S. minuscule</i>					+		
Всего	3	6	9	6	5	3	2

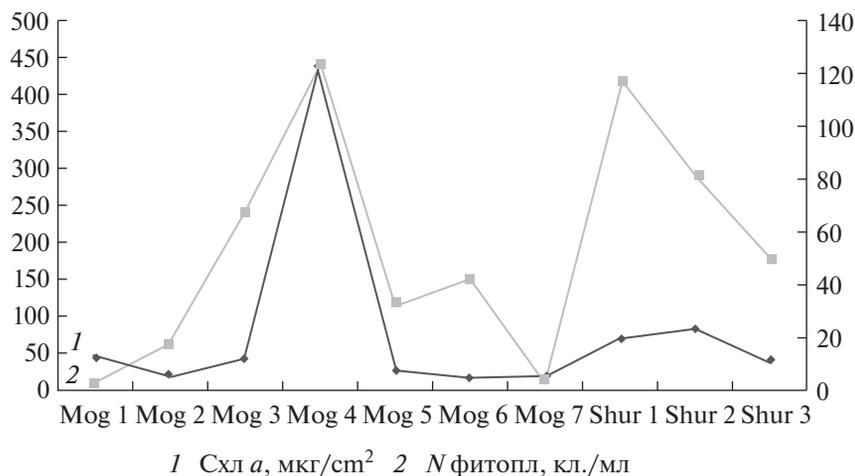


Рис. 3. Биологические характеристики источников: 1 – концентрация хлорофилла *a*, мкг/см²; 2 – общая численность фитопланктона (цианобактерий, диатомовых и зеленых водорослей), кл./мл.

ноклеточные цианобактерии, которые в меньшей степени вносят вклад в биомассу и, тем самым, в количество хлорофилла *a*.

Микробный мат источника Шуридинский также характеризовался высокой концентрацией хлорофилла *a* (40.97–85.89 мкг/см²). Максимум зарегистрирован на станции Shur 2, где отмечена высокая численность фототрофных бактерий (81.76 млн кл./мл).

Таким образом, содержание хлорофилла *a* в гидротермах Могойского и Шуридинского источников (18.5–437.0 мкг/м²) сравнимо с аналогичными данными, полученными для микробных матов соле-

ных озер и гиперсоленых лагун (до 551 мкг хл *a*/м²) (Brock, 1967; Castenholz, 1969; Цыренова и соавт., 2010).

В изученных микробных сообществах источников Могойский и Шуридинский было обнаружено отложение различных минералов: пирита различной формы, целестина (SrSO₄), флюорита (CaF₂), кальцита, самородной серы, аморфного кремнезема, барита.

Пирит наблюдался в образцах микробных матов всех станций ист. Шуридинский, который характеризуется высоким содержанием сероводорода в растворе (рис. 4г). Пирит наблюдался как в виде одиночных кубических и кубооктаэдрических кристаллов размером 1–3 мкм (рис. 4а, 4б), так и в виде фрамбоидов от 10 до 20 мкм в поперечнике (рис. 4в). Размеры кубооктаэдрических или октаэдрических отдельных кристаллов, составляющих фрамбоиды, варьировали от 1 до 3 мкм. Поскольку Шундинский источник в растворе содержит сероводород, то вполне возможно гидрохимическое осаждение пирита из раствора. Но фрамбоиды пирита, скорее всего, формируются в результате деятельности сульфатредуцирующих бактерий (Bernier, 1970); биогенное происхождение фрамбоидов в осадках и/или микробных сообществах было надежно доказано изотопными методами (Pora et al., 2004). Необходимо отметить, что зачастую микроморфология выделений пирита, формирующихся в результате микробиологической деятельности, ничем не отличается от той, что образуется в результате абиотического отложения (Lowenstam, 1981).

Целестин (SrSO₄) обнаружен среди одноклеточных цианобактерий *Synechococcus elongates* источника Могойский (Mog 3, 65.3°C) в виде выделений неправильной формы, размеры которых не

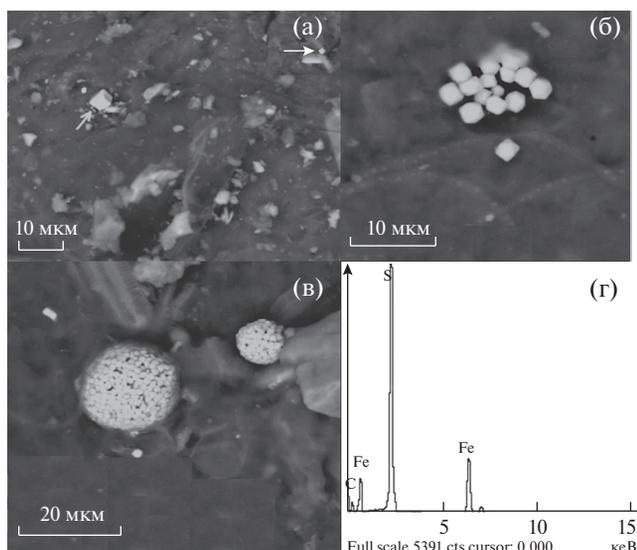


Рис. 4. Формы выделения пирита в микробных сообществах: кристаллы кубической формы (а); кристаллы кубооктаэдрической формы (б); фрамбоиды (в); состав (г).

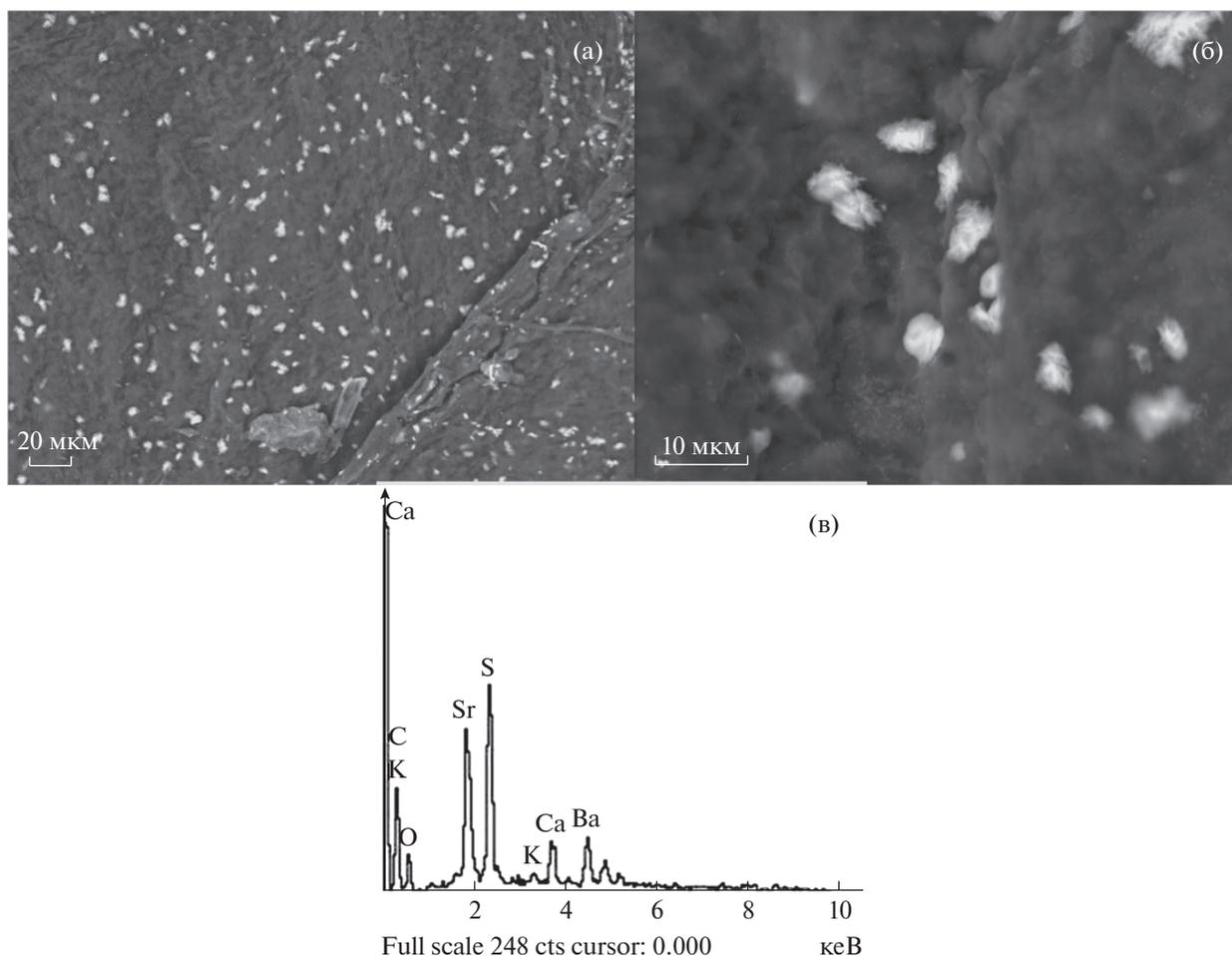


Рис. 5. Выделения целестина (SrSO_4) (а, б) и их состав (в).

превышают 5 мкм (рис. 5). Выделения сульфата стронция имеют значительную примесь бария (до 2.17%). Целестин, как биоминерал, используется некоторыми видами радиолярий (*Acantharia* — морские планктонные организмы) для построения скелета; организмы значительно влияют на цикл Sr в морских системах (Lowenstam, 1981). Достаточно много имеется свидетельств отложения карбоната Sr микроорганизмами (Anderson, Arranna, 1994; Thorpe et al., 2012). Интерес для современных технологий представляют микроорганизмы и инициированные ими процессы, приводящие к связыванию стронция (Thorpe et al., 2014). Причиной такого внимания является искусственный радионуклид Sr^{90} , присутствующий в окружающей среде, местами в очень высоких концентрациях, и легко проникающий в трофические цепи. В последние годы появляются сведения об отложении также и сульфата Sr в результате деятельности микроорганизмов (Krejci et al., 2011). Причем, организмы способны не только осаждать сульфаты бария и стронция, но и разделять элементы между собой. На данном этапе ис-

следований, к сожалению, невозможно с уверенностью утверждать, что целестин образовался в микробном сообществе Могойского источника именно в результате деятельности микроорганизмов, но также нет достоверных доказательств того, что отложение минерала происходило только гидрохимическим путем. Одинаковые форма и размеры выделений говорят об одновременном отложении всех выделений целестина. Остается открытым вопрос — что явилось центрами кристаллизации для этих зерен? Целестин обнаружен только в определенных местах, притом, что концентрации Sr и SO_4^{2-} в растворе во всех местах наблюдений были очень близки (табл. 1), за исключением наиболее высокотемпературной точки (Mog 1). Следовательно, благоприятные условия для отложения минерала складываются локально, что и дает возможность предполагать участие микробного сообщества в его образовании.

Карбонат кальция и флюорита (CaF_2). Среди нитей цианобактерий в микробном сообществе ист. Шурудинский (Shur 2, 67.0°C) наблюдалось

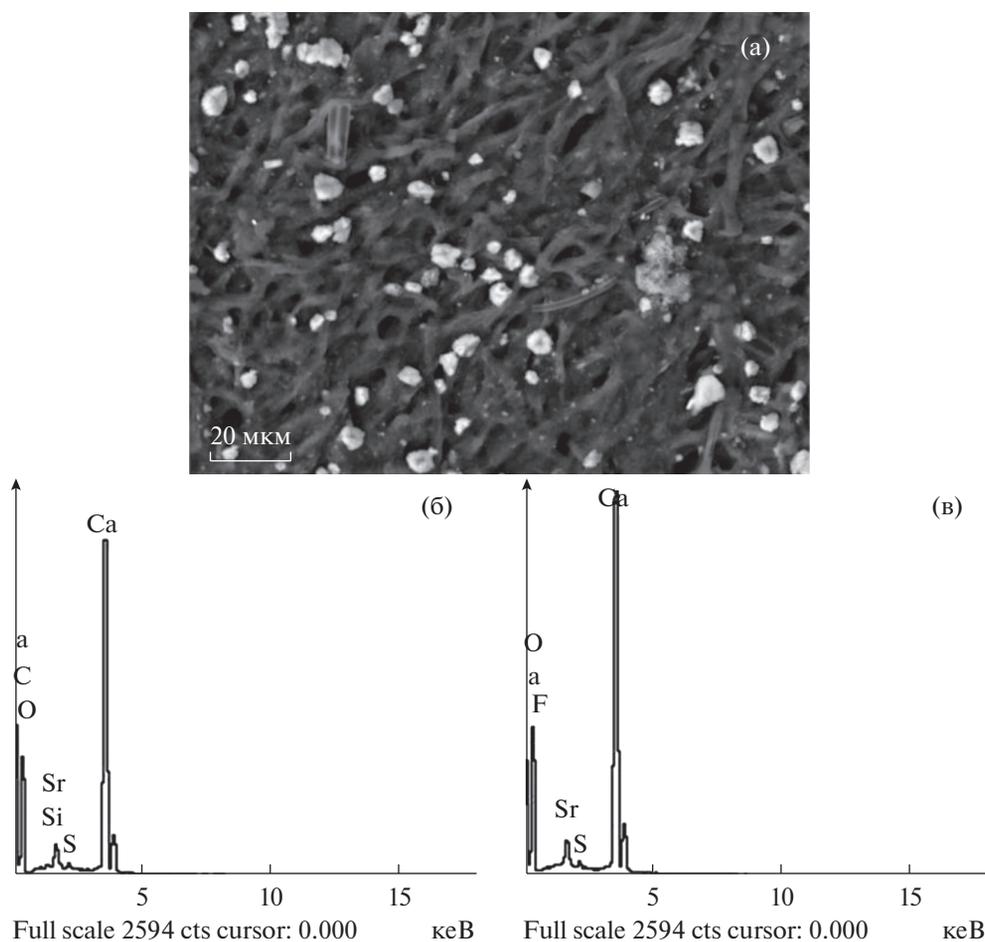


Рис. 6. Срастания карбоната кальция и флюорита (CaF_2) с примесями стронция (а) и состав образований (б, в).

массовое отложение образований таблитчатой формы, не превышающих 8 мкм (рис. 6а). По результатам анализа эти выделения могут являться срастанием карбоната кальция и флюорита. Выделения имеют значительную примесь стронция (11.38%) (рис. 6б, 6в). Встречаются также шарообразные субмикронные выделения аналогичного состава в ист. Могойский среди обломочного материала и на чехлах одноклеточных бактерий (рис. 7). Кальцит и арагонит являются одними из самых распространенных минералов, формирующихся в живых организмах и живыми организмами (Lowenstam, 1981; Ehrlich, 2010). Флюорит также используется некоторыми организмами (рыбы, моллюски). Авторам не известны случаи отложения флюорита в результате деятельности микроорганизмов.

Возможность отложения флюорита из термального раствора определяется содержаниями фтора и кальция и зависит от температуры, что отражено на рис. 10. Коэффициенты насыщения для флюорита (отношение произведений концентраций к произведению растворимости) в

растворе станций Mog 1 и Mog 2 Могойского источника ниже 1.0 (0.82 и 0.89), в растворе станций Mog 3–5 – значительно выше (1.87–1.83), в растворе источника Шуриндинский (Shur 1–3) имеют промежуточное значение (1.19–1.65). Следовательно, насыщение по флюориту в изучаемых системах достигается, что подтверждает возможность гидротермального образования минерала.

Кремнезем встречался во всех источниках как в виде створок диатомовых водорослей и псевдоморфоз облекания (чехлов) по нитям цианобактерий (рис. 8а), так и в виде натечных образований на поверхности микробного сообщества (рис. 8б).

Самородная сера в большом количестве обнаружена в ист. Могойский в сообществах, где присутствуют серные бактерии. Ромбические хорошо ограненные кристаллы серы не превышают 10 мкм в поперечнике (рис. 9).

В микробных сообществах помимо образованных здесь минералов и соединений наблюдается значительное количество обломочного материала, отражающего состав вмещающих пород (кварц, по-

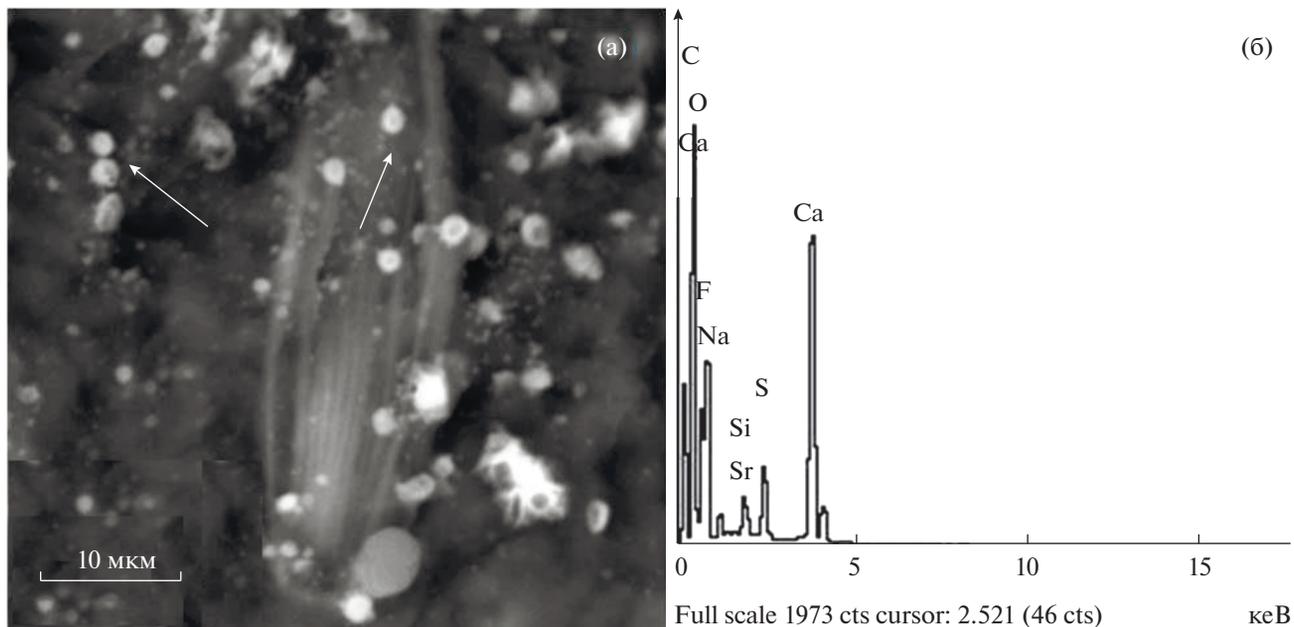


Рис. 7. Шарообразные выделения (а) (указаны стрелками), по составу напоминающие сростания карбоната кальция и флюорита (б).

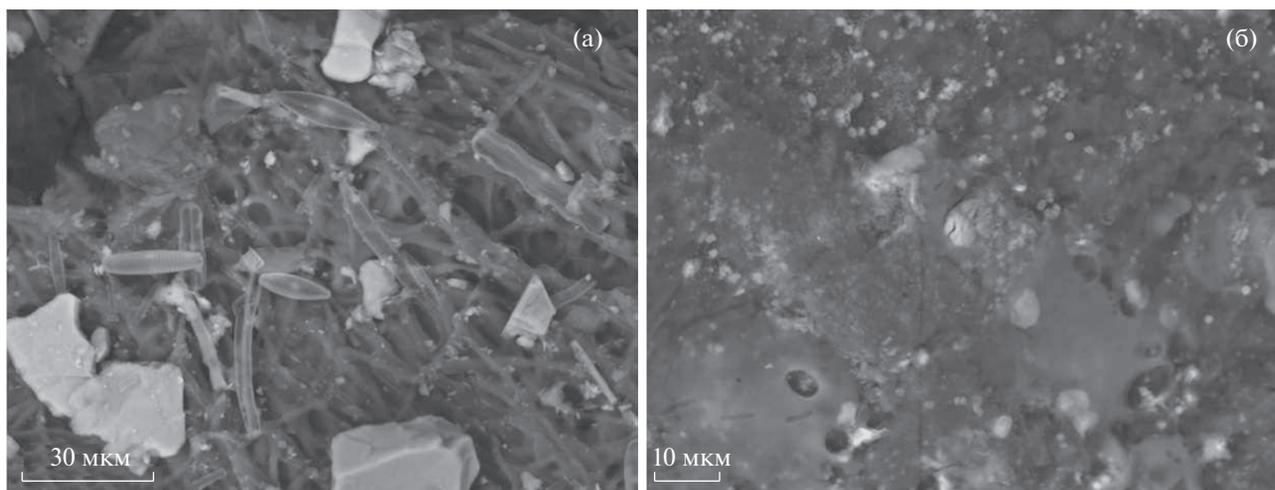


Рис. 8. Створки диатомовых водорослей и псевдоморфозы облекания (чехлы) кремнезема по нитям цианобактерий (а); натечный кремнезем на поверхности микробного сообщества (б).

левой шпат и т.д.), агломератов источника (кальцит, кремнезем, барит).

В результате проведенных исследований было выявлено, что воды источников Баунтовской группы Шуриндинский и Могойский являются слабоминерализованными, щелочными, относятся к фторидно-гидрокарбонатному и гидрокарбонатно-сульфатному типам и характеризуются высоким содержанием фтора. Для данных источников впервые были изучены цианобактериальные сообщества, которые характеризовались богатым видовым составом. Всего выявлено

7 родов и 14 видов. В источнике Могойский наиболее встречаемыми видами являлись *Synechococcus elongates*, *Synechococcus cedrorum*, *Phormidium angustissimum* и *Ph. valderiae*. Доминирующим видом в источнике Шуриндинский был *Ph. valderiae*. Температура и pH воды источников являются одними из основных факторов, влияющих на формирование и развитие цианобактериального сообщества (Юрков и соавт., 1991; Намсараев, 2006; Намсараев и соавт., 2011). В ист. Могойский оптимальный рост цианобактерий был отмечен при температуре 46.4°C и pH 8.86 (станция

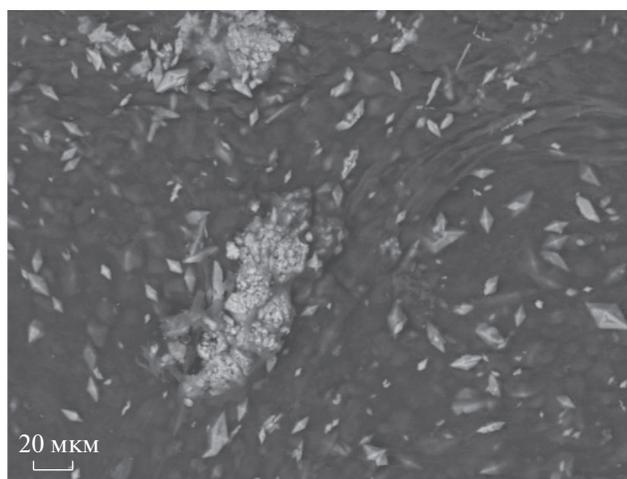


Рис. 9. Кристаллы самородной серы в микробном сообществе ист. Могойский.

Мог 4). При дальнейшем уменьшении или увеличении данных параметров количество цианобактерий сокращалось (табл. 2). В ист. Шуриндинский развитие цианобактерий выявлено при максимальном значении температуры (70.6°C) и pH 8.87. При дальнейшем уменьшении температуры видовое разнообразие сокращалось. Следовательно, температура в данных источниках является лимитирующим фактором в формировании и развитии цианобактериального сообщества. В микробных матах исследованных источников доминирует хлорофилл *a*, что указывает на преобладание цианобактерий в составе мата.

В изученных микробных сообществах было обнаружено отложение различных минералов. Некоторые из них, безусловно, имеют биогенную природу или являются биогенными с большой долей вероятности – кремнезем створок диатомовых водорослей, кристаллы самородной серы, фрамбоидальный пирит. Отложение пирита установлено в микробных сообществах тех станций наблюдения, где содержание H_2S в растворе было достаточно высоким ($8\text{--}15\text{ мг/дм}^3$, табл. 1). Пирит формируется в основном в микробных матах, сложенных нитчатými цианобактериями. Сера в микробном сообществе откладывается в достаточном количестве, приводя к развитию белых серных матов. Аморфный кремнезем отлагается из термального раствора и приводит к окремнению цианобактерий – формированию чехлов. По флюориту индексы насыщения (отношение произведений концентраций к произведению растворимости) по пробам 1 и 2 Могойского источника меньше 1.0 (0.82 и 0.89), точки располагаются ниже линии ПР при соответствующих температурах (рис. 10). По трем другим пробам Могойского и по Шуриндинскому источнику индексы насыщения больше 1.0 (1.87–1.83 и 1.19–1.65 соответственно), что указывает на термодинамическую возможность гидротермального образования флюорита. Произведения растворимости флюорита при разных температурах рассчитаны ранее (Замана, 2000). Наибольший интерес вызывают отложения целестина в сообществе с преобладанием одноклеточных цианобактерий. Сообщества Могойского источника достойны более подробного изучения с целью выявления организмов, способных к связыванию стронция.

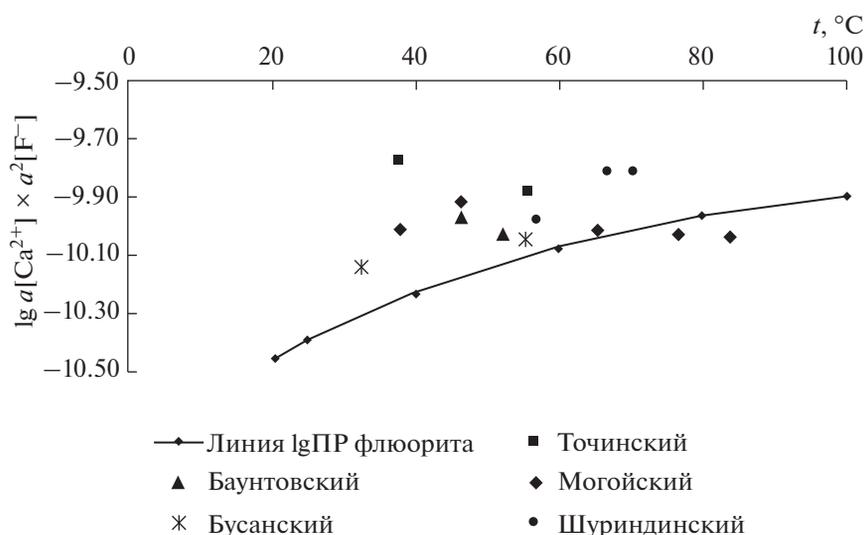


Рис. 10. Соотношение произведений растворимости флюорита и молярных концентраций фтора и кальция в Баунтовских термах.

Работа выполнена в рамках госзадания (№ госрегистрации АААА-А17-117011810034-9, № 0386-2015-0006 и № 0330-216-0011). Определение состава и микроморфологии минералов проведено в “ЦКП Многоэлементных и изотопных исследований СО РАН”. Авторы глубоко признательны Б.Б. Намсараеву за помощь в организации исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Албагачиева В.А.* Условия формирования источников типа акратотерм в Северном Забайкалье. М.: Недра. 1965. 80 с.
- Алексеев А.А.* Фтор в акратотермах // Геохимия. 1956. № 4. С. 58–61.
- Борисенко И.М., Замана Л.В.* Минеральные воды Бурятской АССР. Улан-Удэ: Бурят. изд-во, 1978. 164 с.
- Брянская А.В.* Влияние экологических условий на видовое разнообразие и функциональную активность цианобактерий водоемов Южного Забайкалья. Автореферат дис. ... канд. биол. наук, 10.05.2002. Улан-Удэ: БГУ, 2002. 22 с.
- Брянская А.В., Намсараев З.Б., Калашникова О.М., Бархутова Д.Д., Намсараев Б.Б., Горленко В.М.* Процессы в альгобактериальных матах щелочного термального Уринского источника // Микробиология. 2006. Т. 75. № 5. С. 702–717.
- Bryanskaya A.V., Namsaraev Z.B., Kalashnikova O.M., Barkhutova D.D., Namsaraev B.B., Gorlenko V.M.* Biogeochemical processes in the algal-bacterial mats of the Urinskii alkaline hot spring // Microbiology (Moscow). 2006. V. 75. № 5. P. 611–620.
- Будагаева В.Г., Бархутова Д.Д., Доржиева С.Г.* Минералообразование в микробных матах термальных источников Байкальской рифтовой зоны // Вестник БГУ. 2014. Вып. 3. Сер.: Химия. Физика. С. 65–68.
- Голлербах М.М., Косинская Е.К., Полянский В.И.* Определитель пресноводных водорослей СССР. М.: Советская наука, 1953. Вып. 2. 398 с.
- ГОСТ 31870-2012. Вода питьевая. Определение содержания элементов методами атомной спектрометрии. М.: Стандартинформ, 2013. С. 48.
- ГОСТ 22387.2-2014. Газы горючие природные. Методы определения сероводорода и меркаптановой серы. М.: Стандартинформ, 2015. С. 78.
- Еленкин А.А.* Синезеленые водоросли СССР. Специальная часть. М.-Л.: Изд-во АН СССР, 1949. Вып. 2. С. 990.
- Заварзин Г.А.* Микробный геохимический цикл кальция // Микробиология. 2002. Т. 71. № 1. С. 5–22.
- Zavarzin G.A.* Microbial geochemical calcium cycle // Microbiology. 2002. V. 71. № 1. P. 5–22.
- Замана Л.В.* Кальциевые минеральные равновесия азотных терм Байкальской рифтовой зоны // Геохимия. 2000. № 11. С. 1159–1164.
- Zamana L.V.* Calcium mineral equilibria of nitrogen-bearing springs of the rift zone of lake Baikal // Geochemistry Internat. 2000. V. 38. P. 1059–1064.
- Замана Л.В., Аскаргов Ш.А., Борзенко С.В., Чудаев О.В., Брагин И.В.* Изотопы сульфидной и сульфатной серы в азотных термах Баунтовской группы (Байкальская рифтовая зона) // ДАН. 2010. Т. 435. № 3. С. 369–371.
- Zamana L.V., Askarov Sh.A., Borzenko S.V., Chudaev O.V., Bragin I.V.* Isotopes of sulfide and sulfate sulfur in nitrogen hot springs of the Bauntov group (Baikal rift zone) // Doklady Earth Sci. 2010. V. 435. Part 1. P. 1520–1522. doi 10.1134/S1028334X10110231
- Лазарева Е.В., Анисимова Н.С., Брянская А.В., Огородникова О.Л., Жмодик С.М.* Особенности минералообразования в микробных сообществах, развивающихся по изливу источника Термофильный (кальдера Узон, Камчатка) // Труды Кроноцкого государственного биосферного заповедника. Вып. 2. / Отв. ред. Мосолов В.И. Петропавловск-Камчатский: Камчатпресс, 2012. С. 143–156.
- Лазарева Е.В., Брянская А.В., Жмодик С.М., Смирнов С.З., Пестунова О.П., Бархутова Д.Д., Полякова Е.В.* Минералообразование в циано-бактериальных матах щелочных гидротерм Баргузинской впадины Байкальской рифтовой зоны // ДАН. 2010. Т. 430. № 5. С. 675–680.
- Lazareva E.V., Bryanskaya A.V., Zhmodik S.M., Smirnov S.Z., Pestunova O.P., Barkhutova D.D., Polyakova E.V.* Mineral formation in cyanobacterial mats of the Barguzin basin alkaline hot springs (Baikal rift zone) // Doklady Earth Sci. 2010. Vol. 430. № 2. P. 218–222.
- Ломоносов И.С.* Геохимия и формирование современных гидротерм Байкальской рифтовой зоны. Новосибирск: Наука, 1974. 168 с.
- Намсараев З.Б.* Использование коэффициентов поглощения для расчета концентрации хлорофиллов и бактериохлорофиллов // Микробиология. 2009. Т. 78. № 6. С. 836–839.
- Namsaraev Z.B.* Application of extinction coefficients for quantification of chlorophylls and bacteriochlorophylls // Microbiology (Moscow). 2009. V. 78. P. 794–797.
- Намсараев З.Б.* Микробные сообщества щелочных гидротерм / Отв. ред. Вайнштейн М.В. Новосибирск: Издательство СО РАН, 2006. 111 с.
- Намсараев Б.Б., Бархутова Д.Д., Данилова Э.В., Брянская А.В., Бурюхаев С.П., Гармаев Е.Ж., Горленко В.М., Дагурова О.П., Дамбаев В.Б., Зайцева С.В., Замана Л.В., Зякун А.М., Лаврентьева Е.В., Намсараев З.Б., Плюснин А.М., Татаринцев А.В., Турунхаев А.В., Хахинов В.В., Цыренова Д.Д., Ялович Л.И.* Геохимическая деятельность микроорганизмов гидротерм Байкальской рифтовой зоны. Новосибирск: Академическое изд-во “Гео”, 2011. 302 с.
- Нетрусов А.И.* Практикум по микробиологии. Учебное пособие для студентов высш. учеб. заведений / Нетрусов А.И., Егорова М.А., Захарчук Л.М. и др.; Под ред. Нетрусова А.И. М.: Издательский центр “Академия”, 2005. 607 с.

- Орлеанский В. К., Герасименко Л. М. Лабораторное моделирование термофильного циано-бактериального сообщества // Микробиология. 1982. Т. 51. № 4. С. 538–542.
- Плюснин А. М., Замана Л. В., Шварцев С. Л., Токаренко О. Г., Чернявский М. К. Гидрогеохимические особенности состава азотных терм Байкальской рифтовой зоны // Геология и геофизика. 2013. Т. 54. № 54. С. 647–664.
- Plyusnin A. M., Chernyavskii M. K., Zamana L. V., Shvartsev S. L., Tokarenko O. G. 20438591" Hydrogeochemical peculiarities of the composition of nitric thermal waters in the Baikal Rift Zone Russian // Geology and Geophysics. 2013. V. 54. № 5. P. 495–508.
- ПНД Ф 14.1:2.1-95. Методика допущена для целей государственного экологического контроля. М., 1995. (издание 2004 г.). С. 13.
- ПНД Ф 14.1:264.215-06, 14.1:2:4.3-95, 14.1:2:4.4-95, 14.1:2:4.4-95. Количественный химический анализ вод. Методика выполнения измерений массовой концентрации кремнекислоты в пересчете на кремний в пробах природных, сточных вод фотометрическим методом. М., 2006. С. 18.
- ПНД Ф 14.1:2:4.215-06. Количественный химический анализ вод. Методика измерений массовой концентрации кремнекислоты (в пересчете на кремний) в питьевых, поверхностных и сточных водах фотометрическим методом в виде желтой кремнемолибденовой гетерополиокислоты, М. 2006 г. (издание 2011 г.). С. 22.
- Посохов Е. В. По поводу статьи А. А. Алексева “Фтор в акратотермах” // Геохимия. 1957. № 4. С. 346–347.
- РД 52.24.360-2008. Массовая концентрация фторидов в водах. Методика выполнения измерений потенциометрическим методом с ионселективным электродом. Росгидромет. Ростов-на-Дону: ГУ ГХИ, 2008. С. 29.
- Сафронов Ю. Г., Знаменский В. С., Похвиснева Е. А. и др. Распространенность, состав и условия разгрузки современных гидротерм Байкало-Чарской рифтовой и Курило-Камчатской островодужной областей // Глобальные изменения природной среды. Новосибирск: Изд-во СО РАН. НИЦ ОГГМ, 1998. С. 177–190.
- Татаринев А. В., Ялович Л. И., Намсараев З. Б., Плюснин А. М., Константинова К. К., Жмодик С. М. Роль бактериальных матов в петрогенезе и образовании рудных минералов травертинов азотных гидротерм Байкальской рифтовой зоны // ДАН. 2005. Т. 403. № 5. С. 678–681.
- Tatarinov A. V., Yalovik L. I., Namsaraev Z. B., Plyusnin A. M., Konstantinova K. K., Zhmodik S. M. Role of bacterial mats in the formation of rocks and ore minerals in travertines of nitric hydrothermal springs in the Baikal rift zone // Doklady Earth Sci. 2005. V. 403. № 6. P. 939–942.
- Ткачук В. Г., Ясницкая Н. В., Анкудинова Г. А. Минеральные воды Бурят-Монгольской АССР. Иркутск: Вост.-Сиб. изд-во, 1957. 153 с.
- Цыренова Д. Д., Бархутова Д. Д., Лазарева Е. В., Брянская А. В. Минералообразование в цианобактериальном мате источника Горячинск // Вестник БГУ. 2013. С. 43–48.
- Цыренова Д. Д., Брянская А. В., Намсараев З. Б., Намсараев Б. Б., Акимов В. Н. Таксономическая и экологическая характеристика цианобактерий некоторых солоноватых и соленых озер Южного Забайкалья // Микробиология. 2011. Т. 80. № 2. С. 230–240.
- Tsyrenova D. D., Bryanskaya A. V., Namsaraev Z. B., Akimov V. N. Taxonomic and ecological characterization of cyanobacteria from some brackish and saline lakes of Southern Transbaikalian Region // Microbiology (Moscow). 2011. V. 80. P. 216–227.
- Цыренова Д. Д., Данилова Э. В., Хахинов В. В. Влияние физико-химических условий на распространение цианобактерий в термальном источнике Хойто-Гол (Восточные Саяны) // Вестник БГУ. 2010. Вып. 3. Сер.: Химия. Физика. С. 16–19.
- Чербарджи И. И. Методы химического анализа в гидробиологических исследованиях. 1973. С. 103–111.
- Шварцев С. Л., Замана Л. В., Плюснин А. М., Токаренко О. Г. Равновесие азотных терм Байкальской рифтовой зоны с минералами водовмещающих пород как новая научная база выявления механизмов их формирования // Геохимия. 2015. № 8. С. 720–733.
- Shvartsev S. L., Zamana L. V., Plyusnin A. M., Tokarenko O. G. Equilibrium of nitrogen-rich spring waters of the Baikal rift zone with host rock minerals as a basis for determining mechanisms of their formation // Geochemistry Internat. 2015. V. 53. P. 713–725.
- Юрков В. В., Горленко В. М., Митюшина Л. Л., Старынин Д. А. Влияние лимитирующих факторов на структуру фототрофных сообществ в Большереченских термальных источниках // Микробиология. 1991. Т. 60. Вып. 6. С. 129–138.
- Anderson S., Appanna V. D. Microbial formation of crystalline strontium carbonate // FEMS Microbiol. Lett. 1994. V. 116. P. 43–48.
- Berner R. A. Sedimentary pyrite formation // Am. J. Sci. 1970. V. 268. P. 1–23.
- Brock T. D. Relationship between standing crop and primary productivity along a hot spring thermal gradient // Ecology. 1967. V. 48. P. 566–571.
- Castenholz R. W. Thermophilic blue-green algae and the thermal environment // Bacteriol. Reviews. 1969. V. 33. P. 476–504.
- Chafetz H. S., Rush P. F., Utech N. M. Microenvironmental controls on mineralogy and habit of CaCO₃ precipitates: an example from an active travertine system // Sedimentology. 1991. V. 38. P. 107–126.
- Guidry S. A., Chafetz H. S. Anatomy of siliceous hot springs: examples from Yellowstone National Park, Wyoming, USA // Sedimentary Geol. 2003. 157. P. 71–106.
- Ehrlich H. Biominerals // Biological Materials of Marine Origin. Springer Netherlands, 2010. P. 133–152.
- Krejci M. R., Wasserman B., Finney L., McNulty I., Legnini D., Vogt S., Joester D. Selectivity in biomineralization of barium and strontium // J. Structural Biol. 2011. V. 176. P. 192–202.
- Lowenstam H. A. Minerals formed by organisms // Science. 1981. V. 211. P. 1126–1139.

Popa R., Kinkle B.K., Badescu A. Pyrite framboids as biomarkers for iron-sulfur systems // *Geomicrobiol. J.* 2004. V. 21. P. 193–206.

Peng X.T., Zhou H.Y., Wu Z.J., Jiang L., Tang S., Yao H.Q., and Chen G.Q. Biomineralization of phototrophic microbes in silica-enriched springs in South China // *Chinese Sci. Bull.* 2007. V. 52. P. 367–379.

Tazaki K., Hattori T., Oka M., Iizumi S. Electron microscopic observation of biomineralization in biomats from hot springs // *J. Geol. Soc. Japan.* 1995. V. 101. P. 304–314.

Thorpe C.L., Lloyd J.R., Law G.T., Burke I.T., Shaw S., Bryan N.D., Morris K. Strontium sorption and precipitation behavior during bioreduction in nitrate impacted sediments // *Chem. Geol.* 2012. V. 306. P. 114–122.

Thorpe C.L., Boothman C., Lloyd J.R., Law G.T., Bryan N.D., Atherton N., Morris K. The interactions of strontium and technetium with Fe(II) bearing biominerals: Implications for bioremediation of radioactively contaminated land // *Appl. Geochem.* 2014. V. 40. P. 135–143.

Cyanobacterial Diversity and the Role of Cyanobacteria in Formation of Minerals in the Baunt Group Hydrotherms (Baikal Rift Zone)

D. D. Tsyrenova^{1,*}, D. D. Barkhutova¹, S. P. Burykhaev¹, E. V. Lazareva²,
A. V. Bryanskaya³, and L. V. Zamana⁴

¹*Institute of General and Experimental Biology, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Ulan-Ude, Russia*

²*Institute of Geology and Mineralogy, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia*

³*Institute of Cytology and Genetics, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia*

⁴*Institute of Natural Resources, Ecology and Cryology, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Chita, Russia*

*e-mail: baldanovad@rambler.ru

Received March 30, 2017

Abstract—A comprehensive research of water and cyanobacterial mats in Mogoysky and Shurindinsky thermal springs (Baikal rift zone) was carried out by hydrochemical, chemical, microbiological, and mineralogical methods. Detailed description of the springs location and their characteristics were given. According to their chemical composition, the springs were classified as fluoride-bicarbonate (Mogoysky) and bicarbonate-sulfate (Shurindinsky) types with a high concentration of fluorine. This is explained by the interaction of infiltration waters with embedding rocks. A wide diversity of cyanobacteria (14 species of 7 genera) was revealed in the investigated springs. The development of cyanobacteria in microbial mats was observed at water outflows at the temperatures of 37.8 to 76.6°C. Chlorophyll *a* was the predominant pigment in microbial mats of the studied springs, indicating predominance of cyanobacteria in the mat. Deposition of various pyrite forms, celestite (SrSO₄), fluorite (CaF₂), calcium carbonate, elemental sulfur, barite, and amorphous silica was found in microbial mats.

Keywords: cyanobacteria, mineral formation, hydrotherms

СРАВНЕНИЕ РАЗНООБРАЗИЯ И ФУНКЦИЙ ЭПИФИТНЫХ БАКТЕРИЙ КУЛЬТУРНЫХ И СОРНЫХ РАСТЕНИЙ В АГРОЦЕНОЗЕ

© 2018 г. Т. Г. Добровольская^а, *, К. А. Хуснетдинова^а,
Н. А. Манучарова^а, **, А. В. Якушев^а, Т. И. Хуснетдинова^а
^аМосковский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Россия

*e-mail: dobrtata@mail.ru,

**e-mail: manucharova@mail.ru

Поступила в редакцию 09.10.2017 г.

Проведено сравнение разнообразия эпифитных бактериальных комплексов культурных и сорных растений на основании подсчета частоты доминирования таксонов бактерий в этих сообществах и использования метода главных компонент. Установлено наличие как общих доминантов на культурных и сорных растениях, так и четких различий между составом эпифитных бактериальных комплексов этих растений. Только на сорных растениях обнаружены представители хемолитотрофных бактерий, способных усваивать тетраионаты и тиосульфаты. Установлено, что антибиотическая активность бактерий, выделенных из сорных растений, почти в 2 раза превышает выявленную для бактерий культурных растений. Полученные данные свидетельствуют в пользу положительного эффекта бактериальных сообществ сорных растений, позволяющих защитить культурные растения от фитопатогенов.

Ключевые слова: культурные и сорные растения, эпифитные сообщества, функции бактерий, антибиотическая активность

DOI: 10.1134/S0026365618040055

На современном этапе развития научного земледелия парадигма борьбы с сорными растениями сменяется парадигмой управления сорным компонентом агрофитоценоза. Необходимость разработки научных и практических основ управления сорным компонентом агрофитоценоза весьма убедительно обоснована в книге А.В. Захаренко “Теоретические основы управления сорным компонентом агрофитоценоза в системах земледелия” (Захаренко, 2000). Автор высказывает точку зрения, согласно которой сорные растения играют определенную положительную роль в формировании и развитии эколого-энергетических взаимоотношений в агрофитоценозах. Сорные растения увеличивают биоразнообразие агрофитоценоза, тем самым возрастает его устойчивость. При этом если по составу микробных сообществ культурных растений существует множество работ, то по сорным растениям — единичные. Обзор сведений в этой области дан в наших предыдущих работах (Добровольская и соавт., 2012, 2016, 2017; Хуснетдинова, 2017).

Целью настоящих исследований является сравнение состава и функций эпифитных бактерий культурных и сорных растений в исследуемом агроценозе.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объекты исследования. Исследования проводились в Солнечногорском районе Московской области на территории Учебно-опытного почвенно-экологического центра МГУ им. М.В. Ломоносова “Чашниково”. Объекты исследований — культурные и сорные растения, а также дерново-подзолистая почва под растениями. Из культурных растений для исследования были взяты: картофель сорта “Брянский деликатес”, морковь посевная (*Daucus carota* subsp. *sativus*), свекла обыкновенная (*Beta vulgaris*), овес посевной (*Avena sativa* L.), вика посевная (*Vicia sativa* L.), горох посевной (*Pisum sativum*), которые произрастали на дерново-подзолистой хорошо окультуренной среднесуглинистой почве. Из сорных растений исследовали пастушью сумку обыкновенную (*Capsella bursa-pastoris*), лебеду раскидистую (*Atriplex patula*), пикульник обыкновенный (*Galeopsis tetrahit*), осот полевой (*Sonchus arvensis*), подмаренник настоящий (*Galium verum*), сурепку обыкновенную (*Barbarea vulgaris*), сныть обыкновенную (*Aegopodium podagraria*), расторопшу пятнистую (*Silybum marianum*). Все сорные растения относятся к апофитам (растения местной флоры, которые перешли из естественной среды обитания на территории, измененные хозяйственной деятель-

ностью человека: пашни, пастбища). Образцы культурных и сорных растений были отобраны на разных стадиях развития растений: всходы, период цветения/образование метелок, стадия созревания корнеплодов, бобов (культурные растения), стадия созревания семян (сорные растения). Одни и те же виды сорняков были взяты с края поля, с середины поля и в смешанном лесу. Анализировали листья, цветки, корни, семена и корнеплоды растений.

Микроорганизмы предварительно десорбировали из различных органов растений и почв с помощью Вортекса.

Численность бактериального комплекса исследовали методом посевов, которые проводили в пятикратной повторности из разведений 10^{-5} – 10^{-8} на глюкозо-пептонно-дрожжевую среду, в которую вносили 50 мг нистатина для ингибирования роста грибов. Культивирование проводили в течение 7–10 сут при комнатной температуре. После подсчета общего числа колоний и предварительной микроскопии из большинства колоний готовили препараты и просматривали их в световом микроскопе с фазово-контрастным устройством. Основных представителей всех групп выделяли в чистую культуру. Морфологические признаки изучали у молодых (24 ч) и 3–5-сут культур. Численность бактерий выражали в колониеобразующих единицах на г субстрата (КОЕ/г). Родовую принадлежность выделенных бактерий устанавливали на основании морфологических, культуральных и хемотаксономических признаков (Определитель бактерий Берджи, 1997; Лысак и соавт., 2003).

Определение таксономического состава доминирующих культур бактерий проводили молекулярно-биологическими методом ПЦР-диагностики при выделении ДНК из клеток чистых культур. Для экстрагирования тотальной ДНК из образцов наземных экосистем (листья, подстилки и почвы) и ДНК из чистых культур микроорганизмов применяли стандартные методики Power Soil DNA Isolation Kit (“MO BIO”, США), руководствуясь инструкциями производителя.

Выбор олигонуклеотидных праймеров и амплификация ДНК. Для амплификации филогенетических фрагментов генов, кодирующих 16S рРНК, путем полимеразной цепной реакции (ПЦР) в большинстве экспериментов были использованы универсальные праймерные системы (11F-1492Re) (Manucharova et al., 2014).

Для предварительного анализа полученных нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК использовали программное обеспечение баз данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Анализ и выравнивание последовательностей осуществляли с помощью программы BioEdit (<http://jwbrown.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>).

Антибиотическую активность бактериальных культур определяли общепринятым методом агаровых блоков. В качестве тест-культур фитопатогенных бактерий использовали *Pseudomonas syringae*, *Clavibacter michiganensis* и *Rathayebacter tritici*. *Ps. syringae* вызывает бурое слизетечение, обморожения, повреждения плодов и пятнистость листьев, *C. michiganensis* вызывает заболевание, которое проявляется как увядание и некрозы на стеблях, листьях и плодах во время цветения растений. *R. tritici* вызывает желтый слизистый бактериоз пшеницы.

Для анализа физиологического разнообразия бактерий гидролитического блока использовали комплексный структурно-функциональный метод (Якушев, 2015).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Состав бактериальных сообществ культурных и сорных растений. Ранее нами были опубликованы работы по динамике численности и структуры бактериальных сообществ разных органов культурных и сорных растений, объектов нашего исследования. В настоящей статье мы приводим результаты сравнительных анализов. На основании подсчета частоты доминирования разных бактериальных таксонов (рис. 1, 2) было установлено, что большинство микробных доминантов на всех видах культурных и сорных растений являлись общими и были представлены артробактером, миксобактериями, цитофагами, бациллами. В то же время есть и четкие различия. Если у сельскохозяйственных культур первое место по частоте доминирования составляли актинобактерии рода *Arthrobacter* (40%), то у сорных растений – бактерии рода *Sphingobacterium* (50%). Кроме того, энтеробактерии (роды *Pantoea* и *Erwinia*) доминировали только на овощных культурах. У сорных растений энтеробактерии рода *Pantoea* были выделены лишь из цветков сурепки. С другой стороны, на разных органах сорных растений были обнаружены в качестве доминантов представители таких родов бактерий, как *Micrococcus* и *Paracoccus*, которые не встречались на культурных растениях. Только из сорных растений были выделены хемолитотрофные бактерии рода *Advenella*, способные использовать тетрационаты и тиосульфаты, а так же представители близкого к псевдомонадам рода *Stenotrophomonas*.

Методом главных компонент удалось подтвердить четкие различия в таксономической структуре микробных сообществ культурных и сорных растений (рис. 3).

Следует обратить внимание на общее число бактериальных таксонов, идентифицированных нами как фенотипическими, так и молекулярно-биологическими методами. Представители всех

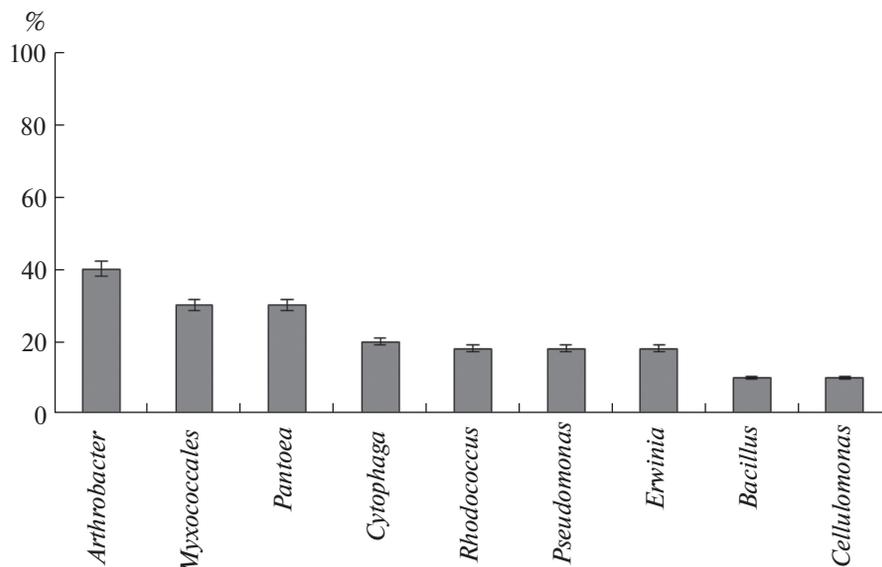


Рис. 1. Частота доминирования бактерий разных таксонов на листьях и корнях культурных растений.

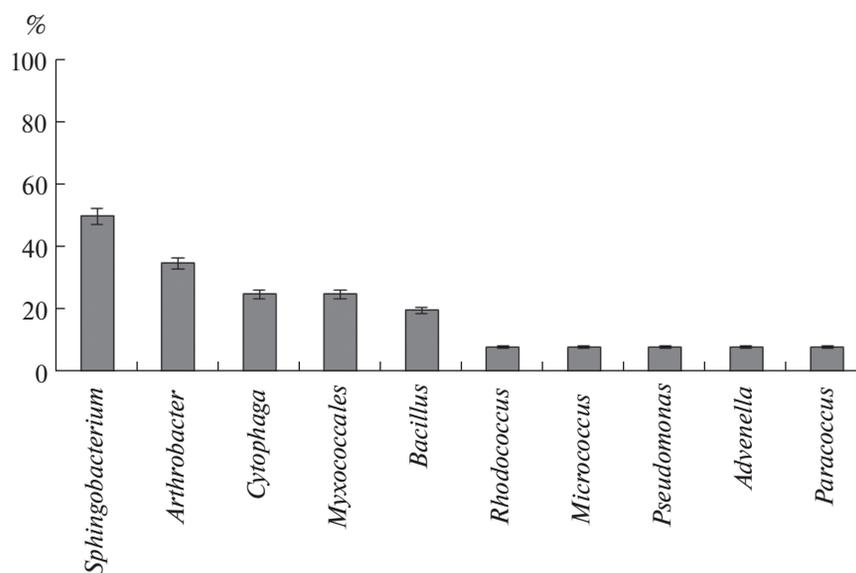


Рис. 2. Частота доминирования бактерий разных таксонов на листьях и корнях сорных растений.

этих бактерий были выделены из разных органов культурных и сорных растений (табл. 1). Из них 13 таксонов представлены грамотрицательными бактериями и 8 – грамположительными, таким образом, доминировали представители G^- прокариот, среди которых преобладали экрисотрофные бактерии.

Бактерии родов *Spingobacterium* и *Cytophaga* являются представителями одного и того же филума *Bacteroidetes*, но относятся к разным классам. Если представители рода *Cytophaga* являются типичными целлюлолитами, то бактерии рода *Spingobacterium* способны к деструкции крахма-

ла, и только некоторые виды могут использовать целлюбиозу. Следует отметить, что род *Spingobacterium*, который был описан в 1983 г. (Yabuuchi et al., 1983), отличается от рода *Flavobacterium* наличием в составе липидов сфингофосфолипидов. Что касается функциональной активности сфингобактерий, то известно, что штаммы *Spingobacterium multivorum* используют для получения бактериального удобрения, вносимого под томаты и огурцы. При этом повышается урожайность овощных культур с одновременным снижением на 30–40% содержания нитратного азота в плодах

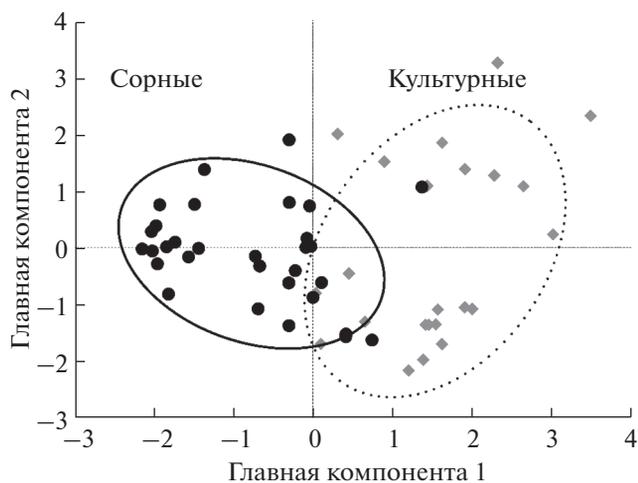


Рис. 3. Разделение главными компонентами бактериальных комплексов культурных и сорных растений по таксономическому составу.

огурцов и томатов (Нгуен Виет Тиен, 2013). Миксобактерии, доминирующие на корнях, являются типичными представителями целлюлозоразрушающих бактерий, относящихся к порядку *Mycococcales*. В деструкции корневых остатков участвуют, в основном, миксобактерии, а в разложении надземных растительных тканей – цитофаги (род *Cytophaga*).

Большинство эпифитных G⁻ бактерий, выделенных из растений (роды *Agrobacterium*, *Azospirillum*, *Erwinia*, *Pantoea*, *Paracoccus*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*), являются типичными экзосифогами, питающимися продуктами экзоосмоса

растений. Представители рода *Arthrobacter* – типично почвенные актинобактерии. В надземный ярус растений бактерии этого рода попадают с почвенными частицами не только по корням, но и с ветром, пылью, осадками. Об их приживаемости в филлосфере ранее не сообщалось. Однако недавно появилась работа (Sheublin, Laveeau, 2012), в которой доказано активное размножение на листьях яблони бактерий 4-х видов *Arthrobacter*, способных использовать фенолы, хлорфенолы, фенантроны, попадающие в филлосферу в качестве антропогенных загрязнителей, в том числе при использовании пестицидов. В связи с этим авторы ставят вопрос о значимости артробактерий для очистки не только почв, но и растений от загрязнений окружающей среды. Как было продемонстрировано нами ранее, артробактерии постоянно обнаруживались в качестве доминанта, как на корнях, так и на листьях сорных растений. В диссертации Т.В. Маркушевой (Маркушева, 2011) приводится список бактерий, способных использовать хлорфенолоксиуксусные производные. Это бактерии родов *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Agromyces*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Brenneria*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Gluconobacter*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Serratia*, *Stenotrophomonas*, *Xanthomonas*. Перечисленные бактерии-деструкторы авторы рекомендуют использовать в качестве действующих элементов технологий очистки водной среды и почвы от фенолов и их хлорированных производных, включая 2,4-дихлорфенол, 4-хлорфеноксиуксусную, 2,4-дихлорфеноксиуксусную и 2,4,5-трихлорфеноксиуксусную кислоты. Большинство родов бактерий из приведенного выше списка были выделены нами из

Таблица 1. Таксономический состав бактерий на культурных и сорных растениях, определенных на основании как фенотипических, так и молекулярно-биологического методов

№	Названия таксонов бактерий				
	Грам ⁻		Грам ⁺		
1	<i>Advenella</i>	9	<i>Paracoccus</i>	1	<i>Arthrobacter</i>
2	<i>Agrobacterium</i>	10	<i>Pseudomonas</i>	2	<i>Bacillus</i>
3	<i>Azospirillum</i>	11	<i>Rhizobium</i>	3	<i>Cellulomonas</i>
4	<i>Cytophaga</i>	12	<i>Stenotrophomonas</i>	4	<i>Curtobacterium</i>
5	<i>Erwinia</i>	13	<i>Sphingobacterium</i>	5	<i>Micrococcus</i>
6	<i>Flavobacterium</i>			6	<i>Nocardia</i>
7	<i>Mycococcales</i>			7	<i>Rhodococcus</i>
8	<i>Pantoea</i>			8	<i>Streptomyces</i>

Таблица 2. Антибиотические свойства бактериальных культур, выделенных из сорных растений

Штамм	<i>Pseudomonas syringae</i>	<i>Clavibacter michiganensis</i>	<i>Erwinia carotovora</i>
<i>Azospirillum</i>	0	0	1*
<i>Paracoccus</i>	0	0	0
<i>Pseudomonas</i>	0	0	0
<i>Cellulomonas</i>	5	0	0
<i>Arthrobacter</i>	0	4	4
<i>Bacillus</i>	0	5	1
<i>Mycococcales</i>	2	1	1
<i>Micrococcus</i>	1	0	0
<i>Sphingobacterium</i>	0	3	0
<i>Cytophaga</i>	0	0	2
<i>Rhodococcus</i>	0	1	2

исследованных растений. Таким образом, бактерии, обитающие на разных органах культурных и сорных растений, могут послужить в дальнейшем объектами для их практического применения, в частности, при очистке почв от фенольных загрязнений.

Нами создана коллекция бактерий, выделенных из филлосферы и ризосферы культурных, сорных растений и почвы.

Антибиотические свойства бактериальных культур, выделенных из культурных и сорных растений. Результаты исследований, касающихся структуры эпифитных комплексов бактерий культурных растений, были опубликованы нами ранее (Добровольская и соавт., 2012, 2013). В результате проверки выделенных бактерий на антагонизм по отношению к фитопатогенным бактериям *C. michiganensis*, *Ps. syringae* и *E. carotovora* было установлено, что 70 штаммов (44%) проявили антагонистические свойства по отношению ко всем видам фитопатогенных бактерий, используемых в опытах. Зоны ингибирования роста составляли 1–7 мм. Среди бактерий-антагонистов преобладали представители тех видов бактерий, которые доминировали в филлосфере, ризосфере и почве. В перечень этих бактерий входят представители следующих

таксонов: *Aquaspirillum*, *Erwinia*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Cellulomonas*, *Cytophaga*, *Mycococcales*.

Антибиотические свойства бактериальных культур, выделенных из 8 видов сорных растений, были проверены на антагонизм по отношению к тем же фитопатогенным бактериям, что и штаммы из культурных растений. При этом антибиотическую активность по отношению ко всем взятым в опыт фитопатогенным бактериям проявили 72% штаммов бактерий, выделенных из сорных растений (Хуснетдинова, 2017). Было установлено, что из 70 взятых в опыт бактериальных штаммов подавляли развитие фитопатогенной бактерии *Erwinia carotovora* представители таксонов *Arthrobacter*, *Rhodococcus*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Mycococcales*. Антибиотической активностью по отношению к двум другим выше тестерным фитопатогенным бактериям обладали представители как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий. В их число входили представители актинобактерий (роды *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Cellulomonas*), бацилл (*Bacillus*), миксобактерий (порядок *Mycococcales*), сфингобактерий (род *Sphingobacterium*). Зоны ингибирования составили 1–5 мм (табл. 2). В целом, можно отметить, что из общего числа идентифицированных нами таксонов бактерий, практически 50% пред-

ставителей обладают антагонистической активностью.

Таким образом, среди бактерий, выделенных из сорных растений, по сравнению с бактериями культурных растений, выше не только удельная доля (%) антагонистов, но и больше их разнообразие. Этот факт свидетельствует о полезной роли сорных растений, содержащих бактериальные сообщества, способные защитить от фитопатогенов и культурные растения.

В результате сравнительного анализа эпифитных бактериальных сообществ 6 видов культурных и 8 видов сорных растений были выявлены как общие, так и отличающиеся представители родов в структуре исследуемых бактериальных комплексов. Представители родов *Sphingobacterium*, *Stenotrophomonas*, *Paracoccus*, *Micrococcus* и специфические формы хемолитотрофных бактерий доминировали только в бактериальных сообществах сорных растений. Установлено, что антибиотическая активность эпифитных бактерий, выделенных из сорных растений, была почти в 2 раза выше, чем активность бактерий культурных растений. Обнаруженные факты свидетельствуют в пользу защитной роли сорных растений в агроценозах, благодаря обитающим на их органах бактерий-антагонистов фитопатогенов.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФ № 14-50-00029.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Захаренко А.В. Теоретические основы управления сорным компонентом агрофитоценоза в системах земледелия. М.: Изд-во МСХА, 2000. 468 с.

Добровольская Т.Г., Леонтьевская Е.А., Хуснетдинова К.А., Балабко П.Н. Таксономический состав и антибиотические свойства бактерий в надземном и подземном ярусах агроценоза // Проблемы агрохимии и экологии. 2012. № 4. С. 42–45.

Лысак Л.В., Добровольская Т.Г., Скворцова И.Н. Методы оценки бактериального разнообразия почв и идентификации почвенных бактерий М.: МАКС Пресс, 2003. 120 с.

Маркушева Т.В. Бактерии-деструкторы фенола и его хлорированных производных. Дис. ... докт. биол. наук. Уфа, 2011. 296 с.

Нгуен Виет Туен. Гетеротрофные бактерии техногенных субстратов как основа биопрепаратов-деструкторов нефтяных углеводородов и поверхностно-активных веществ. Дис. ... канд. биол. наук. (специальность биотехнология). Астрахань, 2013. 174 с.

Определитель бактерий Берджи. 1997. Т. 1. С. 436. Т. 2. С. 362.

Хуснетдинова К.А. Структура сообществ эпифитных культурных и сорных растений. Дис. ... канд. биол. наук. Москва, 2017. 162 с.

Добровольская Т.Г., Хуснетдинова К.А., Манучарова Н.А., Балабко П.Н. Структура и функции бактериальных сообществ в агроценозе // Почвоведение. 2016. Т. 49. № 1. С. 79–85.

Dobrovol'skaya T.G., Khusnetdinova K.A., Manucharova N.A., Balabko P.N. The structure and functions of bacterial communities in an agrocenosis // Eurasian Soil Sci. 2016. V. 49. P. 70–76.

Добровольская Т.Г., Хуснетдинова К.А., Манучарова Н.А., Головченко А.В. Структура эпифитных бактериальных сообществ сорных растений // Микробиология. 2017. Т. 86. № 2. С. 247–254.

Dobrovol'skaya T.G., Khusnetdinova K.A., Manucharova N.A., Golovchenko A.V. Structure of epiphytic bacterial communities of weeds // Microbiology (Moscow). 2017. V. 86. P. 257–263.

Manucharova N.A., Kol'tsova E.M., Stepanov A.L., Demkina E.V., Demkin V.A., El'Registan G.I. Comparative analysis of the functional activity and composition of hydrolytic microbial complexes from the Lower Volga barrow and modern chestnut soils // Microbiology (Moscow). 2014. V. 83. P. 674–683.

Yabuuchi E., Kaneko T., Yano I., Moss C.W., Miyoshi N. *Sphingobacterium* gen. nov., *Sphingobacterium spiritivorum* comb. nov., *Sphingobacterium mizutae* sp. nov., and *Flavobacterium indologenes* sp. nov.: glucose-nonfermenting gram-negative rods in CDC groups IIC-2 and IIB // Int. J. Syst. Bacteriol. 1983. V. 33. P. 580–598.

Якушев А.В. Комплексный структурно-функциональный метод характеристики микробных популяций // Почвоведение. 2015. Т. 48. № 4. С. 429–435.

Yakushev A.V. Integral structural-functional method for characterizing microbial populations // Eurasian Soil Sci. 2015. V. 48. P. 378–394.

Sheublin T.R., Leveau J.H.J. Isolation of *Arthrobacter* species from the phyllosphere and demonstration of their epiphytic fitness // MicrobiologyOpen. 2013. V. 2. P. 205–213.

Comparison of Diversity and Functions of Epiphytic Bacteria from Cultivated and Weed Plants in Agrocenoses

T. G. Dobrovol'skaya^{1,*}, K. A. Khusnetdinova¹, N. A. Manucharova^{1,**},
A. V. Yakushev¹, and T. I. Khusnetdinova¹

¹Faculty of Soil Science, Soil Biology Department, Lomonosov Moscow State University, Russia

*e-mail: dobrata@mail.ru,

**e-mail: manucharova@mail.ru

Received October 9, 2017

Abstract—Diversity of epiphytic bacterial complexes from cultivated and weed plants was analyzed using the frequency of dominance of bacterial taxa in these communities and the principal component method. The presence of both common dominants on cultivated and weed plants and distinct differences between the com-

position of the epiphytic bacterial complexes of these plants was established. Only on weeds the representatives of chemolithotrophic bacteria capable of tetrathionate and thiosulfate assimilation were found. The antibiotic activity of bacteria isolated from weed plants was found to be almost twice as high as that found for bacteria from cultivated plants. The obtained data indicate the positive effect of bacterial communities from weed plants, which makes it possible to protect cultivated plants from phytopathogens.

Keywords: cultivated and weed plants, epiphytic communities, bacterial functions, antibiotic activity

СПЕЦИАЛЬНЫЙ ВЫПУСК
(Микробиология озер Центральной Азии)
МИНИ-ОБЗОР

МИКРОБНЫЕ СООБЩЕСТВА ОЗЕР ЦЕНТРАЛЬНОЙ АЗИИ –
ИНДИКАТОРЫ КЛИМАТИЧЕСКИХ И ЭКОЛОГИЧЕСКИХ
ИЗМЕНЕНИЙ РЕГИОНА

© 2018 г. З. Б. Намсараев^а, *

^аНациональный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия

*e-mail: zorigto@gmail.com

Поступила в редакцию 19.03.2018 г.

Центральная Азия – один из крупнейших макрорегионов мира, относительно слабо изученный микробиологами. Озера этого региона обладают широким диапазоном экологических условий для развития микробных сообществ: от ультрапресных до гиперсоленых водоемов. Долгосрочные наблюдения показывают, что микробные сообщества этих озер реагируют на климатические и экологические изменения в регионе. При этом геномные исследования показывают, что некоторые виды микроорганизмов обнаруживаются только в водоемах Центральной Азии, но не других регионов мира. Благодаря сочетанию этих факторов водоемы Центральной Азии являются перспективным объектом для микробиологических исследований.

Ключевые слова: Центральная Азия, биогеография, соленые озера, содовые озера, озеро Байкал

DOI: 10.1134/S0026365618040146

Центральная Азия – это обширный, не имеющий выхода к океану регион Азии. Согласно определению ЮНЕСКО, этот регион включает в себя “территории, находящиеся в настоящее время в границах Афганистана, западной части Китая, Монголии, северной части Индии, северо-восточной части Ирана, Пакистана, Туркменистана, Киргизии, Таджикистана, Казахстана”, а также прилегающие территории России. Впервые Центральная Азия в качестве отдельного региона мира была выделена географом Александром фон Гумбольдтом в 1843 г. на основании отдаленности от морского побережья, аридного климата и наличия крупнейших горных систем (Miroshnikov, 1992).

Центральная Азия играет важнейшую роль в водном режиме континента. На ее территории находятся истоки крупнейших рек мира, таких как Инд, Ганг, Меконг, Хуанхэ, Янцзы, Амур, Енисей, Обь, а также озеро Байкал, в котором содержатся до 20% мировых запасов поверхностных вод суши. В последние десятилетия в Центральной Азии обострилась проблема дефицита пресной воды из-за возрастания давления антропогенных факторов и климатических изменений. Примером первой тенденции является сокращение объема и повышение минерализации Аральского моря с 10 г/л в 1960 г. до 115 г/л в 2014 г. из-за потребления воды на орошение в сельском хозяйстве (Izhitskiy et al., 2016). Климатические из-

менения оказывают влияние на все компоненты водных систем, включая уменьшение объема горных ледников (Chen et al., 2016), сокращение стоков рек, повышение минерализации и пересыхание озер (Karte et al., 2015). Даже экосистема озера Байкал, считавшаяся устойчивой по отношению к потеплению из-за огромного объема воды в озере, реагирует на изменения климата. Шестидесятилетняя серия наблюдений показала, что среднегодовая температура воды в озере Байкал повысилась на 1.21°C, начиная с 1946 г., а содержание хлорофилла *a* выросло на 300% с 1979 г. (Hampton et al., 2008). Эти данные показывают важность долгосрочных наблюдений для оценки реакции экосистем на крупномасштабные воздействия.

Озера являются индикаторами климатических изменений, происходящих в их водосборных бассейнах (Adrian et al., 2009). Исследования, проведенные на соленом озере Хилганта в Южной Сибири в период с 1995 по 2012 гг. (результаты опубликованы в этом выпуске журнала), показали, что состав цианобактериального сообщества в озере существенно зависит от степени увлажненности территории (Намсараев и соавт., 2018а). Так доминирующая во влажные годы нитчатая цианобактерия *Coleofasciculus chthonoplastes* при наступлении многолетней засухи становится минорным компонентом в сообществе и встречается в виде отдельных нитей в озере, а при очередном повышении увлажнения территории снова стано-

вится доминантом в микробном сообществе озера. Примечательно, что в засушливый период во время выпадения дождей и кратковременном наполнении котловины озера, в цианобактериальных матах доминировала нитчатая цианобактерия рода *Geitlerinema*, тогда как доминирование *C. chthonoplastes* отмечалось в периоды со стабильно влажными условиями (Намсараев и соавт., 2018б).

Соленые и содовые озера Центральной Азии являются экстремальными экосистемами и могут рассматриваться с точки зрения биогеографии как “острова”, окруженные территориями с мезофильными условиями. В этих экосистемах обнаруживаются как космополитные виды микроорганизмов, такие как галофильные археи *Halonotius* sp. (Селиванова и соавт., 2018), галофильные бактерии *Halomonas* sp. (Эрдынеева и соавт., 2018) или нитчатые алкалофильные цианобактерии *Arthrospira plathensis* (Burganskaya et al., 2018), так и потенциально эндемичные виды бактерий. Д.Ю. Сорокиным и соавторами при исследовании 76 геномов алкалофильных бактерий рода *Thioalkalivibrio*, выделенных из соленых озер Кении, Египта, Калифорнии и ряда центральноазиатских регионов (Бурятия, Алтайского края, Забайкалья и Монголии), у этого рода было обнаружено наличие видов и штаммов, обладающих ограниченным географическим распространением и встречающихся только в Центральной Азии или Африке (Ahn et al., 2017). Также наличие биогеографических популяций, специфичных для Центральной Азии, было обнаружено у представителей галофильных актинобактерий рода *Nocardioopsis* и *Streptomyces* (He et al., 2015; Zhao et al., 2016). Примечательно, что у этих организмов зависимость от географического фактора обнаруживалась только при сравнении штаммов, выделенных из озер, расположенных на расстоянии более 700 км, тогда как на организмы из озер, расположенных ближе, чем 700 км, большее влияние оказывали экологические факторы среды, такие как соленость, pH и т.д. (Zhao et al., 2016). Схожая закономерность была обнаружена при сравнении клоновых библиотек, полученных из озер Внутренней Монголии и Аргентины. Географический фактор начинал оказывать значительное влияние при сравнении центральноазиатских и американских сообществ, тогда как при сравнении центральноазиатских сообществ друг с другом значимое влияние оказывали только экологические факторы. При этом влияние географического фактора было обнаружено только на бактериальную часть сообщества, в то время как археи зависели только от экологических факторов (Pagaling et al., 2009). Тем не менее, данные, полученные при исследовании биогеографии архей из гиперсоленых водоемов Европы, Ближнего Востока и Африки, показали, что представители некоторых родов галофильных архей,

возможно, могут иметь ограниченное географическое распространение (Clark et al., 2017).

Для выявления закономерностей географического распределения микроорганизмов на Земле и выявления видов с потенциально эндемичным, прерывистым или космополитным распределением необходим более широкий географический охват исследований с применением методов высокопроизводительного секвенирования. Центральная Азия по сравнению с другими макрорегионами изучена этими методами относительно слабо, что искажает представления о глобальных закономерностях распространения микроорганизмов. С этой точки зрения молекулярно-биологические исследования водоемов в различных регионах Центральной Азии (Оренбургская область, Республика Бурятия и Забайкальский край), результаты которых опубликованы в этом выпуске журнала, позволят получить более равномерное распределение данных в глобальном масштабе (Зайцева и соавт., 2018; Селиванова и соавт., 2018).

Климатические и экологические изменения оказывают влияние не только на состав сообществ, но и на их активность. Сравнение скоростей микробных процессов в озере Хилганта при различной степени увлажненности территории показывает, что во влажный период активности продукционных процессов на два порядка превышают активность в засушливый период (Намсараев и соавт., 2018б). В свою очередь, геохимическая деятельность микроорганизмов оказывает влияние на параметры окружающей среды. В статье Букина и соавт. (2018) в этом выпуске журнала анализируется потенциал образования метана, одного из ключевых парниковых газов, сообществами психрофильных микроорганизмов донных осадков и грязевых вулканов озера Байкал.

Озера Центральной Азии играют важную роль в снабжении населения водой, поддержании экосистемных функций и являются индикаторами климатических изменений. К сожалению, количество изученных микробиологами озер относительно невелико из-за труднодоступности региона. Исследования различной степени интенсивности проводились в таких местах как Кулундинская степь, Байкал, Забайкалье, Монголия, Внутренняя Монголия, Синьцзян, Тибет, Аральское море (Wu et al., 2006; Foti et al., 2008; He et al., 2015; Namsaraev et al., 2015). Тем не менее, разнообразие климатических и экологических условий в Центральной Азии предоставляют микробиологам обширное пространство для будущих исследований.

Статьи, посвященные исследованию микробных сообществ озер Центральной Азии в этом выпуске журнала “Микробиология”, были подготовлены в рамках XIII Международной конференции по исследованию соленых озер, которая состоялась в г. Улан-Удэ (Россия) 21–25 августа 2017 г.



Рис. 1. Границы Центральной Азии (пунктирная линия) и места проведения отдельных исследований микробных сообществ водоемов региона. 1 – Аральское море (Izhitskiy et al., 2016), 2 – Соль-Илецк (Селиванова и соавт., 2018), 3 – Кулундинская степь (Foti et al., 2008), 4 – озеро Байкал (Букин и соавт., 2018), 5 – Забайкалье (Зайцева и соавт., 2018; Намсараев и соавт., 2018а, 2018б), 6 – Монголия (Namsaraev et al., 2015), 7 – Внутренняя Монголия (Ma et al., 2004), 8 – пустыня Бадаин Жаран (Эрдынеева и соавт., 2018), 9 – Синьцзян (He et al., 2015), 10 – Тибет (Wu et al., 2006).

Материалы подготовлены при поддержке гранта РФФИ № 17-29-05103.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Букин С.В., Павлова О.Н., Калмычков Г.В., Иванов В.Г., Погодаева Т.В., Галачьянц Ю.П., Букин Ю.С., Хабеев А.В., Земская Т.И. Субстратная специфичность метаногенных сообществ из донных отложений оз. Байкал, ассоциированных с разгрузками углеводородных газов // *Микробиология*. 2018. Т. 87. № 4. С. 409–420.
- Зайцева С.В., Абидуева Е.Ю., Раднагуруева А.А., Базаров С.М., Бурюхаев С.П. Структура микробных сообществ в осадках щелочных озер Забайкалья с различной минерализацией // *Микробиология*. 2018. Т. 87. № 4. С. 421–431.
- Намсараев З.Б., Колганова Т.В., Патутина Е.О., Цыренова Д.Д., Самылина О.С. Разнообразие цианобактерий в щелочном озере Хилганта в засушливый и влажный период // *Микробиология*. 2018. Т. 87. № 4. С. 448–457.
- Намсараев З.Б., Горленко В.М., Бурюхаев С.П. Сукцессионные изменения микробного сообщества щелочного озера Хилганта в засушливый период // *Микробиология*. 2018. Т. 87. № 4. С. 458–464.
- Селиванова Е.А., Пошвина Д.В., Хлюпко Ю.А., Гоголева Н.Е., Плотников А.О. Разнообразие прокариот в планктонных сообществах соленых Соль-Илецких озер (Оренбургская область) // *Микробиология*. 2018. Т. 87. № 4. С. 432–447.
- Эрдынеева Е.Б., Раднагуруева А.А., Дунаевский Я.Е., Белькова Н.Л., Намсараев З.Б., Лаврентьева Е.В. Аминопептидазная активность галоалкалофильных бактерий рода *Halomonas*, выделенных из содово-соленых озер пустыни Бадаин Жаран // *Микробиология*. 2018. Т. 87. № 4. С. 397–408.
- Adrian R., O'Reilly C.M., Zagarese H., Baines S.B., Hessen D.O., Keller W., Livingstone D.M., Sommaruga R., Straile D., Donk E.V., Weyhenmeyer G.A., Wind M. Lakes as sentinels of climate change // *Limnol. Oceanogr.* 2009. V. 54. № 6. Part 2. P. 2283–2297.
- Ahn A.C., Meier-Kolthoff J.P., Overmars L., Richter M., Woyke T., Sorokin D.Y., Muyzer G. Genomic diversity with-

- in the haloalkaliphilic genus *Thioalkalivibrio* // PLoS One. 2017. V. 12. P. e0173517.
- Burganskaya E.I., Bryantseva I. A., Gaisin V.A., Grouzdev D.S., Rysina M.S., Barkhutova D.D., Baslerov R.V., Gorlenko V.M., Kuznetsov B.B.* Benthic phototrophic community from Kiran soda lake, south-eastern Siberia // *Extremophiles*. 2018. V. 22. P. 211–220.
- Chen Y., Li W., Deng H., Fang G., Li Z.* Changes in central Asia's water tower: past, present and future // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. P. 35458.
- Clark D.R., Mathieu M., Mourot L., Dufossé L., Underwood G.J., Dumbrell A.J., McGenity T.J.* Biogeography at the limits of life: Do extremophilic microbial communities show biogeographical regionalization? // *Global Ecol. Biogeogr.* 2017. V. 26. P. 1435–1446.
- Foti M.J., Sorokin D.Y., Zacharova E.E., Pimenov N.V., Kuenen J.G., Muyzer G.* Bacterial diversity and activity along a salinity gradient in soda lakes of the Kulunda Steppe (Altai, Russia) // *Extremophiles*. 2008. V. 12. P. 133–145.
- He S.T., Zhi X.Y., Jiang H., Yang L.L., Wu J.Y., Zhang Y.G., Hozzein W.N., Li W.J.* Biogeography of *Nocardiopsis* strains from hypersaline environments of Yunnan and Xinjiang Provinces, western China // *Sci. Rep.* 2015. V. 5. P. 13323.
- Izhitskiy A.S., Zavialov P.O., Sapozhnikov P.V., Kirilli G.B., Grossart H.P., Kalinina O.Y., Zalota A.K., Goncharenko I.V., Kurbaniyazov A.K.* Present state of the Aral Sea: diverging physical and biological characteristics of the residual basins // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. P. 23906.
- Hampton S.E., Izmes'teva L.R., Moore M.V., Katz S.L., Dennis B., Silow E.A.* Sixty years of environmental change in the world's largest freshwater lake – Lake Baikal, Siberia // *Global Change Biol.* 2008. V. 14. P. 1947–1958.
- Karthe D., Chalov S., Borchardt D.* Water resources and their management in central Asia in the early twenty first century: status, challenges and future prospects // *Environ. Earth Sci.* 2015. V. 73. P. 487–499.
- Ma Y., Zhang W., Xue Y., Zhou P., Ventosa A., Grant W.D.* Bacterial diversity of the Inner Mongolian Baer Soda Lake as revealed by 16S rRNA gene sequence analyses // *Extremophiles*. 2004. V. 8. P. 45–51.
- Miroshnikov L.I.* APPENDIX: A note on the meaning of the term 'Central Asia' as used in this book // *History of Civilizations of Central Asia: Vol. I. The Dawn of Civilization: Earliest Times to 700 B.C.* / Eds. Dani A.H., Masson V.M. Paris: UNESCO Publishing, 1992. P. 467–470.
- Namsaraev Z.B., Zaitseva S.V., Gorlenko V.M., Kozyreva L.P., Namsaraev B.B.* Microbial processes and factors controlling their activities in alkaline lakes of the Mongolian plateau // *Chinese J. Oceanol. Limnol.* 2015. V. 33. P. 1391–1401.
- Pagaling E., Wang H., Venables M., Wallace A., Grant W.D., Cowan D.A., Jones B.E., Ma Y., Ventosa A., Heaphy S.* Microbial biogeography of six salt lakes in Inner Mongolia, China, and a salt lake in Argentina // *Appl. Environ. Microbiol.* 2009. V. 75. P. 5750–5760.
- Wu Q.L., Zwart G., Schauer M., Kamst-van Agterveld M.P., Hahn M.W.* Bacterioplankton community composition along a salinity gradient of sixteen high-mountain lakes located on the Tibetan Plateau, China // *Appl. Environ. Microbiol.* 2006. V. 72. P. 5478–5485.
- Zhao F., Qin, Y.H., Zheng X., Zhao H.W., Chai D.Y., Li W., Pu M.-X., Zuo X.-S., Qian W., Ni P., Zhang Y., Mei H., He S.-T.* Biogeography and adaptive evolution of *Streptomyces* strains from saline environments // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. P. 32718.

Microbial Communities of the Central Asian Lakes as Indicators of Climatic and Ecological Changes in the Region

Z. B. Namsaraev*

NRC Kurchatov Institute, Moscow, Russia

*e-mail: zorigto@gmail.com

Received March 19, 2018

Abstract—Central Asia is one of the world largest regions, which has been relatively poorly studied from the microbiological point of view. The lakes of this region have a broad range of ecological conditions, from low-mineral to hypersaline ones. Long-term observations revealed that microbial communities of these lakes reflect the climatic and ecological changes in this region. Genomic research showed that some microbial species were found only in Central Asian lakes, but not in other regions of the world. The combination of these factors makes Central Asian lakes a promising subject for microbiological investigation.

Keywords: Central Asia, biogeography, saline lakes, soda lakes, Lake Baikal

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИ

АМИНОПЕПТИДАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ ГАЛОАЛКАЛОФИЛЬНЫХ
БАКТЕРИЙ РОДА *HALOMONAS*, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ СОДОВО-СОЛЕННЫХ
ОЗЕР ПУСТЫНИ БАДАИН ЖАРАН

© 2018 г. Е. Б. Эрдынеева^а, А. А. Раднагуруева^а, Я. Е. Дунаевский^б,
Н. Л. Белькова^с, З. Б. Намсараев^д, Е. В. Лаврентьева^{а, е, *}

^аИнститут общей и экспериментальной биологии СО РАН, Улан-Удэ, Россия

^бМосковский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Россия

^сЛимнологический институт СО РАН, Иркутск, Россия

^дНИЦ “Курчатовский институт”, Москва, Россия

^еБурятский государственный университет, Улан-Удэ, Россия

*e-mail: lena_l@mail.ru

Поступила в редакцию 11.12.2017 г.

Из микробных матов содово-соленых озер пустыни Бадаин Жаран (Внутренняя Монголия, Китай) были выделены три штамма галоалкалофильных бактерий, которые на основании рибосомной филогении отнесены к роду *Halomonas*. Изученные бактерии являются умеренными алкалофилами и экстремальными галофилами. Показано, что секретируемые пептидазы этих штаммов обладают узкой субстратной специфичностью, гидролизуют белки и *para*-нитроанилидные субстраты, проявляя максимальную активность по гидролизу L-лейцил-*n*-нитроанилида (LpNa). Установлено, что пептидазы наиболее активны в диапазоне щелочных значений pH (8–10), при повышенной солености (50–100 г/л) и термостабильны (до 50°C). Данные ингибиторного анализа и субстратной специфичности изученных внеклеточных протеаз указывают на их принадлежность к классу металлопептидаз аминокептидазного типа.

Ключевые слова: *Halomonas*, аминокептидазы, пустыня Бадаин Жаран, содово-соленые озера

DOI: 10.1134/S0026365618040067

Хемоорганотрофные грамотрицательные бактерии рода *Halomonas* (семейство *Halomonadaceae*, класс *Gammaproteobacteria*) — умеренно-галофильные, аэробные или факультативно анаэробные палочки. Этот род является одним из самых крупных и включает 91 вид с достоверно опубликованными именами (Jung et al., 2016; Kim et al., 2016). Бактерии рода *Halomonas* были выделены из различных минерализованных сред, таких как солончаки, засоленные почвы, соленые и содовые озера, глубоководные моря, морепродукты и морские беспозвоночные животные (Jung et al., 2016; Kim et al., 2016). Способность к денитрификации является одним из таксономических признаков рода *Halomonas* и часто рассматривается как приспособление к переменным физико-химическим условиям природной среды (Болтынская, 2007; González-Domenech et al., 2010). Представители рода *Halomonas* преимущественно используют кислород, нитрат или нитрит в качестве акцептора электрона.

Утилизация широкого спектра субстратов и метаболическая гибкость представителей рода

Halomonas позволяет им участвовать в разнообразных процессах деградации органического вещества и предопределяет высокую выживаемость в природных условиях. Благодаря способности использовать органические соединения разных классов, например, белковые или углеводные субстраты, представители рода *Halomonas* представляют интерес для биотехнологии (Болтынская, 2007). Способность к расщеплению белковых субстратов у представителей рода *Halomonas* была ранее обнаружена некоторыми авторами (In et al., 2005; Rohban et al., 2009; Kumar et al., 2012; De Lourdes Moreno et al., 2013; Anithajothi et al., 2014).

Аминопептидазы (ЕС 3.4.11) представляют собой экзопептидазы, которые катализируют расщепление N-концевой аминокетильной группы в полипептидной цепи. Они широко распространены у животных, растений и микроорганизмов. В настоящее время микроорганизмы представляют собой наиболее перспективный источник получения аминокетильных за счет их высокого биохимического разнообразия и относительно высокой стабиль-

ности и активности (Lei et al., 2017a). Аминопептидазы совместно с другими пептидазами осуществляют полную деградацию таких белков как казеин, глютен, коллаген и желатин (Wu et al., 2014). Эти ферменты активно изучаются у экстремофильных микроорганизмов: термофильных (Pociero et al., 2005), галофильных бактерий (Lei et al., 2017a, 2017b) и архей (Franzetti et al., 2002).

На сегодняшний день протеолитические ферменты широко используются в производстве кормовых добавок, фармацевтических препаратов и детергентов, в обработке кожи и меха (Rajkumar et al., 2011; Mothe, Sultanpuram, 2016). Микробные пептидазы относят к многоцелевым ферментам, они представляют собой одну из крупнейших групп промышленных ферментов, на которую приходится около 60% продаж на мировом рынке.

Целью работы стало выделение и изучение эколого-физиологических свойств галоалкалофильных бактерий рода *Halomonas*, а также исследование физико-химических свойств их внеклеточных пептидаз.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Микроорганизмы и оптимальная среда для культивирования. Пробы микробных матов были отобраны в августе 2013 г. в содово-соленых озерах пустыни Бадаин Жаран (39°20'–41°30' N, 99°48'–104°14' E), расположенной во Внутренней Монголии, Китай. Штамм 3В был выделен из биоматов озера Нуерту (Nuortu) – 39°46.045' N, 102°27.914' E, а штаммы 7Р и 7В – из биоматов озера Сумужилин (Sumujilin) – 39°48.376' N, 102°25.734' E. Штаммы культивировали как протеолитические галофильные и алкалофильные бактерии на среде Пфеннига следующего состава (г/л): NH₄Cl – 0.5; KН₂Р₄ – 0.5; MgCl₂ – 0.5; СаCl₂ – 0.05; NaCl – 150; дрожжевой экстракт – 0.5. В качестве субстрата использовали пептон – 5 г/л; рН среды доводили 10%-ным раствором бикарбонатно-карбонатного буфера до 8.5–9.5, температура культивирования составила 30°С.

Морфологию, размеры, подвижность клеток изучали микроскопированием образцов с помощью светового микроскопа AxioStar Plus (“Carl Zeiss”) при рабочем увеличении ×1000. Готовили препараты живых и фиксированных окрашенных клеток.

Идентификация штаммов по последовательности гена 16S рРНК. Выделение геномной ДНК проводили из 1 сут культур с использованием коммерческого набора АхуПрер Bacterial Genomic DNA kit (“Ахугене”, США). Фрагмент гена 16S рРНК амплифицировали на праймерах 27F (5'-AGAGTTTГАТСАТGGCTCAG-3') и 1542R (5'-AAGGAGGTГАТССAGCCS-3') (Brosius et al.,

1981). Продукты амплификации анализировали методом агарозного гель-электрофореза, целевые ампликоны длиной 1500 п.н. вырезали и секвенировали на автоматическом секвенаторе ABI3500 Genetic Analyzer (“Applied Biosystems”, США) в ЦКП “Геномика” СО РАН. Нуклеотидные последовательности депонированы в международной базе данных EMBL-ENA под следующими номерами: штамм 3В LT990052.1, штамм 7Р LT990051.1 и штамм 7В LT990050.1.

Филогенетический анализ. Редактирование нуклеотидных последовательностей производили вручную в соответствии с секвенограммой при помощи программы BioEdit v. 7.1.3.0 (Hall, 1999). Поиск гомологичных последовательностей для рибосомной филогении проводили в базе данных культивируемых штаммов (Database EMBL Prokaryote) с помощью программы FASTA (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/fasta/>) и BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Нуклеотидные последовательности выравнивали с помощью программы Clustal W 2.0.10. Филогенетический анализ проводили с помощью пакета программ Mega v. 6.06 методом объединения ближайших соседей “Neighbor-Joining Tree”, бутстреп-поддержка составила 1000 повторений (Tamura et al., 2007).

Изучение эколого-физиологических свойств гидролитических бактерий. Температурные диапазоны развития бактерий устанавливали в градиентном термостате от 20 до 60°С и в холодильнике от 5 до 10°С. Диапазон рН устанавливали от 6.0 до 11.0 разными концентрациями 0.5 М NaOH и 25% раствором HCl. Способность использовать различные источники питания проверяли на минеральной среде, в которую вносили испытуемые компоненты до конечной концентрации 2% от объема среды. Биомассу бактерий определяли по изменению оптической плотности культуры при длине волны 560 нм. Биохимические свойства бактерий, удельную скорость роста определяли общепринятыми методами (Практикум по микробиологии, 2005).

Определение протеолитической активности. Культуры инкубировали при 30°С на минеральной среде Пфеннига в течение 10 сут, затем клетки осаждали центрифугированием (12000 об./мин, 15 мин). Внеклеточную протеолитическую активность полученного супернатанта определяли согласно методу Эрлангера (Erlanger et al., 1961). В работе использованы следующие 5 мМ *para*-нитроанилидные субстраты, специфичные для эндопептидаз:

GlpAALpNA (пироглутамил-аланил-аланил-лейцин-*n*-нитроанилид) – субтилизин-подобные пептидазы;

GlpFpNA (пироглутамил-фенилаланил-*n*-нитроанилид) – химотрипсин-подобные пептидазы;

GlpFapNA (пироглютамил-фенилаланил-аланил-*n*-нитроанилид) – цистеиновые пептидазы;

ВАРА (N-бензоил-L-аргинил-*n*-нитроанилид) – трипсин-подобные пептидазы.

Субстраты для аминокпептидаз:

LpNA (L-лейцил-*n*-нитроанилид);

FpNA (L-фенилаланил-*n*-нитроанилид).

При измерении активности пептидаз в ячейку микропланшета вносили 160 мкл 0.1 М фосфатного буфера (рН 8), добавляли 10 мкл культуральной жидкости (КЖ), 10 мкл соответствующего субстрата и измеряли оптическое поглощение раствора в нулевой момент. Затем смесь инкубировали при 37°C, определяя изменение поглощения через различные промежутки времени. Количество образовавшегося продукта (*n*-нитроанилина) определяли спектрофотометрически при 405 нм на микропланшетном фотометре StatFax 2100 (“Awareness Technology Inc.”, США) в 96-луночных планшетах, используя дифференциальный фильтр 492 нм.

При определении активности по отношению к GlpFapNA к реакционной смеси дополнительно добавляли 5 мкл свежеприготовленного раствора дитиотреитола (ДТТ, 10 мг/мл).

Очистка фермента. Процедура частичной очистки внеклеточных пептидаз включала две последовательные стадии: диализ культуральной жидкости и ионообменную хроматографию.

(1) Диализ проводили для отделения исследуемого фермента от низкомолекулярных веществ. Для этого 2 мл культуральной жидкости помещали в диализный мешочек, пропускающий молекулы, масса которых в среднем не превышает 10 кДа. Диализовали против 800 мл 0.1 М фосфатного буфера (рН 7) при 4°C на магнитной мешалке в течение 1 сут.

(2) Ионообменную хроматографию осуществляли на колонке Mono Q (FPLC), уравновешенной 0.01 М фосфатным буфером (рН 7). Белок, сорбирующийся на колонке, элюировали градиентом NaCl при скорости 1 мл/мин. В полученных таким образом образцах измеряли концентрацию белка и активность по выбранным субстратам при 410 нм (А 410) за 12 ч при 37°C. Далее фракции, составляющие отдельные пики пептидазной активности, объединяли, обессоливали (используя 0.03 М фосфатный буфер, рН 7.0) и концентрировали на ячейке Amicon с мембраной UM 10 (пропускает белки не более 10 кДа) при 4°C.

В полученных образцах измеряли содержание белка и ферментативную активность для вычисления следующих параметров:

(1) Общая активность (ед. мл) – определяли, как активность фермента во всем объеме препарата.

(2) Удельная активность (ед./мг белка) – определяли в единицах активности на один миллиграмм белка препарата.

(3) Степень очистки – определяли, как отношение удельной активности на данной стадии очистки к исходной удельной активности в культуральной жидкости.

(4) Выход (%) – определяли, как долю ферментативной активности на данной стадии очистки от исходной ферментативной активности в культуральной жидкости.

Выход фермента с колонки характеризовали коэффициентом доступности (K):

$$K = \frac{V_e - V_c}{V_o - V_c},$$

где V_e – объем, в котором выходит белок; V_o – общий объем колонки (24 мл); V_c – свободный объем колонки (8 мл).

Далее строили график, где по оси Ox откладывали десятичный логарифм молекулярных масс маркерных белков, по оси Oy – значения K . По графику находили молекулярные массы исследуемых ферментов.

Определение оптимума рН-активности и рН-стабильности фермента. При определении оптимума рН действия секретируемой пептидазы по отношению к синтетическим субстратам был использован универсальный буфер в диапазоне рН 2–11 с шагом 1. В состав буфера входили 0.02 М H_3PO_4 , 0.02 М CH_3COOH , 0.02 М H_3BO_3 ; необходимое значение рН получали, добавляя к смеси кислот 0.02 М NaOH.

Ферментный препарат инкубировали при 37°C 4 ч в универсальном буферном растворе (рН 2–11), затем образцы доводили до рН 8 с помощью 0.1 М фосфатного буфера (рН 7) в щелочном диапазоне от рН 8, либо 0.1 М NaOH в кислом диапазоне до рН 8. Пептидазную активность ферментов определяли по методу, описанному выше.

Определение температурного оптимума и температурной стабильности фермента. Температурный оптимум фермента определяли, измеряя активность фермента при температурах от 30 до 60°C. Для изучения температурной стабильности раствор фермента инкубировали при тех же температурах в течение 4 ч, затем доводили до комнатной температуры и определяли активность, как указано выше.

Определение оптимума концентрации хлорида натрия для исследуемого фермента. При определении оптимума хлорида натрия для действия секретируемой пептидазы по отношению к синтетическим субстратам были подготовлены солевые растворы с концентрацией NaCl от 0 до 300 г/л (0, 10, 30, 50, 80, 100, 150, 200, 250, 300 г/л). Раствор фермента инкубировали при 37°C в течение 4 ч,

затем доводили до комнатной температуры и определяли активность, как указано выше.

Определение функциональных групп активного центра. Для выяснения природы функциональных групп активного центра пептидаз бактерий, исследовали влияние различных ингибиторов на их активность. Ингибиторный анализ проводили с очищенными ферментными препаратами и культуральной жидкостью. В работе использовали специфические:

– ингибитор сериновых пептидаз: PMSF (фенилметилсульфонилфторид);

– ингибиторы металлопептидаз: EDTA (этилендиаминтетраацетат натрия) и *o*-фенантролин.

К 50 мкл раствора фермента добавляли 5 мкл раствора ингибитора определенной концентрации и выдерживали смесь 50–60 мин при комнатной температуре. Затем прибавляли 700 мкл фосфатного буфера (0.1 М, pH 8) и 10 мкл раствора соответствующего субстрата. Реакцию проводили при 37°C. Когда оптическая плотность в контроле (смесь без добавления ингибитора) увеличивалась на 0.5–0.7 единиц, во всех образцах определяли изменение оптической плотности и вычисляли остаточную активность по отношению к контролю.

Приготовление растворов ингибиторов: EDTA растворяли в фосфатном буфере (0.1 М, pH 8); PMSF и *o*-фенантролин растворяли в этаноле; в тех случаях, когда используемый ингибитор был растворен в спирте (этаноле), в качестве контроля к раствору фермента добавляли 5 мкл спирта.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Рибосомная филогения гидролитических бактерий. Из микробных матов содово-соленых озер пустыни Бадаин Жаран были изолированы три штамма алкалофильных бактерий – 3В, 7В и 7Р. Рибосомная филогения позволила отнести все штаммы к роду *Halomonas* (рис. 1). Штамм 3В показал максимальный процент гомологии (99%) с истинным алкалофилом *Halomonas mongoliensis* Z-7009Т, который был впервые выделен из сходного по экологии места обитания – содового озера Дзун-Тухэм-Нур (северо-восточная Монголия) (Болтынская и соавт., 2007). Филогения показала, что последовательность *Halomonas* 3В образует общий кластер с последовательностью типового штамма *H. mongoliensis*, что позволяет его идентифицировать как *Halomonas mongoliensis* 3В. Последовательности двух других штаммов (7В и 7Р) показали более низкий процент гомологии с типовыми штаммами рода *Halomonas*, максимальный отмечен для вида *H. alkalicola* ССС11012s^T (KU530128) и составил 98.4%. Филогенетический анализ показал достаточно высокую поддержку бутстреп анализа для отдельного

кластера, в который вошли, кроме последовательностей анализируемых штаммов *Halomonas* spp. 7В и 7Р, последовательности не идентифицированных до вида представителей DQ435613, GU228482 и GU228482, что позволяет определить только родовую принадлежность этих штаммов.

Морфология клеток. Клетки штамма *H. mongoliensis* 3В являются прямыми короткими толстыми палочками длиной 0.7–2 мкм и толщиной 0.5–1 мкм, двигаются с помощью одного полярного жгутика. Клетки штаммов *Halomonas* spp. 7Р и 7В представляют собой прямые длинные толстые палочки длиной 3–5 мкм и толщиной 0.8–1 мкм. Структура клеточной стенки всех изолятов имеет грамотрицательный тип. На агаризованной среде штаммы образуют округлые кремовые колонии диаметром 2–5 мм, с ровными краями и гладкой, блестящей поверхностью.

Физиология. Исследованные культуры алкалофильных и галофильных представителей рода *Halomonas* способны расти в широком диапазоне концентрации NaCl от 30 до 200 г/л с оптимумом при 50 и 80 г/л (рис. 2а). На основании определения оптимальных параметров и границ роста по отношению к pH штаммы отнесены к умеренным алкалофилам, показан рост в диапазоне pH 8–10 с оптимумом 8–9 (рис. 2б). Обнаружено, что температурный диапазон роста достаточно широкий, при культивировании в оптимальных значениях pH и солености он составил 20–50°C с оптимальным значением 37–40°C (рис. 2в).

Изученные галоалкалофильные бактерии рода *Halomonas* в аэробных условиях способны к окислению широкого спектра органических субстратов и азотистых соединений (табл. 1). Все штаммы из органических кислот используют ацетат, лактат, цитрат и этанол, штаммы *Halomonas* spp. 7В и 7Р дополнительно используют пируват, но ни один из них не использует глицерин.

Для всех штаммов показана способность утилизировать различные сахара, а именно галактозу, глюкозу, фруктозу, рибозу, D-целлобиозу, L-арабинозу, сахарозу и крахмал. Не потребляют рамнозу и D-сорбит. Штамм *H. mongoliensis* 3В также использует D-ксилозу и мальтозу, а штаммы *Halomonas* spp. 7В и 7Р – D-маннозу. Из белковых субстратов все выделенные микроорганизмы активно утилизируют казеин, желатин, триптон и пептон.

Субстратная специфичность внеклеточных пептидаз. Исследование секреции внеклеточных пептидаз у разных видов галоалкалофильных бактерий дает возможность выявлять природные изоляты с высокой ферментативной активностью и различным спектром секретируемых внеклеточных пептидаз.

Галоалкалофильные бактерии рода *Halomonas* были исследованы на способность секретировать

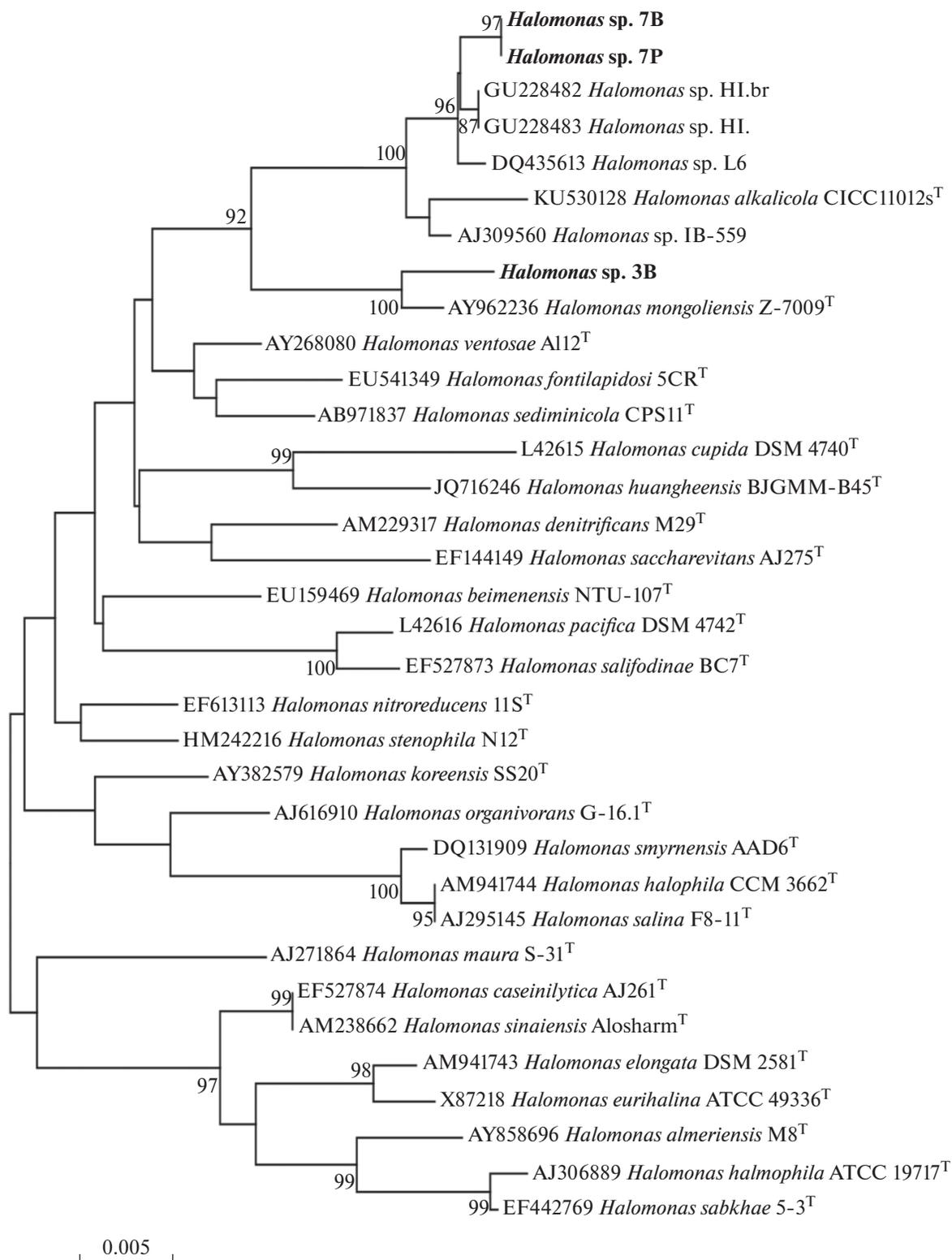


Рис. 1. Филогенетическое дерево бактерий рода *Halomonas*, построенное на основании сравнительного анализа фрагментов гена 16S рРНК. В дерево включены последовательности типовых штаммов. Масштаб соответствует 5 заменам на каждые 1000 п.н. Цифрами в узлах обозначения значения бутстреп анализа выше 85%. Последовательности, полученные в данной работе, выделены жирным шрифтом.

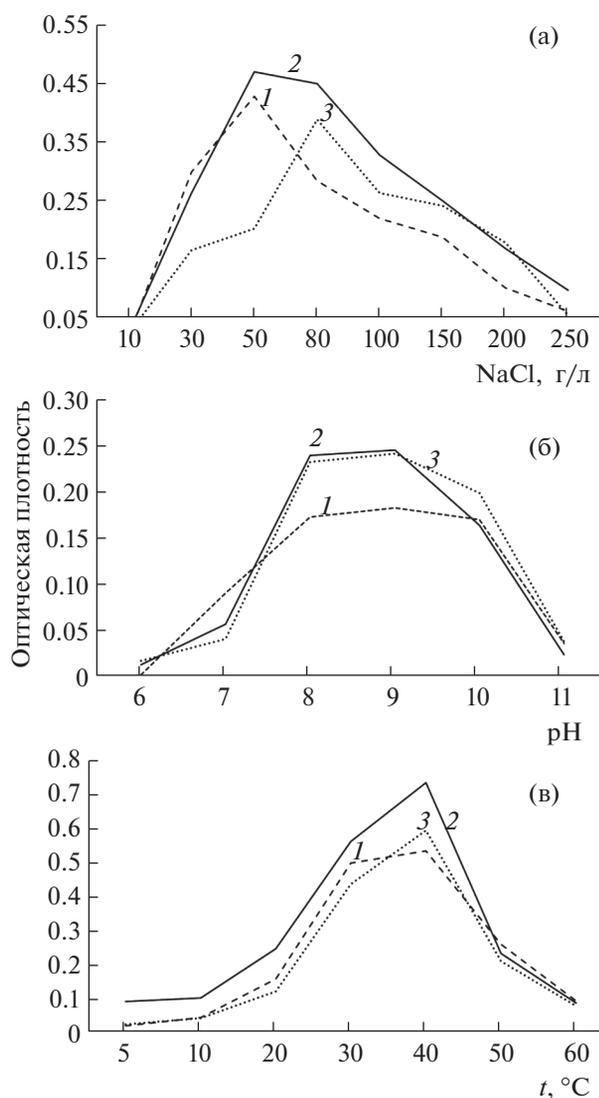


Рис. 2. Влияние концентрации NaCl (а), pH (б) и температуры (в) на удельные скорости роста бактерий рода *Halomonas*: 1 – штамм 3В, 2 – штамм 7В, 3 – штамм 7Р.

внутриклеточные пептидазы, активные на различных *n*-нитроанилидных субстратах, специфичных для субтилизин-подобных, химотрипсин-подобных, трипсин-подобных, аминопептидаз и цистеиновых пептидаз, на средах для культивирования, содержащих следующие источники азота: триптон, пептон и казеин.

Все изученные культуры проявили наибольшую активность в отношении субстрата, специфичного для аминопептидаз – LpNa, на комплексной минеральной среде с различными белковыми субстратами. На рис. 3 показано, что максимальная активность достигалась на белковом субстрате триптоне, где наибольшее значение у штамма *Halomonas* spp. 7Р составляет 0.5 ед. У штаммов *Halomonas* spp. 7В и *Halomonas mongoliensis* 3В значения активности на

триптоне составляли 0.376 и 0.306 ед. соответственно. На казеине и пептоне эти значения варьировали от 0.13 до 0.25 ед., с наименьшей величиной у штамма *Halomonas* spp. 7В. Все штаммы не гидролизуют субстраты, специфичные для субтилизин-подобных, химотрипсин-подобных, трипсин-подобных и цистеиновых пептидаз на всех изученных источниках азота. На субстрате FpNA активности обнаружены в следовых количествах.

Частичная очистка фермента из *H. mongoliensis* 3В. На примере штамма *H. mongoliensis* 3В с помощью использованных методов удалось получить частично очищенный фермент из культуральной жидкости с выходом 4.95%. Количественные характеристики очистки пептидазы из *H. mongoliensis* 3В представлены в табл. 2. Активность пептидаз составила 0.996 ед./мл, экстраполированная молекулярная масса фермента равнялась 208900 Да.

Изучение физико-химических свойств ферментов. Было изучено влияние pH, солености и температуры на активность и стабильность внеклеточных протеолитических ферментов, гидролизующих аминопептидазный субстрат LpNa. Внеклеточные пептидазы были исследованы на оптимум и стабильность при различных значениях pH. Полученные данные показали, что пептидазы из всех штаммов *H. mongoliensis* 3В, *Halomonas* spp. 7Р и 7В имели оптимум активности при pH 8.5–9.0 и стабильность в широком диапазоне pH от 6 до 10 (рис. 4а и 4б). Высокая стабильность исследуемых аминопептидаз в щелочной области, в целом, типична для протеолитических ферментов алкалофильных бактерий.

У пептидаз из галофильных бактерий были также исследованы зависимости секретируемой активности от различных концентраций хлорида натрия (0–300 г/л). Оптимум активности пептидаз штамма *Halomonas* spp. 7Р находится при минерализации 80 г/л, штаммов *Halomonas* spp. 7В и *Halomonas mongoliensis* 3В – от 50 до 100 г/л (рис. 5).

Определение температурного оптимума и стабильности ферментов проведены в диапазоне 5–60°C. Оптимум активности внеклеточных пептидаз штамма *Halomonas* spp. 7Р составил 40°C, у штаммов *Halomonas* spp. 7В и *Halomonas mongoliensis* 3В от 30 до 40°C. Практически все пептидазы исследуемых культур стабильны до 50°C (рис. 6а и 6б). Инкубирование при температуре 60°C в течение 4 ч приводит к практически полной потере ферментативной активности.

Определение природы функциональных групп активного центра. Определение природы функциональных групп активного центра показало, что активность внеклеточных пептидаз по субстрату LpNa у всех изученных штаммов подавлялась специфическим ингибитором металлопептидаз – EDTA (табл. 3). Ингибитор сериновых пептидаз –

Таблица 1. Рост штаммов рода *Halomonas* на различных субстратах

Субстраты	3В	7В	7Р
Ацетат	+	+	+
Лактат	+	+	+
Цитрат	+	+	+
Пируват	–	±	±
Этанол	+	+	+
Глицерин	–	–	–
Лактоза	–	–	–
D-ксилоза	+	–	–
Трегалоza	–	+	+
Сахароза	+	+	+
D-манноза	–	+	+
D-сорбит	–	–	–
L-арабиноза	+	±	±
Рамноза	–	–	–
D-целлобиоза	+	+	+
Рибоза	+	+	+
Крахмал	+	+	+
Фруктоза	+	+	+
Глюкоза	+	+	+
Мальтоза	+	–	–
Галактоза	+	+	+
Пептон	+	+	+
Триптон	+	+	+
Казеин	+	+	+
Желатин	+	+	+

Примечание. “±” – слабый рост; “+” – активный рост; “–” – нет роста.

PMSF либо совсем не оказывал влияния на активность, либо подавлял активность в незначительной степени. На этом основании можно предположить, что секретируемые ферменты исследованных штаммов бактерий преимущественно содержат пептидазы, относящиеся к классу металлопептидаз.

ОБСУЖДЕНИЕ

Из микробных матов содово-соленых озер пустыни Бадаин Жаран, Внутренняя Монголия (Китай) были выделены и охарактеризованы три штамма галоалкалофильных бактерий, обладающих внеклеточной пептидазной активностью. Филогенетический анализ позволил не только установить родовую принадлежность изученных штаммов, но и показал экологическую обособленность галоалкалофильных представителей рода *Halomonas*. Так, типовой штамм вида *Halomonas mongoliensis* Z-7009T выделен из содового озера Дзун-Тухэм-Нур (донный осадок), которое характеризуется щелочным значением pH и содержанием солей до 27 г/л (Болтынская и соавт., 2007). Среди ближайших гомологов штаммов *Halomonas* spp. 7В и 7Р также есть экологически близкие штаммы, выделенные из засоленных почв (*Halomonas* sp. L6, DQ435613) или устойчивые к высокой концентрации солей – нитрата натрия (*Halomonas* sp. IB-559, AJ309560). Так же представляют интерес штаммы *Halomonas* spp. (GU228482 и GU228482), выделенные из биореактора, своим биотехнологическим использованием (McSweeney et al., 2011). Следует также отметить, что кластер, сформированный не идентифицированными до вида бактериями *Halomonas* spp., обособлен с высокой бутстреп поддержкой, а относительно невысокий процент гомологии предполагает возможность последующего описания этих штаммов как нового вида рода *Halomonas*.

Исследование эколого-физиологических свойств (pH, температура и соленость) выделенных бактерий показало, что штаммы являются умеренными алкалофилами и экстремальными галофилами, которые способны гидролизовать казеин, пептон и триптон. Характерно, что штамм *H. mongoliensis* 3В, в отличие от типового штамма *H. mongoliensis* Z-7009, показал более широкий диапазон роста на NaCl. Диапазон роста у исследуемого штамма варьировал от 30 до 200 г/л, тогда как у *H. mongoliensis* Z-7009 – от 0 до 120 г/л. Следует отметить близкий температурный оптимум, определенный для штаммов *Halomonas* spp. 7В и 7Р (40°C) и у их ближайшего гомолога *Halomonas* sp. IB-559, который составил 44°C (McSweeney et al., 2011). К сожалению, в работе нет данных по оптимуму и диа-

Таблица 2. Стадии очистки пептидазы, выделенной из культуральной жидкости штамма *H. mongoliensis* 3В

Стадия очистки	Общий белок, мг	Общая активность, ед.	Удельная активность, ед./мг белка	Степень очистки	Выход, %
Культуральная жидкость	0.99	202.20	203.01	1	100
Диализ	0.46	77.27	167.30	0.83	38.20
Ионообменная хроматография	0.08	10.00	117.65	0.58	4.95

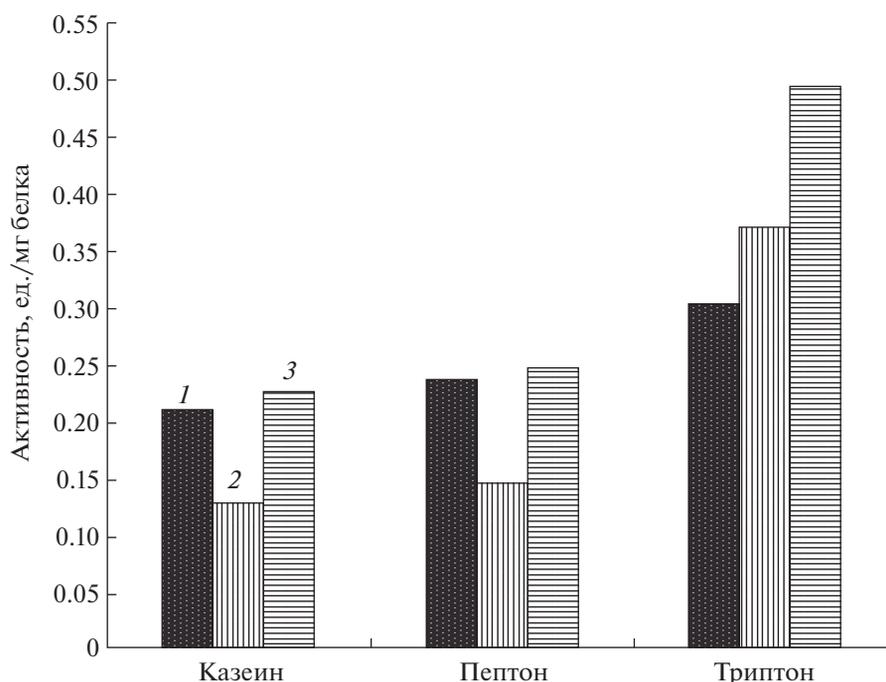


Рис. 3. Субстратная специфичность на *n*-нитроанилидном субстрате аминопептидазы (LpNa) в зависимости от источника азота. Обозначения как на рис. 2.

пазону роста этого штамма при различных значениях pH и солёности. Широкие диапазоны роста по NaCl и pH выделенных бактерий, по-видимому, позволяют приспосабливаться к изменяющимся условиям природных систем в период дождей или засухи. Изученные изоляты отличались широкой метаболической активностью в отношении различных классов органических веществ и в микробном сообществе исследуемых озёр являются активными участниками деструкции органического вещества (Болтынская, 2007).

В настоящее время в литературе представлен ряд публикаций, где изучена аминопептидазная активность у бактерий рода *Halomonas* с использованием ферментативных тестов (In et al., 2005; Rohban et al., 2009; Kumar et al., 2012; De Lourdes Moreno et al., 2013; Anithajothi et al., 2014). Однако работ, посвященных исследованиям активности

и физико-химическим свойствам фермента у *Halomonas*, не обнаружено. Ранее сообщалось, что аминопептидазы изучены у бактерий *Streptomyces* (Uraji et al., 2007; Wu et al., 2010), *Pseudomonas* (Wu et al., 2014), *Bacillus* (Rodríguez-Absi, Prescott, 1978; Pavlova et al., 1989; Lei et al., 2017a, 2017b) и у молочнокислых бактерий (Tchorbanov et al., 2011).

Особенностью изученных нами аминопептидаз у бактерий рода *Halomonas* были щелочность, с оптимумом и стабильностью pH от 6 до 10 и галофильность – изученные аминопептидазы выдерживают солёность до 200 г/л. Так, в работе Uraji et al. (2007) показано, что пролиламинопептидаза из *Streptomyces aureofaciens* TH-3 (TH-3PAP) обладает высокой солеустойчивостью. В результате клонирования и секвенирования гена, ответственного за синтез фермента, предположили, что в его со-

Таблица 3. Влияние ингибиторов на активность пептидаз, выделенных из штаммов рода *Halomonas*

Реагент	Концентрация, М	Остаточная активность пептидаз в штаммах, %		
		3В	7В	7Р
Контроль	0	100	100	100
PMSF	0.1	76.0	100	100
	0.01	87.5	100	100
EDTA	0.1	36.2	16.0	34.2
	0.01	35.7	21.6	36.3

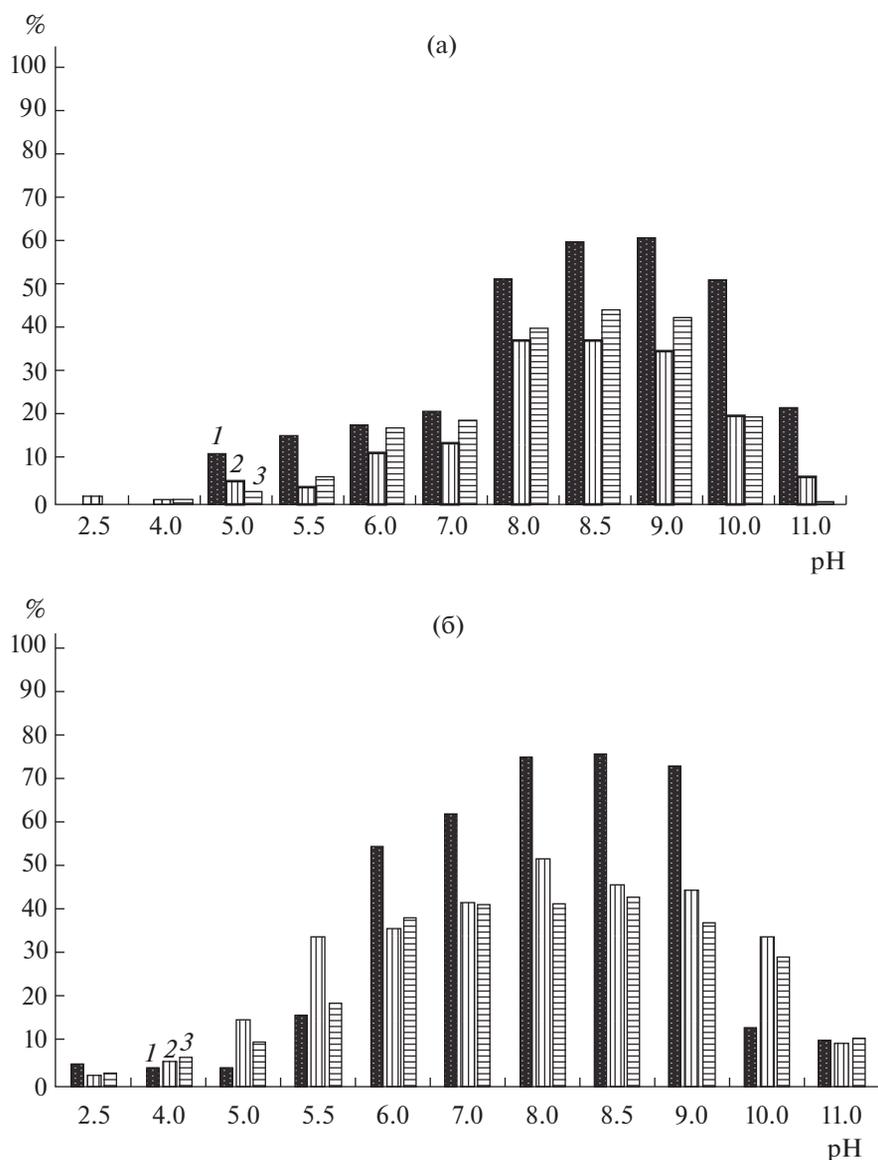


Рис. 4. Оптимум pH (а) и стабильность внеклеточных протеолитических ферментов (б), выделенных из бактерий рода *Halomonas*. Обозначения как на рис. 2.

ставе имеется аминокислотный остаток, обуславливающий солеустойчивость данной бактерии.

Таким образом, полученные результаты показали границы приспособляемости и функционирования выделенных бактерий в экстремальных условиях содово-соленых озер. Анализ внеклеточной пептидазной активности на различных *n*-нитроанилидных субстратах показал наличие только аминокислотной пептидазной активности, что свидетельствует об относительно узкой субстратной специфичности пептидаз у изученных штаммов бактерий. Способность ферментов к расщеплению белков в условиях повышенной минерализации и в щелочных условиях играет важную роль для их жиз-

недеятельности в содовых и соленых местах обитания.

Выделенные штаммы могут быть перспективными объектами для использования: при изготовлении и обработке кожи (обезволаживание шкур, смягчение кожи), в качестве детергента (удаление белковых загрязнений); в биоремедиации; в пищевой промышленности (получение белкового гидролизата, мягчение мяса и рыбы) и в сельском хозяйстве в качестве кормовой добавки.

Работа выполнена в рамках темы госзадания ФАНО госрегистрации № АААА-А17-117011810034-9 и МО РФ № 6.9754.2017/БЧ.

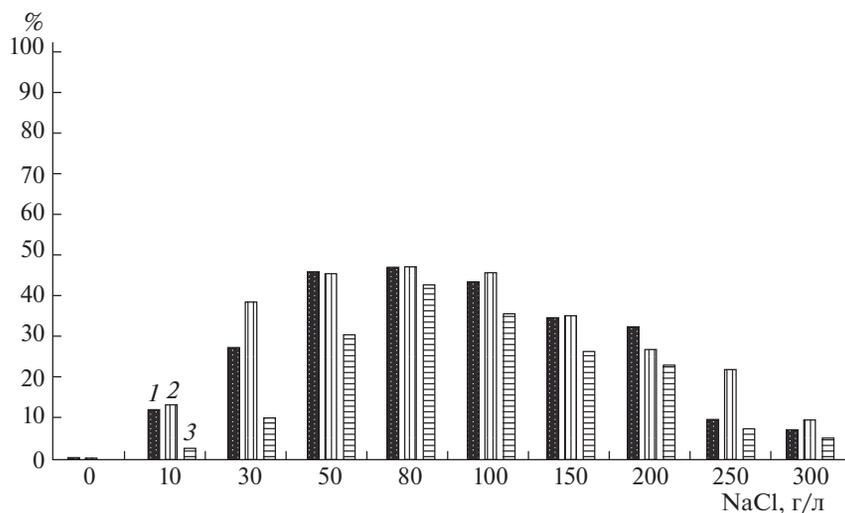


Рис. 5. Оптимум внеклеточных протеолитических ферментов исследуемых бактерий рода *Halomonas* в зависимости от концентрации NaCl. Обозначения как на рис. 2.

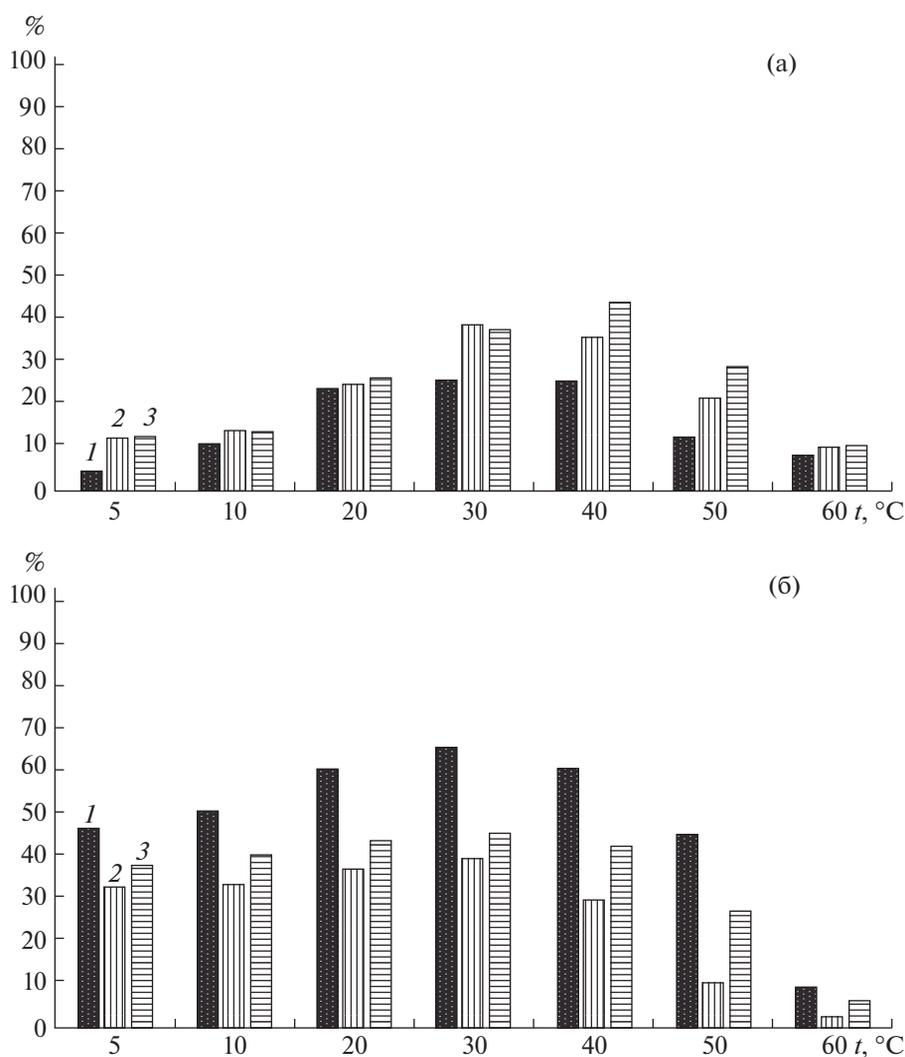


Рис. 6. Температурный оптимум (а) и стабильность внеклеточных протеолитических ферментов (б), выделенных из бактерий рода *Halomonas*. Обозначения как на рис. 2.

Авторы выражают благодарность доктору Джи Фей Ху, Шу Кин Бай, Джинг Ю Ли (Университет Внутренней Монголии, Китай).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Болтянская Ю.В.* Галоалкалофильные денитрифицирующие бактерии рода *Halomonas* из содовых озер // Труды Института микробиологии им. С.Н. Виноградского. Алкалофильные микробные сообщества / Под ред. Гальченко В.Ф. М.: Наука, 2007. С. 276–298.
- Болтянская Ю.В., Кевбрин В.В., Лысенко А.М., Колганова Т.В., Турова Т.П., Осипов Г.А., Жилина Т.Н.* *Halomonas mongoliensis* sp. nov. и *Halomonas kenyensis* sp. nov. – новые галоалкалофильные денитрификаторы из содовых озер, способные к восстановлению N₂O // Микробиология. 2007. Т. 76. № 6. С. 834–843.
- Boltyanskaya Yu.V., Kevbrin V.V., Lysenko A.M., Kolganova T.V., Tourova T.P., Osipov G.A., Zhilina T.N.* *Halomonas mongoliensis* sp. nov. and *Halomonas kenyensis* sp. nov., new haloalkaliphilic denitrifiers capable of N₂O reduction, isolated from soda lakes // Microbiology. 2007. V. 76. P. 739–747.
- Практикум по микробиологии: Учеб. пособие для студ. вузов / Под ред. Нетрусова А.И. М.: Академия, 2005. 608 с.
- Anithajothi R., Nagarani N., Umagowsalya G., Duraikannu K., Ramakritinan C.M.* Screening, isolation and characterization of protease producing moderately halophilic microorganism *Halomonas meridiana* associated with coral mucus // Toxicol. Environ. Chem. 2014. V. 96. P. 296–306.
- Brosius J., Dull T.J., Sleeter D.D., Noller H.F.* Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli* // J. Mol. Biol. 1981. V. 148. P. 107–127.
- De Lourdes Moreno M., Pérez D., García M., Mellado E.* Halophilic bacteria as a source of novel hydrolytic enzymes // Life. 2013. V. 3. P. 38–51.
- Erlanger B.F., Kokowsky N., Cohen W.* The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin // Arch. Biochem. Biophys. 1961. V. 95. P. 271–278.
- Franzetti B., Schoehn G., Hernandez J.F., Jaquinod M., Ruygrok R.W., Zaccai G.* Tetrahedral aminopeptidase: a novel large protease complex from archaea // EMBO J. 2002. V. 21. P. 2132–2138.
- González-Domenech C.M., Martínez-Checa F., Béjar V., Quesada E.* Denitrification as an important taxonomic marker within the genus *Halomonas* // Syst. Appl. Microbiol. 2010. V. 33. P. 85–93.
- Hall T.A.* BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT // Nucl. Acids. Symp. Ser. 1999. V. 41. P. 95–98.
- In M.-J., Oh N.-S., Kim D.C.* Article partial purification and characterization of halotolerant alkaline protease from *Halomonas marisflava* KCCM 10457 isolated from salt-fermented food // Agric. Chem. Biotechnol. 2005. V. 48. P. 75–78.
- Jung W.Y., Lee H.J., Jeon C.O.* *Halomonas garicola* sp. nov., isolated from saeu-jeot, a Korean salted and fermented shrimp sauce // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2016. V. 66. P. 731–737.
- Kim S.J., Lee J.C., Han S.I., Whang K.S.* *Halobacillus salicampi* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from a solar saltern sediment // Antonie Van Leeuwenhoek. 2016. V. 109. P. 713–720.
- Kumar S., Karam R., Kapoor S., Singh S.P., Khare S.K.* Screening and isolation of halophilic bacteria producing industrially important enzymes // Braz. J. Microbiol. 2012. V. 43. P. 1595–1603.
- Lei F., Zhao Q., Sun-Waterhouse D., Zhao M.* Characterization of a salt-tolerant aminopeptidase from marine *Bacillus licheniformis* SWJS33 that improves hydrolysis and debittering efficiency for soy protein isolate // Food Chem. 2017a. V. 214. P. 347–353.
- Lei F., Zhao Q., Lin L., Sun B., Zhao M.* Evaluation of the hydrolysis specificity of an aminopeptidase from *Bacillus licheniformis* SWJS33 using synthetic peptides and soybean protein isolate // J. Agric. Food Chem. 2017b. V. 65. P. 167–173.
- McSweeney N.J., Plumb J.J., Tilbury A.L., Nyeboer H.J., Sumich M.E., McKinnon A.J., Franzmann P.D., Sutton D.C., Kaksonen A.H.* Comparison of microbial communities in pilot-scale bioreactors treating Bayer liquor organic wastes // Biodegradation. 2011. V. 22. P. 397–407.
- Mothe T., Sultanpuram V.R.* Production, purification and characterization of a thermotolerant alkaline serine protease from a novel species *Bacillus caseinolyticus* // 3 Biotech. 2016. 6: 53. P. 1–10. doi 10.1007/s13205-016-0377-y
- Pavlova I.N., Rotanova T.V., Zholne L.G.* Aminopeptidase from a thermophilic strain of *Bacillus licheniformis* // Mikrobiologicheskii Zhurnal. 1989. V. 51. № 2. P. 47–52.
- Porciero S., Receveur-Bréchet V., Mori K., Franzetti B., Rousset A.* Expression, purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis of a deblocking aminopeptidase from *Pyrococcus horikoshii* // Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun. 2005. V. 61. Pt. 2. P. 239–242.
- Rajkumar R., Jayappriyan K.R., Rengasamy R.* Purification and characterization of a protease produced by *Bacillus megaterium* RRM2: Application in detergent and dehairing industries // J. Basic Microbiol. 2011. V. 51. P. 614–624.
- Rodríguez-Absi J., Prescott J.M.* Isolation and properties of an aminopeptidase from *Bacillus licheniformis* // Arch. Biochem. Biophys. 1978. V. 186. P. 383–391.
- Rohban R., Amoozegar M.A., Ventosa A.* Screening and isolation of halophilic bacteria producing extracellular hydrolyses from Howz Soltan Lake, Iran // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2009. V. 36. P. 333–340.
- Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S.* MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0 // Mol. Biol. Evol. 2007. V. 24. P. 1596–1599.
- Tchorbanov B., Marinova M., Grozeva L.* Debittering of protein hydrolysates by *Lactobacillus* LBL-4 aminopeptidase // Enzyme Res. 2011. V. 2011. P. 1–7. Article ID 538676.
- Uraji M., Arima J., Uesugi Y., Iwabuchi M., Hatanaka T.* Effect of salt on the activity of *Streptomyces* prolyl aminopeptidase // Biochim. Biophys. Acta. 2007. V. 1774. P. 1462–1469.
- Wu B., Shi P., Li J., Wang Y., Meng K., Bai Y., Luo H., Yang P., Zhou Z., Yao B.* A new aminopeptidase from the keratin-degrading strain *Streptomyces fradiae* var. k11 // Appl. Biochem. Biotechnol. 2010. V. 160. P. 730–739.
- Wu Y.T., Zhou N.D., Zhou Z.M., Gao X.X., Tian Y.P.* A thermo-stable lysine aminopeptidase from *Pseudomonas aeruginosa*: Isolation, purification, characterization, and sequence analysis // J. Basic Microbiol. 2014. V. 54. P. 1110–1119.

Aminopeptidase Activity of Haloalkaliphilic Bacteria of the Genus *Halomonas* Isolated from the Soda-Saline Lakes in the Badain Jaran Desert

E. B. Erdyneeva¹, A. A. Radnagurueva¹, Ya. E. Dunaevsky², N. L. Belkova³,
Z. B. Namsaraev⁴, and E. V. Lavrentieva^{1, 5, *}

¹*Institute of General and Experimental Biology, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Ulan-Ude, Russia*

²*Lomonosov Moscow State University, Russia*

³*Limnological Institute, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia*

⁴*Kurchatov Institute, Moscow, Russia*

⁵*Buryat State University, Ulan-Ude, Russia*

*e-mail: lena_l@mail.ru

Received December 11, 2017

Abstract—Three strains of haloalkaliphilic bacteria were isolated from microbial mats of soda-saline lakes of the Badain Jaran desert, Inner Mongolia (China). Based on the data on ribosomal phylogeny, they were identified as members of the genus *Halomonas*. These bacteria were moderate alkaliphiles and extreme halophiles. The peptidases secreted by these bacteria were shown to have narrow substrate specificity. They hydrolyzed proteins and *para*-nitroanilide substrates and showed maximal activity in the hydrolysis of L-leucyl-*p*-nitroanilides (LpNA). The maximum activity of the peptidases occurred at alkaline pH values (8–10) and elevated salinity (50–100 g/L); the enzymes were thermostable (up to 50°C). The results of inhibitor analysis and substrate specificity examination of extracellular enzymes indicated them to belong to the class of aminopeptidase-like metallopeptidases.

Keywords: *Halomonas*, aminopeptidases, Badain Jaran desert, saline soda lakes

СУБСТРАТНАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ МЕТАНОГЕННЫХ СООБЩЕСТВ ИЗ ДОННЫХ ОТЛОЖЕНИЙ ОЗ. БАЙКАЛ, АССОЦИИРОВАННЫХ С РАЗГРУЗКАМИ УГЛЕВОДОРОДНЫХ ГАЗОВ

© 2018 г. С. В. Букин^{а,*}, О. Н. Павлова^а, Г. В. Калмычков^б, В. Г. Иванов^а, Т. В. Погодаева^а, Ю. П. Галачьянц^а, Ю. С. Букин^а, А. В. Хабеев^а, Т. И. Земская^а

^аЛимнологический институт СО РАН, Иркутск, Россия

^бИнститут геохимии им. А.П. Виноградова СО РАН, Иркутск, Россия

*e-mail: sergeibukin@lin.irk.ru

Поступила в редакцию 23.03.2018 г.

Экспериментально исследована способность продуцировать метан природными микробными сообществами из осадков озера Байкал с различным химическим составом поровых вод. Более активно метан образовывался на средах с добавлением $H_2 : CO_2$ и $H_2 + CH_3COONa$, чем на средах с ацетатом, служащим в качестве единственного источника углерода и энергии. Добавление метанола стимулировало образование метана только микробными популяциями поверхностных илов. Способность сообществ к образованию метана достоверно коррелировала с содержанием ионов NO_3^- , SO_4^{2-} , Cl^- и CH_3COO^- в поровых водах донных отложений, которые они населяют. При культивировании природных сообществ из донных осадков грязевого вулкана на среде с добавлением $H_2 : CO_2$ и $H_2 + CH_3COONa$ развивались гидрогенотрофные метаногенные археи семейства *Methanocellaceae*, тогда как в составе сообществ, культивированных без дополнительных субстратов, метаногенные археи представлены родами *Methanoregula*, *Methanobacterium* и *Methanosaeta*.

Ключевые слова: метан, донные отложения, микробные сообщества, метаногенные археи, пиросеквенирование, озеро Байкал

DOI: 10.1134/S0026365618040043

Метан — один из ключевых парниковых газов, увеличение эмиссии которого в ближайшем будущем может сыграть главную роль в создании парникового эффекта на Земле. В большинстве пресноводных экосистем метаногенез является основным конечным процессом в цепи анаэробного разложения органического вещества (Vorgel et al., 2011). Основными субстратами для метаногенных архей являются $H_2 : CO_2$, ацетат и метилированные C_1 -соединения, образование метана из которых происходит по гидрогенотрофному, ацетокластическому и метилотрофному/метилредукционному биохимическим путям (Liu et al., 2008; Каллистова и соавт., 2017). Вклад того или иного пути в общую продукцию метана определяется различными факторами, влияющими на конкурентные взаимоотношения в микробных сообществах (Liu et al., 2008; Borrel et al., 2011).

В глубоководных экосистемах основная масса донных отложений характеризуется температурной и геохимической стабильностью. Исключе-

нием являются отложения, находящиеся в районах с высокой тектонической активностью, где восходящие потоки глубинных газо- и нефтенасыщенных флюидов обуславливают поступление в осадки дополнительных источников углерода и энергии (Parkes et al., 2014). Исследования показали, что состав и функционирование популяций метаногенных архей в донных отложениях морских грязевых вулканов (ГВ) и холодных метановых сипов отличаются от таковых в зонах со спокойным осадконакоплением (Nui et al., 2017). Однако мало что известно о влиянии потоков глубинных флюидов на субстратную специфичность метаногенных сообществ в донных отложениях пресноводных озер.

В озере Байкал, несмотря на существующую активность процесса сульфатредукции (Пименов и соавт., 2014), интенсивное образование метана фиксируется даже в поверхностных слоях донных отложений (Дагурова и соавт., 2004). С помощью радиоизотопного метода показано, что в осадках глубоководной зоны озера 75–100% метана обра-

Таблица 1. Характеристики станций пробоотбора

Район	Код керна	Год/ глубина, м	Координаты	Содержание основных ионов в поровых водах, мг/л					Концентрация метана в осадке, ммоль/дм ³
				HCO ₃ ⁻	CH ₃ COO ⁻	Cl ⁻	NO ₃ ⁻	SO ₄ ²⁻	
Сип “Посольская Банка”	1a	2014/505	52°02'09" N 105°50'35" E	50.69–123.76	1.39–3.61	0.73–0.95	0–0.40	0.40–1.29	0.30–4.93
	1б	2015/502	52°02'09" N 105°50'36" E	50.83–139.90	0	1.10–1.87	0	0–0.26	0.37–4.61
Грязевой вулкан “Хобой”	2	2015/536	53°23'59" N 107°53'29" E	46.25–84.71	0	1.12–1.94	0	0.02–0.55	0.004–6.21
Грязевой вулкан “Песчанка”	3	2014/854	52°10'29" N 105°48'33" E	21.00–275.12	0–6.92	0.80–1.69	0–2.14	0.20–13.30	0.001–5.45
Грязевой вулкан “Маленький”	4a	2015/1393	51°55'26" N 105°37'53" E	67.28–77.71	0	1.26–9.19	0–1.10	0.03–5.69	0.0006–0.047
	4б	2015/1361	51°55'12" N 105°38'16" E	76.78–222.02	0	0.95–3.99	0	0.16–1.38	0.02–3.33

зуется из H₂ и CO₂ (Намсараев и соавт., 1995; Zemskaya et al., 2010). О преимущественном образовании метана в ходе CO₂-редукции свидетельствует разница между значениями δ¹³C CO₂ и CH₄ в осадках (Krylov et al., 2010). В то же время, изотопные характеристики биогенного метана, заключенного в структуре байкальских газовых гидратов, свидетельствуют о его образовании по ацетокластическому пути (Nashikubo et al., 2010).

Целью работы было оценить способность образовывать метан на различных субстратах природными микробными сообществами из донных отложений озера Байкал с разным химическим составом поровых вод, а также проанализировать таксономический состав сообществ при культивировании на основных субстратах метаногенеза.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Районы исследования и отбор проб. Для исследования были взяты образцы природных микробных сообществ донных отложений из районов (1) метанового сипа “Посольская Банка” и ГВ: (2) “Хобой”, (3) “Песчанка” и (4) “Маленький”, расположенных в глубоководных (более 500 м) частях южной и средней котловин озера Байкал.

Пробы донных осадков отбирали с помощью гравитационной трубы и грейфера в июле 2014–2015 гг. с борта НИС “Г.Ю. Верещагин”. Характеристики станций и химический состав поровых вод донных отложений приведены в табл. 1.

Химический анализ состава поровых вод и изменение концентраций метана. Определение концентраций углеводородных газов в донных осадках и экспериментальных флаконах выполняли методом фазово-равновесной дегазации Head–Space Technique (Большаков, Егоров, 1987). Содержание метана в газовой фазе определяли на хроматографе “ЭХО–ПИД” (Россия) (пламенно-ионизационный детектор, 2-метровая насадочная колонка с внутренним диаметром 2 мм; сорбент – Porapak Q, режим изотермический, температуры колонки – 100°C, инжектора – 100°C, детектор – 150°C). Объем газа для анализа составлял 0.05 мл. Измерение концентраций метана в атмосфере флаконов с накопительными культурами проводили через 1 ч после внесения осадка и далее каждые 4–17 сут в течение одного года.

Определение химического состава поровых вод исследуемых донных отложений выполняли согласно Погодаевой и соавт. (2007) на базе приборного центра коллективного пользования фи-

зико-химического ультрамикрoанализа ЛИН СО РАН.

Культивирование. Накопительные культуры получали инкубированием образцов донных отложений анаэробно во флаконах со стерильной минеральной средой следующего состава (мг/л): NaCl – 30; NH₄Cl – 33; KH₂PO₄ – 33; MgCl₂ · 6H₂O – 33; CaCl₂ · 2H₂O – 33; NaHCO₃ – 1000; резазурин – 1; Na₂S · 9H₂O – 600; 10 мл раствора витаминов; 10 мл раствора микроэлементов (Практикум по микробиологии, 2005); вода дистиллированная – 980 мл. В опытных вариантах во флаконы вносили следующие субстраты: (1) газовую смесь H₂ : CO₂ (140 ммоль/л : 35 ммоль/л); (2) газовую смесь H₂ : N₂ (140 ммоль/л : 35 ммоль/л) + CH₃COONa (20.5 мМ); (3) CH₃COONa – 20.5 мМ (атмосфера N₂); (4) CH₃OH – 24.7 мМ (атмосфера N₂). В контрольном варианте субстраты не вносили. При приготовлении сред газовую фазу в сосудах заменяли на N₂, H₂ : N₂ или H₂ : CO₂ (конечное давление 1.5 атм.) на установке вакуумной дегазации. После стерилизации вносили витамины и Na₂S · 9H₂O. Конечный pH среды 7.3.

Эксперименты проводили в трех проворностях. Для сохранения психрофильных условий и ускорения процесса метанобразования культивирование проводили в темноте при 10°C на базе УНУ “Экспериментальный пресноводный аквариумный комплекс байкальских гидробионтов” ЛИН СО РАН.

Методы статистического анализа. Перед проведением статического анализа полученные количественные величины каждого признака нормализовали с помощью стандартной метрики.

Для анализа распределения анализируемых проб по совокупности количественных показателей использовали метод многомерной статистики (метод главных компонент) (Айвазян и соавт., 1989).

Взаимосвязь между количественными характеристикам проб и концентрацией метана в пробе определяли корреляционным анализом методом Пирсона. Коэффициент корреляции считали значимым при $p < 0.05$. Для определения влияния качественных параметров на концентрацию образовавшегося метана при разных условиях культивирования использовали однофакторный дисперсионный анализ с учетом статистического критерия Фишера. Значимым для метаногенеза считали влияние фактора при $p < 0.05$.

Выделение ДНК и пироксвенирование. Суммарную ДНК выделяли из накопительных культур в период экспоненциального нарастания концентраций метана в атмосфере флаконов на 100 сут культивирования. Выделяли ДНК модифицированным методом ферментативного лизиса с по-

следующей фенол-хлороформной экстракцией (Sambrook et al., 1989). Для ПЦР-амплификации фрагментов гена 16S рРНК бактерий, включающего переменный участок V3–V5, использовали праймеры U341F (5'-CCTACGGGGRSGCAGCAG-3') и U785R (5'-GGACTACCVGGGTATCTAAKCC-3'). Для ПЦР-амплификации фрагментов гена 16S рРНК архей использовали праймеры для V1–V3 региона: A2Fa (5'-TCCGGTTGATCCTGCC-3') и A519R (5'-GTGCTCCCCCGCCAATTCCT-3'). Пироксвенирование ампликонов осуществляли на геномном анализаторе GS FLX 454 (“Roche”, США) с использованием реагентов серии Titanium по протоколу “GS FLX Titanium Sequencing Method Manual” в соответствии с рекомендациями производителя.

Анализ разнообразия и таксономического состава микробных сообществ накопительных культур проводили с помощью пакета программ Mothur версии v. 1.38.1. Для минимизации последствий случайных ошибок секвенирования использовали алгоритм Pyronoise (Quince et al., 2011). Отобранные последовательности проверяли на наличие химер с помощью программы UCHIME (Edgar et al., 2011). Для проведения таксономического и популяционного анализа сообществ полученные последовательности кластеризовали в оперативные таксономические единицы (ОТЕ) при генетическом расстоянии от 0.01 до 1.0. Для последовательностей, объединенных в ОТЕ с генетической дистанцией 0.03 (97% сходства), проводили таксономическую классификацию путем сравнения с последовательностями 16S рРНК бактерий и архей из референсной базы данных SILVA (http://www.mothur.org/wiki/Silva_reference_files) при 80% доверительном пороге. Из анализа были исключены ОТЕ_{0.03}, содержащие менее 4 последовательностей. Кривые разряжения, индексы богатства (ACE, Chao) и разнообразия (обратный индекс Симпсона) сообществ были просчитаны для каждого образца на основе выявленных ОТЕ с использованием пакета Mothur.

Полученные в работе массивы последовательностей депонированы в базу данных Национального центра биотехнологической информации (NCBI), секцию SRA, под номером PRJNA434024.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Образование метана микробными сообществами осадков метанового сипа. Для культивирования использовали донные осадки двух кернов из района метанового сипа “Посольская Банка”. Химический состав поровых вод в исследуемых кервах соответствовал данным, отмечаемым в фоновых районах (Погодаева и соавт., 2007). В поровых водах керна 1а присутствовал ацетат-ион (1.4–3.5 мг/л), и регистрировали повышенные концентрации иона

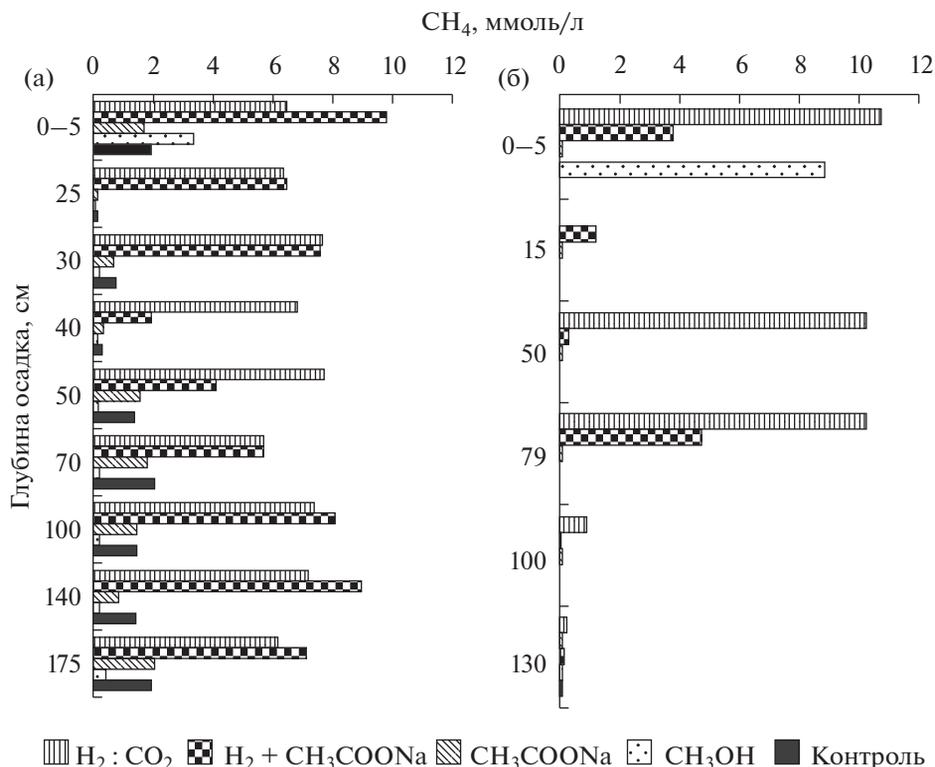


Рис. 1. Наибольшие концентрации метана, зафиксированные в накопительных культурах сообществ осадков метанового сипа за 365 сут культивирования на средах с различными субстратами: а – керн 1а, б – керн 1б.

Fe²⁺ (до 3.6 мг/л в поверхностном слое). Содержание метана отмечали по всей длине кернов, его концентрации варьировали от 0.3 ммоль/дм³ (в поверхностном слое) до 4.9 ммоль/дм³ (50 см).

Генерация метана сообществами донных отложений метанового сипа “Посольская Банка” отмечалась при культивировании на средах с H₂:CO₂ и H₂ + CH₃COONa (рис. 1). Экспоненциальное нарастание концентраций метана в большинстве образцов регистрировалось в период от 45 до 172 сут. В культурах керна 1а количество образовавшегося метана варьировало от 1.86 до 9.82 ммоль/л (рис 1а). В керне 1б, метаногенез отмечали в образцах из поверхностного слоя и слоев соответствующих верхней границе ледниковых глин (50–80 см), во всех случаях наибольшие количества газа генерировали на среде с добавлением H₂:CO₂ (10.1–10.6 ммоль/л) (рис. 1б). Метаногенез на среде с метанолом был зафиксирован только при культивировании сообществ поверхностного слоя обоих кернов. При культивировании сообществ из нижерасположенных слоев кернов добавление метанола подавляло метаногенную активность. Концентрации метана, образовавшегося при культивировании сообществ на среде с ацетатом, были низки и сопоставимы с обнаруженными в контрольных культурах.

Образование метана микробными сообществами осадков грязевых вулканов. Донные осадки в районах грязевых вулканов различались по химическому составу поровых вод. В керне ГВ “Песчанка” (керн 3) в составе поровых вод отмечено присутствие ацетат-иона (до 6.9 мг/л) и повышенные концентрации сульфат- и нитрат-ионов (до 13.3 и 2.1 мг/л соответственно). В поверхностном слое керна 4а (ГВ “Маленький”) выявлены повышенные концентрации нитрат-иона (1.1 мг/л) и ионов Cl⁻ (9.2 мг/л), причем содержание последнего иона более чем в 20 раз превышало значения, отмеченные в фоновых районах озера (Погодаева и соавт., 2007). В отличие от донных отложений метанового сипа, возрастание концентраций метана в осадочной толще грязевых вулканов отмечалось ниже 30–70 см.

При культивировании сообществ из осадков грязевых вулканов увеличение концентраций метана отмечалось при добавлении в среду всех субстратов через 42–62 сут (рис. 2). Следует отметить разный отклик природных сообществ на добавленные субстраты. При культивировании сообществ из ГВ “Песчанка” (керн 3, где в поровых водах ацетат регистрировался изначально) интенсивная генерация метана фиксировалась для образцов из поверхностных слоев на средах с H₂:CO₂ (до 6.7 ммоль/л) и H₂ + CH₃COONa (до 10.2 ммоль/л), а для образцов

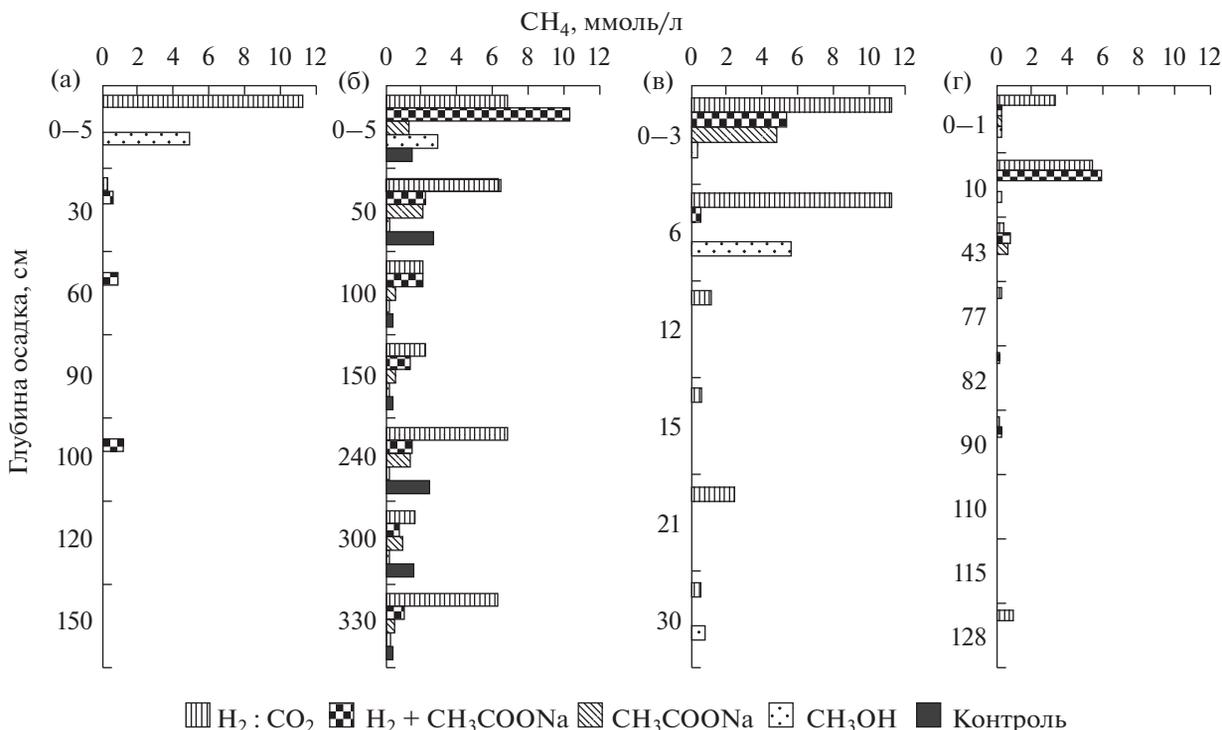


Рис. 2. Наибольшие концентрации метана, зафиксированные в накопительных культурах сообществ осадков грязевых вулканов за 365 сут культивирования на средах с различными субстратами: а – керн 2, б – керн 3, в – керн 4а, г – керн 4б.

из глубинных слоев – только на среде с $H_2 : CO_2$ (до 6.7 ммоль/л) (рис. 2б). В пробах донных отложений других ГВ, не имевших в составе поровых вод ацетат-иона, концентрации образовавшегося метана были максимальны в образцах из поверхностных слоев (рис. 2а, 2в, 2г). Для сообществ поверхностных илов ГВ “Хобой” (керн 2) образование метана отмечалось при добавлении в среду $H_2 : CO_2$, тогда как в образцах из ледниковых глин, процесс фиксировался только при добавлении $H_2 + CH_3COONa$. На среде, где в качестве единственного источника углерода и энергии был ацетат, образование метана отмечалось только в образцах из поверхностных осадков ГВ “Маленький” (0.6–4.8 ммоль/л). Более продуктивно микробные сообщества из этих же образцов образовывали метан на средах с $H_2 : CO_2$ (до 11.2 ммоль/л) и $H_2 + CH_3COONa$ (до 5.9 ммоль/л). Образование метана на среде с метанолом отмечалось при культивировании микробных сообществ поверхностных илов всех исследованных кернов, исключая сообщество из поверхностного слоя осадка керна 4б (рис. 2г).

Статистический анализ показал наличие положительных достоверных связей (рис. 3) между концентрациями метана, образовавшегося при культивировании природных микробных сообществ и содержанием ионов NO_3^- , SO_4^{2-} ,

CH_3COO^- в поровых водах донных отложений, взятых для исследования. Достоверных положительных связей с другими параметрами выявлено не было. Проведенный дисперсионный анализ свидетельствует о том, что способность исследованных сообществ продуцировать метан на разных субстратах индивидуальна.

Разнообразие микробных сообществ метаногенных накопительных культур. Разнообразие сообществ исследовано при культивировании образцов из слоев 5 и 50 см ГВ “Песчанка” (керн 3) на средах с $H_2 : CO_2$ и $H_2 + CH_3COONa$ без и с добавлением субстратов (рис. 2б).

По результатам обработки данных пиросеквенирования получено 12 библиотек, содержащих 78016 бактериальных и 17629 архейных последовательностей фрагментов гена 16S рРНК. Значения индекса разнообразия (ACE) свидетельствуют о том, что для архейной компоненты микробных сообществ количество выявленных ОТЕ_{0.03} составило 44–100% от расчетного (табл. 2). Однако значения индекса Симпсона и Шеннона предполагают малое разнообразие сообществ и численное доминирование в данных образцах представителей одного крупного филотипа, что, в совокупности со значениями индекса Chao1, позволяет говорить о выявлении большинства количественно значимых групп архей.

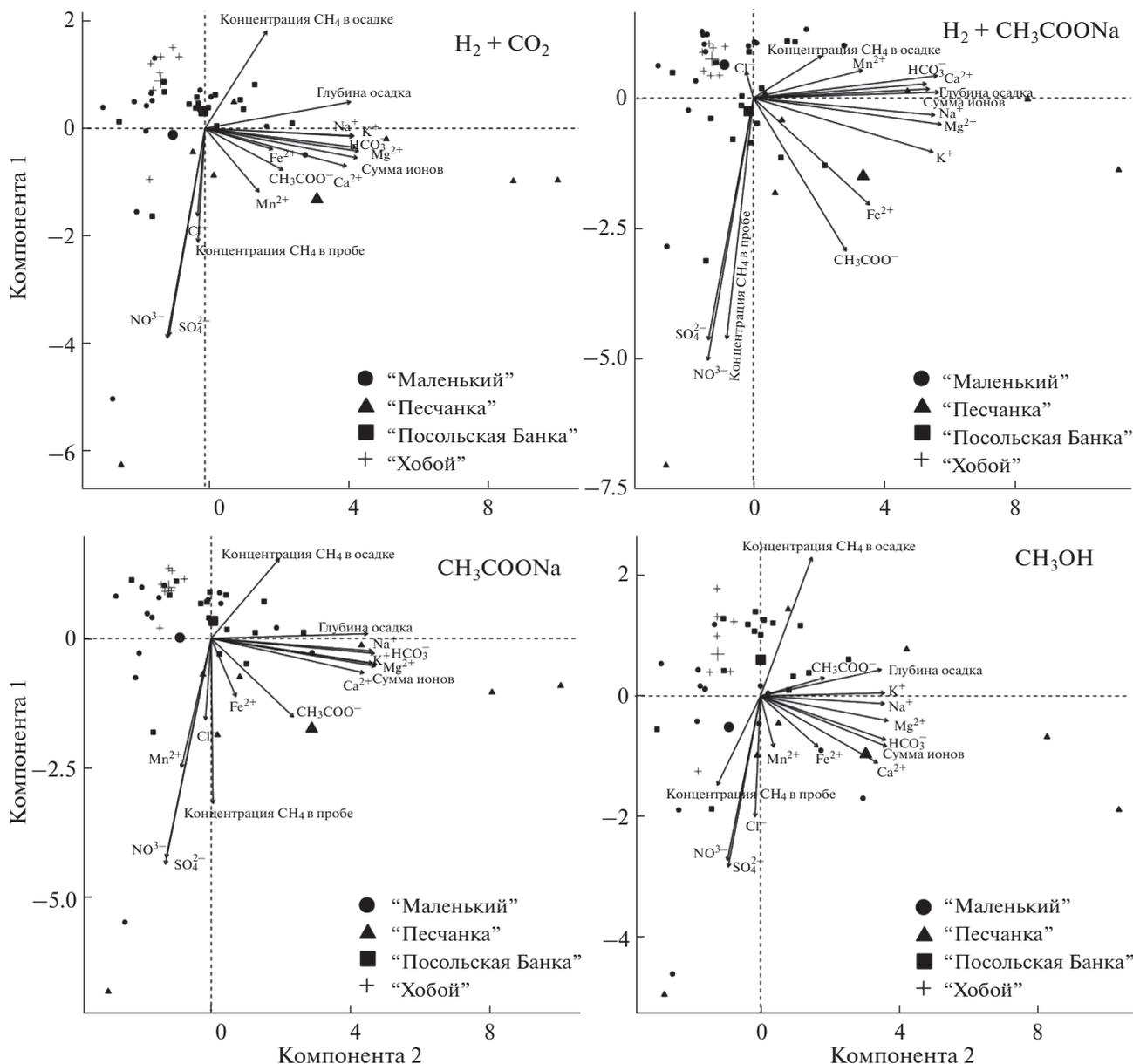


Рис. 3. Диаграмма рассеяния точек в пространстве первых двух главных компонент, построенная на основе количественных характеристик проб. Стрелками отображены векторы, направленные по градиентам изменения оцениваемых показателей проб.

Для бактериальной компоненты сообществ количество выявленных ОТЕ_{0,03} составило 74–95% от расчетного (табл. 2). Кривые разряжения для всех образцов близки к выходу на плато (данные не приведены), что свидетельствует о том, что полученных данных достаточно для оценки разнообразия бактерий.

По результатам анализа таксономического состава архей, в культурах обнаружены представители филумов *Euryarchaeota*, *Bathyarchaeota*, *Thaumarchaeota* и, в минорных количествах — архей филума *Hadesarchaea*. Во всех образцах численно

доминировали микроорганизмы филума *Euryarchaeota* (78.2–99.9%) (рис. 4а).

В библиотеках накопительных культур, обогащенных дополнительными субстратами, большинство последовательностей (56.9–98.6%) принадлежало неидентифицированным археям семейства *Methanocellaceae*, ближайшим культивируемым гомологом для которых, с вероятностью 96%, является гидрогенотрофный метаноген *Methanocella arvoryzae* MRE50 (NR_074232). В культурах из поверхностного слоя осадка также присутствовали миксотрофные метаногенные археи рода *Metha-*

Таблица 2. Индексы видового богатства и разнообразия для библиотек участка гена 16S рРНК бактерий и архей (при кластерном расстоянии 0.03)

Код библиотеки	Образец глубина/субстрат	Количество чтений	Качество покрытия, %	Количество ОТЕ _{0.03}	ACE	Chao1	Обратный индекс Симпсона	Индекс Шеннона
Археи								
5НС	5 см/Н ₂ : СО ₂	7742	99.9	18	20.5	19.5	2.4	1.1
5НА	5 см/Н ₂ + СН ₃ СООNa	2011	99.8	6	13.6	9.0	1.0	0.1
5К	5 см контроль	1522	100.0	7	7.0	7.0	2.0	0.9
50НС	50 см/Н ₂ : СО ₂	2576	99.7	26	30.6	29.7	1.2	0.6
50НА	50 см/Н ₂ + СН ₃ СООNa	2731	99.8	15	19.7	18.3	1.1	0.2
50К	50 см контроль	1110	99.9	24	24.2	24.0	3.5	1.8
Бактерии								
5НС	5 см/Н ₂ : СО ₂	15065	99.8	153	163.2	186.0	5.1	2.2
5НА	5 см/Н ₂ + СН ₃ СООNa	10512	99.9	59	62.5	60.8	3.2	1.8
5К	5 см контроль	7933	99.9	55	57.7	57.5	3.5	2.1
50НС	50 см/Н ₂ : СО ₂	14087	99.8	116	127.2	126.7	3.0	1.8
50НА	50 см/Н ₂ + СН ₃ СООNa	16066	99.9	67	72.5	73.1	2.5	1.2
50К	50 см контроль	14353	99.8	65	87.6	95.0	2.0	1.0

nosarcina (1.2–33.5%), большинство из которых по последовательности участка гена 16S рРНК идентичны метилотрофному штамму *Methanosarcina* sp. Z-7115 (KY780617), недавно изолированному из донных отложений нефтяной разгрузки оз. Байкал (Жилина и соавт., 2017). Помимо метаногенных микроорганизмов, в сообществах, развивающихся на средах с дополнительными источниками углерода и энергии, обнаружены археи филума *Thaumarchaeota* (до 8.3% в образце 5НС) из групп С3 и МG1, в том числе относимые к аммоний-окисляющим микроорганизмам филотипа *Candidatus* “Nitrosoarchaeum”, а также представители филума *Bathyarchaeota* (до 6.0% в образце 50НС), анализ геномов которых позволяет предположить для них ферментативный метаболизм с возможностью продуцировать ацетат в ходе уксуснокислого брожения и автотрофной ассимиляции СО₂. В культурах с горизонта 50 см выявлены микроорганизмы филотипа *Candidatus* “Methanoperedens” (до 1.6% в образце 50НС), для представителей которого показана способность окислять метан по обратному пути метаногенеза, используя в качестве терминального акцептора электронов нитрат.

Состав архей в сообществах контрольных образцов отличался от состава культур, в вариантах обогащения субстратами. Более половины последовательностей в данных пробах (54.0–92.8%) принадлежало метанотрофным микроорганизмам филотипа *Ca*. “Methanoperedens”. Метанобразующие филотипы в сообществе из слоя 5 см (5К) были представлены гидрогенотрофными микроорганизмами рода *Methanoregula* (2.2%), а также, в минорных количествах, семейства *Methanocellaceae* (0.1%). В сообществе из слоя 50 см обнаружены ацетокластические метаногены рода *Methanosaeta* (5.8%) и использующие водород метаногены родов *Methanoregula* (0.5%) и *Methanobacterium* (18.3%), последние из которых идентичны с выделенным из осадков Байкала штаммом *Methanobacterium flexile* Z-7215 (KY780618) (Жилина и соавт., 2017). Доля *Bathyarchaeota* составляла 4.4–15.0%, *Thaumarchaeota* – 5.2% (50К).

Среди бактерий в сообществах всех культур, за исключением 5К, численно доминировали микроорганизмы филума *Firmicutes* (81.0–97.1%), большинство из которых было отнесено к гомоацетогенным сульфатредуцирующим бактериям рода *Desulfosporomusa* (46.0–93.9%) (рис. 46). Помимо *Desulfosporomusa*, класс *Negativicutes* в образ-

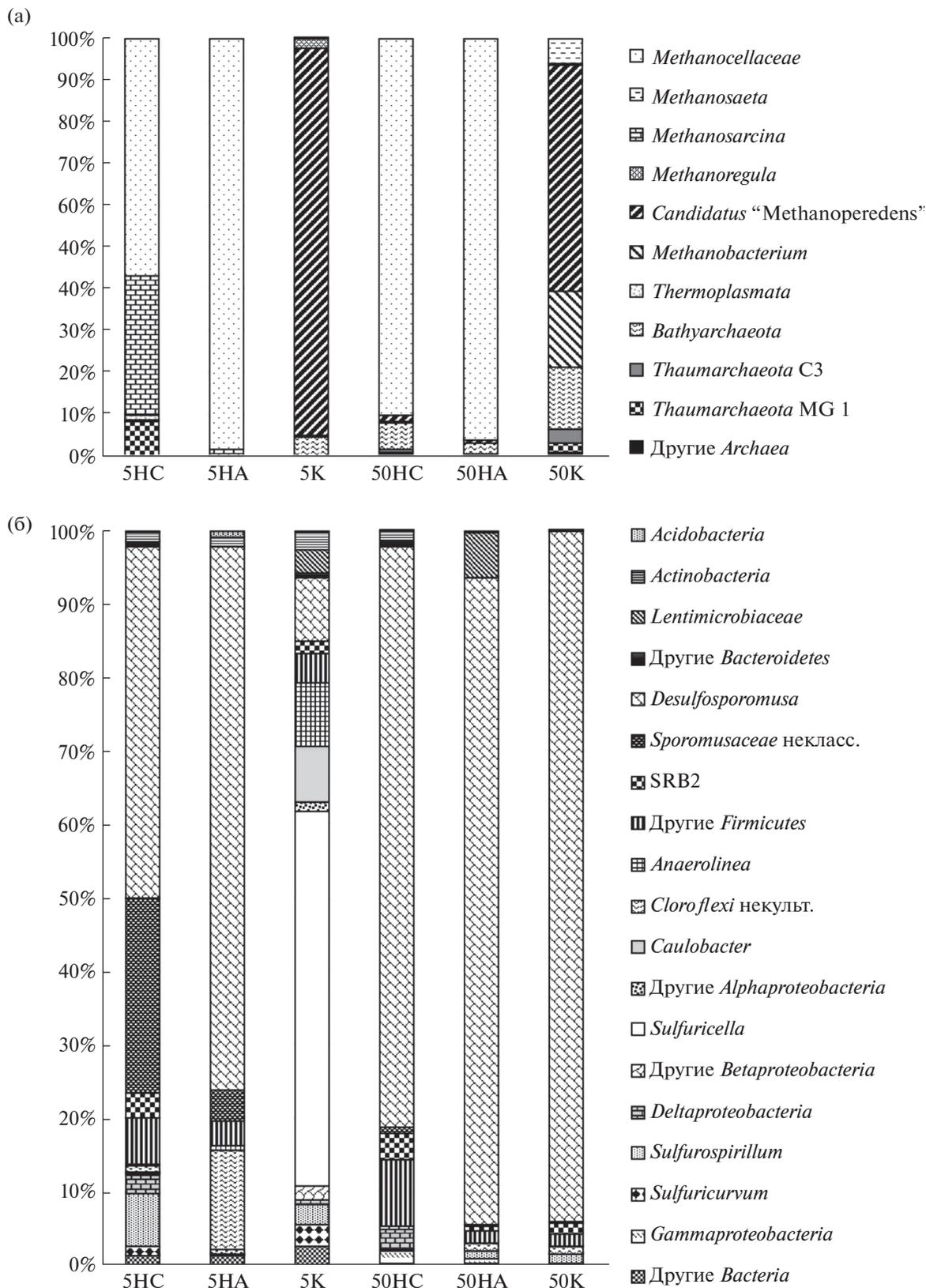


Рис. 4. Состав микробных сообществ из осадков грязевого вулкана "Песчанка", культивированных на средах с $H_2 : CO_2$, $H_2 + CH_3COONa$ и без дополнительных субстратов, по данным анализа последовательностей фрагментов генов 16S рРНК: а – археи, б – бактерии.

цах поверхностного слоя был представлен неидентифицированными микроорганизмами семейства *Sporomusaceae* (4.2–25.7%) и осуществляющими сбраживание органических субстратов бактериями рода *Pelosinus* (до 0.9% в образце 5HC). Среди представителей класса *Clostridia* в сообществах культур были выявлены микроорганизмы фило-типа *Thermoanaerobacterales* – SRB2, которым принадлежало до 3.6% последовательностей в отдельных образцах, а также обладающие ферментативным метаболизмом бактерии родов *Ruminiclostridium* (до 0.8%) *Gracilibacter* (до 0.6%), *Sedimentibacter* (до 0.7%), *Tissierella* (до 0.6%), *Lutispora* (до 0.4%), *Desulfobacterium* (0.8% в образце 50HC) и сульфатредукторы рода *Desulfosporosinus* (2.5% в образце 5HA). Также были идентифицированы микроорганизмы филума *Epsilonproteobacteria*, представленные сульфатредуцирующими бактериями рода *Sulfurospirillum* (до 6.9%), сероокисляющими бактериями рода *Sulfuricurvum* (до 2.8%) и использующими различные акцепторы электронов бактериями рода *Shewanella* (2.5% в образце 50HC), сульфат- и железоредукторами родов *Desulfomicrobium* (до 2.5%), *Desulfobulbus* (до 1.5%), *Desulfobacca* (до 0.1%), *Geobacter* (до 0.3%) из филума *Deltaproteobacteria*, представители филума *Cloroflexi* (1.1–14.2%), некультивируемые бактерии семейства *Corinobacteriaceae* (до 2.2%) филума *Actinobacteria* и др. Кроме того, в культуре 50HA выявлены микроорганизмы недавно открытого семейства *Lentimicrobiaceae* (6.1%) филума *Bacteroidetes*. Единственный культивируемый представитель этого семейства был способен к ферментации широкого спектра углеводов в анаэробных условиях.

Состав бактерий в сообществе образца 5K отличался от сообществ других образцов. Более половины выявленных последовательностей (50.9%) принадлежало микроорганизмам рода *Sulfuricella* (*Betaproteobacteria*), способным в анаэробных условиях автотрофно окислять тиосульфат и молекулярную серу до сульфата, используя нитрат в качестве акцептора электронов. Также в сообществе бактерий выявлены представители родов *Sulfurospirillum* (2.8%), *Sulfuricurvum* (2.8%) и фило-типа SRB2 (1.5%), метаболизм которых связан с анаэробным окислением и/или восстановлением соединений серы. Пул микроорганизмов с потенциально ферментативным типом метаболизма включал бактерии рода *Leptolinea* (7.9%) и некультивируемые микроорганизмы семейства *Anaerolineaceae* (0.6%) филума *Cloroflexi*, некультивируемые бактерии семейств *Coriobacteriaceae* (2.2%) и *Lentimicrobiaceae* (3.1%). Помимо облигатно и факультативно анаэробных микроорганизмов, в сообществе данной накопительной культуры присутствовали аэробные микроорганизмы рода *Caulobacter* (7.5%), являющиеся типичными обитателями олиготрофных экосистем, включая озе-

ро Байкал (Ковадло, Дрюккер, 2006). Отдельные представители *Caulobacter*, способные к восстановлению нитрата, анаэробной деструкции целлюлозы, зачастую выделяются из поверхностных слоев донных отложений.

ОБСУЖДЕНИЕ

Несмотря на различия химического состава поровых вод, микробные сообщества из осадков исследуемых районов проявили сходные субстратные предпочтения, образуя наибольшие концентрации метана на средах с $H_2 : CO_2$ и $H_2 + CH_3COONa$. Анализ состава архей из накопительных культур, содержащих данные субстраты, показал преобладание в них водородокисляющих метаногенов семейства *Methanocellaceae*, что согласуется с ранее полученными данными о генерации метана в ходе CO_2 -редукции в донных отложениях глубоководной зоны озера Байкал (Намсараев и соавт., 1995; Zemskaya et al., 2010). Как показано в ряде исследований, данный путь является основным процессом в донных отложениях некоторых антарктических озер (Galchenko, 1994; Wand et al., 2006), озер Тибетского нагорья (Liu et al., 2017), а также в вечномёрзлых почвах (Rivkina et al., 2007). В то же время, его доминирование нехарактерно для осадков многих других стратифицированных озер, где основным предшественником метана является ацетат (Glissmann et al., 2004; Nozhevnikova et al., 2007). Вклад того или иного пути в общую продукцию метана в донных отложениях пресноводных озер может определяться не только температурным фактором, но и степенью гумифицированности ОВ. Деструкция ОВ с высоким содержанием гуминовых кислот в анаэробных условиях осадочной толщи, в основном, приводит к образованию H_2 , а не ацетата, обеспечивая, таким образом, преобладание гидрогенотрофного пути метаногенеза (Congrad et al., 2010; Liu et al., 2017). В осадках озера Байкал содержание углерода гуминовых кислот в поверхностном слое варьирует от 0.37 до 0.94% при средней концентрации органического углерода 1.9% (Выхристюк, 1977). По другим данным, в диатомовых илах озера ОВ может быть почти полностью представлено гуминовыми кислотами (Гавшин и соавт., 1994). Следует отметить, что низкая продуктивность ацетокластического метаногенеза в исследованных нами районах, вероятно, не является следствием низких концентраций ацетата. В холодноводных экосистемах, помимо процессов анаэробной деструкции ОВ, источником ацетата может служить деятельность автотрофных гомоацетогенных бактерий (Kotsyurbenko et al., 2005). В сообществах анализируемых образцов нами отмечена большая доля ацетогенных бактерий, которые могут активно участвовать в образовании ацетата в исследуемых осадках. Скорее всего, кроме доступности

субстрата, следует предполагать наличие других факторов, ограничивающих активность ацетокластических метаногенов в донных отложениях глубоководной зоны озера Байкал.

При использовании метанола в качестве единственного источника углерода и энергии образование метана зафиксировано только при культивировании сообществ из поверхностного слоя донных отложений. Способность сообществ к утилизации этого субстрата может объясняться поступлением метанола из зоны активного аэробного окисления метана на границе вода–донные отложения. В отсутствие водорода образование метана из метанола может осуществляться напрямую в результате жизнедеятельности метилотрофных метаногенных архей рода *Methanosarcina* (Liu et al., 2013) и, вероятно, отдельных представителей филума *Bathyarchaeota* (Evans et al., 2015). Также возможен путь синтрофной утилизации метанола в консорциумах анаэробных метилотрофных бактерий и гидрогенотрофных метаногенов (Тарасов и соавт., 2011).

Проведенное исследование показывает, что в зонах разгрузок активные метаногенные сообщества могут населять как поверхностные илы, так и глинистые слои донных отложений. С увеличением глубины осадка нами не выявлен переход от преимущественного образования метана на субстратах гидрогенотрофного метаногенеза к использованию ацетата. В связи с этим, роль метаногенных сообществ поверхностных и подповерхностных слоев осадка в формировании газовых гидратов остается под вопросом. Более вероятно, что биогенный метан байкальских газовых гидратов, образованный по ацетокластическому пути, продуцируется сообществами глубинных слоев донных отложений.

Геохимические исследования выполнены в рамках государственного задания по теме 0345–2016–0007, молекулярно-биологический анализ за счет гранта РФФИ № 16-04-00181_а, микробиологические исследования за счет гранта РФФИ № 18-34-00435_мол_а.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Айвазян С.А., Бухштабер В.М., Енюков И.С., Мешалкин Л.Д. Прикладная статистика. Классификация и снижение размерности. М.: Финансы и статистика. 1989. 607 с.
- Большаков А.М., Егоров А.В. Об использовании методики фазово-равновесной дегазации при газометрических исследованиях в акваториях // Океанология. 1987. Т. 37. № 5. С. 861–862.
- Выхристюк Л.А. О поступлении и распределении основных химических элементов в донных отложениях Байкала // Литология и полезные ископаемые. 1977. № 1. С. 54–65.
- Гавшин В.М., Бобров В.А., Богданов Ю.А. Урановые аномалии в глубоководных отложениях озера Байкал // ДАН. 1994. Т. 334. № 3. С. 356–359.
- Дагурова О.П., Намсараев Б.Б., Козырева Л.П., Земская Т.И., Дулов Л.Е. Бактериальные процессы цикла метана в донных осадках озера Байкал // Микробиология. 2004. Т. 74. № 2. С. 248–257.
- Dagurova O.P., Namsaraev B.B., Kozyreva L.P., Zemskaya T.I., Dulov L.E. Bacterial processes of the methane cycle in bottom sediments of Lake Baikal // Microbiology (Moscow). 2004. V. 74. № 2. P. 202–210.
- Жилина Т.Н., Груздев Д.С., Колганова Т.В., Пименов Н.В. Метаногены и ацетогены в анаэробных илах над газогидратами и в зонах нефтепроявления озера Байкал // I Российский микробиологический конгресс. Пушкино, 2017: сборник тезисов / Под ред. Решитиловой Т.А. М.: ООО “ИД Вода: химия и экология”. 2017. С. 44–45.
- Каллистова А.Ю., Меркель А.Ю., Тарновецкий И.Ю., Пименов Н.В. Образование и окисление метана прокариотами // Микробиология. 2017. Т. 86. № 3. С. 411–417.
- Kallistova A.Y., Merkel A.Y., Tarnovetskii I.Y., Pimenov N.V. Methane formation and oxidation by prokaryotes // Microbiology (Moscow). 2017. V. 86. P. 671–691.
- Ковадло А.С., Дрюккер В.В. Распространение бактерий рода *Caulobacter* (Henrici and Johnson, 1935) в озере Байкал // Сиб. экол. журн. 2006. № 5. С. 581–585.
- Kovadlo A.S., Drucker V.V. Occurrence of the bacteria of *Caulobacter* genus (Henrici and Johnson, 1935) in Lake Baikal // Contemporary Problems of Ecology (Novosibirsk). 2006. № 5. P. 581–585.
- Намсараев Б.Б., Дулов Л.Е., Соколова Е.Н., Земская Т.И. Бактериальное образование метана в донных осадках озера Байкал // Микробиология. 1995. Т. 64. № 3. С. 411–417.
- Практикум по микробиологии. Под ред. Нетрусова А.И. М.: Академия, 2005. 608 с.
- Пименов Н.В., Захарова Е.Е., Брюханов А.Л., Корнеева В.А., Кузнецов Б.Б., Турова Т.П., Погодаева Т.В., Калмычков Г.В., Земская Т.И. Активность и структура сообщества сульфатредуцирующих бактерий в осадках южной котловины оз. Байкал // Микробиология. 2014. Т. 83. № 2. С. 180–190.
- Pimenov N.V., Zakharova E.E., Bryukhanov A.L., Korneeva V.A., Kuznetsov B.B., Tourova T.P., Pogodaeva T.V., Kalmychikov G.V., Zemskaya T.I. Activity and structure of the sulfate-reducing bacterial community in the sediments of the southern part of Lake Baikal // Microbiology (Moscow). 2014. V. 83. P. 180–190.
- Погодаева Т.В., Земская Т.И., Голобокова Л.П., Хлыстов О.М., Минами Х., Сакагами Х. Особенности химического состава поровых вод донных отложений различных районов озера Байкал // Геология и геофизика. 2007. Т. 48. № 11. С. 1144–1160.
- Pogodaeva T.V., Zemskaya T.I., Golobokova L.P., Khlystov O.M., Minami H., Sakagami H. Chemical composition of pore waters of bottom sediments in different Baikal basins // Russian Geol. Geophys. (Novosibirsk). 2007. V. 48. P. 886–900.
- Тарасов А.Л., Борзенков И.А., Беляев С.С. Исследование связей анаэробных микроорганизмов из подземного хранилища газа в процессе утилизации метанола // Микробиология. 2011. Т. 80. № 2. С. 192–199.

- Tarasov A.L., Borzenkov I.A., Belyayev S.S. Investigation of the trophic relations between anaerobic microorganisms from an underground gas repository during methanol utilization // *Microbiology (Moscow)*. 2011. V. 80. P. 180–187.
- Borrel G., Jézéquel D., Biderre-Petit C., Morel-Desrosiers N., Morel J.-P., Peyret P., Fonty G., Lehours A.-C. Production and consumption of methane in freshwater lake ecosystems // *Res. Microbiol.* 2011. V. 162. P. 832–847.
- Conrad R., Claus P., Casper P. Stable isotope fractionation during the methanogenic degradation of organic matter in the sediment of an acidic bog lake, Lake Grosse Fuchskuhle // *Limnol. Oceanogr.* 2010. V. 55. P. 1932–1942.
- Edgar R.C., Haas B.J., Clemente J.C., Quince C., Knight R. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection // *Bioinformatics*. 2011. V. 27. № 17. P. 2194–2200.
- Evans P.N., Parks D.H., Chadwick G.L., Robbins S.J., Orphan V.J., Golding S.D., Tyson G.W. Methane metabolism in the archaeal phylum *Bathyarchaeota* revealed by genome-centric metagenomics // *Science*. 2015. V. 350. № 6259. P. 434–438.
- Galchenko V.F. Sulfate reduction, methane production and methane oxidation in various waterbodies of Bunge Hills Oasis of Antarctica // *Microbiology*. 1994. V. 63. P. 388–396.
- Glissman K., Chin K.-J., Casper P., Conrad R. Methanogenic pathway and archaeal community structure in the sediment of eutrophic Lake Dagow: Effect of temperature // *Microbial Ecol.* 2004. V. 48. P. 389–399.
- Hachikubo A., Khlystov O., Krylov A., Sakagami H., Minami H., Nunokawa Y., Yamashita S., Takahashi N., Shoji H., Nishio S., Kida M., Ebinuma T., Kalmychkov G., Poort J. Molecular and isotopic characteristics of gas hydrate-bound hydrocarbons in southern and central Lake Baikal // *Geo-Mar. Lett.* 2010. V. 30. № 3–4. P. 321–329.
- Kotsyurbenko O.R. Trophic interactions in the methanogenic microbial community of low-temperature terrestrial ecosystems // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2005. V. 53. P. 3–13.
- Krylov A.A., Khlystov O.M., Hachikubo A., Minami H., Nunokawa Y., Shoji H., Zemskaya T.I., Naudts L., Pogodaeva T.V., Kida M., Kalmychkov G.V., Poort J. Isotopic composition of dissolved inorganic carbon in subsurface sediments of gas hydrate-bearing mud volcanoes, Lake Baikal: implications for methane and carbonate origin // *Geo-Mar. Lett.* 2010. T. 30. P. 427–437.
- Liu Y., Whitman W.B. Metabolic, phylogenetic and ecological diversity of the methanogenic Archaea // *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2008. V. 1125. P. 171–189.
- Liu Y., Yao T., Gleixner G., Claus P., Conrad R. Methanogenic pathways, ¹³C isotope fractionation, and archaeal community composition in lake sediments and wetland soils on the Tibetan plateau // *J. Geophys. Res. Biogeosci.* 2013. V. 118. P. 650–664.
- Liu Y., Conrad R., Yao T., Gleixner G., Claus P. Change of methane production pathway with sediment depth in a lake on the Tibetan plateau // *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*. 2017. V. 474. P. 279–286.
- Nozhevnikova A.N., Nekrasova V., Ammann A., Zehnder A.J.B., Wehrli B., Holliger C. Influence of temperature and high acetate concentrations on methanogenesis in lake sediment slurries // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2007. V. 62. P. 336–344.
- Niu M., Fan X., Zhuang G., Liang Q., Wang F. Methane-metabolizing microbial communities in sediments of the Haima cold seep area, northwest slope of the South China Sea // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2017. V. 93. № 9. fix101. <https://doi.org/10.1093/femsec/fix101>.
- Parkes R.J., Cragg B., Roussel E., Webster G., Weightman A., Sass H.A. A review of prokaryotic populations and processes in sub-seafloor sediments, including biosphere: geosphere interactions // *Mar. Geol.* 2014. V. 352. P. 409–425.
- Quince C., Lanzen A., Davenport R.J., Turnbaugh P.J. Removing noise from pyrosequenced amplicons // *BMC Bioinf.* 2011. V. 12. № 38. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-38>.
- Rivkina E., Shcherbakova V., Laurinavichius K., Petrovskaya L., Krivushin K., Kraev G., Pecheritsina S., Gilichinsky D. Biogeochemistry of methane and methanogenic archaea in permafrost // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2007. V. 61. P. 1–15.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. NY: Cold Spring Harbor, 1989. V. 2. 545 p.
- Wand U., Samarkin V.A., Nitzsche H.-M., Hubberten H.-W. Biogeochemistry of methane in the permanently ice-covered Lake Untersee, central Dronning Maud Land, East Antarctica // *Limnol. Oceanogr.* 2006. V. 51. P. 1180–1194.
- Zemskaya T.I., Pogodaeva T.V., Shubenkova O.V., Chernitsina S.M., Dagurova O.P., Buryukhaev S.P., Namsaraev B.B., Khlystov O.M., Egorov A.V., Krylov A.A., Kalmychkov G.V. Geochemical and microbiological characteristics of sediments near the Malenky mud volcano (Lake Baikal, Russia), with evidence of Archaea intermediate between the marine anaerobic methanotrophs ANME-2 and ANME-3 // *Geo-Mar. Lett.* 2010. V. 30. P. 411–425.

Substrate Specificity of Methanogenic Communities from Lake Baikal Bottom Sediments Associated with Hydrocarbon Gas Discharge

S. V. Bukin^{1,*}, O. N. Pavlova¹, G. V. Kalmychkov², V. G. Ivanov¹, T. V. Pogodaeva¹, Yu. P. Galach'yants¹, Yu. S. Bukin¹, A. V. Khabuev¹, and T. I. Zemskaya¹

¹*Limnological Institute, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia*

²*Vinogradov Institute of Geochemistry, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia*

*e-mail: sergeibukin@lin.irk.ru

Received December 11, 2017

Abstract—Methane production by microbial communities from Lake Baikal bottom sediments with different chemical composition of pore water was studied. Methane production was more active in the media supplemented with H₂ : CO₂ and H₂ + CH₃COONa, rather than on media with acetate as the sole source of carbon

and energy. Addition of methanol stimulated methane production only in the case of microbial communities from upper silts. Ability of the communities to produce methane correlated reliably with the concentrations of the NO_3^- , SO_4^{2-} , Cl^- , and CH_3COO^- ions in the pore water of the relevant sediments. Cultivation of communities from the mud volcano sediments resulted in development of methanogenic archaea of the family *Methanocellaceae* in the media supplemented with $\text{H}_2 : \text{CO}_2$ and $\text{H}_2 + \text{CH}_3\text{COONa}$, while methanogenic archaea in the communities cultivated without additional substrates belonged to the genera *Methanoregula*, *Methanobacterium*, and *Methanosaeta*.

Keywords: methane, bottom sediments, microbial communities, methanogenic archaea, high-throughput sequencing, Lake Baikal

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИ

СТРУКТУРА МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ В ОСАДКАХ ЩЕЛОЧНЫХ
ОЗЕР ЗАБАЙКАЛЬЯ С РАЗЛИЧНОЙ МИНЕРАЛИЗАЦИЕЙ

© 2018 г. С. В. Зайцева^а, *, Е. Ю. Абидуева^а, А. А. Раднагуруева^а,
С. М. Базаров^а, С. П. Бурюхаев^а

^аИнститут общей и экспериментальной биологии СО РАН, Улан-Удэ, Россия

*e-mail: svet_zait@mail.ru

Поступила в редакцию 11.12.2017 г.

Целью исследования было выявление изменений в структуре микробных сообществ щелочных озер Забайкалья, связанных с различиями в минерализации и гидрохимических показателях. Объектами исследований были соленые озера Верхнее Белое (Республика Бурятия, Россия), а также Хилганта, Горбунка и Борзинское (Забайкальский край, Россия) с минерализацией от 12.3 до 430 г/л, различающиеся минеральным составом осадков и гидрохимическими параметрами. В осадках озер были определены 47 прокариотных филумов, в том числе 42 бактериальных и 5 архейных. Доминировали филумы *Proteobacteria*, *Euryarchaeota*, *Bacteroides*, *Chloroflexi*, *Actinobacteria* и *Firmicutes*, составляющие более 95% от числа классифицированных последовательностей. Сравнительное обилие архей возрастало с градиентом солёности: от менее чем 1% в оз. Верхнее Белое до 35% в оз. Борзинское. Наиболее многочисленные бактериальные ОТЕ представлены гаммапротеобактериями рода *Halomonas* – до 15% от числа классифицированных последовательностей. Наиболее многочисленные архейные ОТЕ были классифицированы на уровне рода как представители родов *Halorubrum* и *Halohasta*, принадлежащих к семейству экстремально-галофильных эвриархей *Halorubraceae*.

Ключевые слова: микробное разнообразие, соленые озера, высокопроизводительное секвенирование, 16S рНК

DOI: 10.1134/S0026365618040183

Мелководные соленые и солоноватые озера, характерные для ландшафтов и климатических аридных условий региона Северной Азии, отличаются нестабильным водным режимом, полным промерзанием в зимний период, значительными колебаниями солёности и температуры воды (Namsaraev et al., 2015). Исследования функционального разнообразия содовых и соленых озер Забайкалья и Монголии показали, что в микробных сообществах активно проходят процессы продукции и деструкции органического вещества (Горленко и соавт., 1999; Sorokin et al., 2004, 2011). Метаболическое и филогенетическое разнообразие микробных сообществ воды и осадков содовых озер было определено с использованием методов молекулярной биологии (Foti et al., 2006, 2008; Wu et al., 2009; Sorokin et al., 2011; Xiong et al., 2012; Baatar et al., 2016; Zhong et al., 2016). Донные осадки соленых озер представляют собой модель для изучения пространственно-временных процессов микробной экологии за счет четкой вертикальной структуры, значительных химических градиентов и наличия кислородных микрозон (La Sopo et al., 2013). В результате проведенных ранее микробиологических исследований щелочных

озер Забайкалья были выделены культуры бактерий и архей, включая галофильные цианобактерии (Цыренова и соавт., 2011а, 2011б), умеренно галофильные целлюлолитические бактерии (Козырева и соавт., 2014), галофильные алкалофильные сульфатредуцирующие бактерии (Foti et al., 2007; Sorokin et al., 2012; Zakharyuk et al., 2015) и экстремально галофильные археи (Sorokin et al., 2017). Из донных осадков оз. Хилганта был выделен новый вид алкалофильных спорообразующих бактерий *Alkaliphilus namsaraevii*, способный восстанавливать железо и серу в сильнощелочных условиях, pH 10.7 (Zakharyuk et al., 2017). В наших предыдущих работах были определены скорости микробных процессов продукции и деструкции органического вещества (Зайцева и соавт., 2012; Namsaraev et al., 2015) и исследовано таксономическое разнообразие слабо минерализованных озер.

Целью данного исследования было выявить изменения в структуре микробных сообществ, связанные с различиями в минерализации и изменении гидрохимических показателей, на примере озер Забайкалья, находящихся в сходных географических и климатических условиях. В ка-

честве объекта исследований выступили соленые озера Верхнее Белое (Республика Бурятия, Россия), а также Хилганта, Горбунка и Борзинское (Забайкальский край, Россия) с минерализацией от 12.3 до 430 г/л. Было показано влияние солёности на разнообразие бактерий и архей в микробных сообществах осадков в сильнощелочных условиях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Физико-химические параметры придонной воды и осадков были определены непосредственно в местах отбора проб с использованием портативных приборов: температура и pH (PH-200 NM Digital, Южная Корея); окислительно-восстановительный потенциал (Eh) (ORP-169B Kelilong, Китай); содержание растворенного кислорода (портативный анализатор Oxi 315i, "WTW", Германия); минерализация воды (тест-кондуктометр TDS-4, Сингапур). Макро- и микрокомпонентный ионный состав проб определяли в лабораторных условиях. Содержание ионов аммония определяли фотометрическим методом с реактивом Несслера; нитрат-ионов – фотометрическим методом с салициловой кислотой; нитрит-ионов – фотометрическим методом с реактивом Грисса; сульфат-ионов – турбидиметрическим методом; ионов хлора – аргентометрическим методом; карбонатов и гидрокарбонатов – титрованием соляной кислотой с использованием в качестве индикаторов фенолфталеина и метилоранжа (Полевой практикум по водной микробиологии и гидрохимии, 2005). Рентгенофазовый анализ (РФА), позволяющий разделить и идентифицировать состав минералов в образцах осадков, проводили на дифрактометре Phaser 2D фирмы "Bruker" ($\text{CuK}_{\alpha 1}$ – излучение). Количественный рентгенофазовый анализ был выполнен после идентификации минералов в донных отложениях с использованием банка ICDD PDF Realase 2012 методом наложения, основанным на сравнении рентгенограмм исследуемого образца и рентгенограмм отдельных составляющих в чистом виде с использованием интерфейса Diffrac.Eva v. 3.0. Точность анализа составляла 2–3%, а чувствительность 1–2% (Васильев, 1986).

Определение скоростей основных микробиологических процессов проводили с помощью радиоизотопного метода (Namsaraev et al., 2015). Измерение скорости световой и темновой ассимиляции углекислоты проводили с использованием ^{14}C -минерального углерода (карбоната).

Для проведения молекулярных исследований 5–10 г поверхностного слоя (0–1 см) осадков из прибрежной зоны озер были отобраны в 50-мл пластиковые флаконы (BD Falcon TM, "Greiner

Bio-One", Германия), которые затем помещали в холодильник и хранили при 4°C.

Аmplификация и секвенирование гена 16S рРНК. ДНК из образцов осадков были выделены в соответствии со статьей Lever et al. (2015). Амплификацию переменных V3–V4 участков генов 16S рРНК и подготовку библиотек проводили по ранее описанным методикам с незначительными модификациями (Fadrosh et al., 2012).

Для амплификации использовали набор праймеров: forward primer (5'-CAAGCAGAAGACGG-CATACGAGATGTGACTGGAGTTCAGACGTGT-GCTCTTCCGATCT XXXXXXXXXXXXX ZZZZ CCTAYGGGDBGCWSCAG-3'), содержащий 5' Illumina Linker Sequence, Index 1, Heterogeneity Spacer (Fadrosh et al., 2012) и Pro-mod-341F Primer Sequence (Merkel et al., 2017) соответственно и реверсный праймер (5'-AATGATACGCGACCAC-CGAGATCTACACTCTTCCCTACACGACGCT-CTTCCGATCT XXXXXXXXXXXXX ZZZZ GAC-TACNVGGGTMTCTAATCC-3'), содержащий 3' Illumina Linker Sequence, Index 2, Heterogeneity Spacer и Pro-mod-805R Primer Sequence (Merkel et al., 2017) соответственно. Для амплификации фрагментов гена 16S рРНК использовали 5× *Taq* Red buffer and *Taq* polymerase ("Evrogen", Россия). Реакционная смесь содержала 5 мкл каждого праймера (концентрация 6 мкМ), 5 мкл матричной ДНК и 15 мкл смеси для ПЦР, в итоге общий объем реакционной смеси составлял 30 мкл. Каждый образец амплифицировали в двух повторностях, объединяли в один объем и разгоняли на ~2% стандартном агарозном геле. Для выделения ампликонов из геля использовали A Standard Cleanup Gel Extraction Kit ("Evrogen", Россия). Концентрации ДНК измеряли на флуориметре Qubit® 2.0 Fluorometer с dsDNA HS (High Sensitivity) Assay Kit ("Life Technologies", США). Создание и секвенирование библиотек проводили согласно рекомендациям Illumina Sample Preparation Guide. Секвенирование библиотек проводили на платформе Illumina MiSeq. Биоинформационный анализ данных проводили с помощью программ QIIME (version 1.9.1) и SILVA (Quast et al., 2013). Данные, представленные в этом исследовании, доступны в базе данных BioProject ID PRJNA270559.

Анализ многомерных данных. Статистическую и математическую обработку многомерных данных гидрохимических параметров исследуемых озер проводили для графического отображения результатов и определения параметров, наиболее характерных для экосистемы каждого озера. Для анализа использовали метод главных компонент, расчеты выполняли с помощью пакета MatLab11 ("The MatWorks, Inc."). Предварительную обработку для стандартизации данных проводили согласно рекомендациям (Groth et al., 2013).

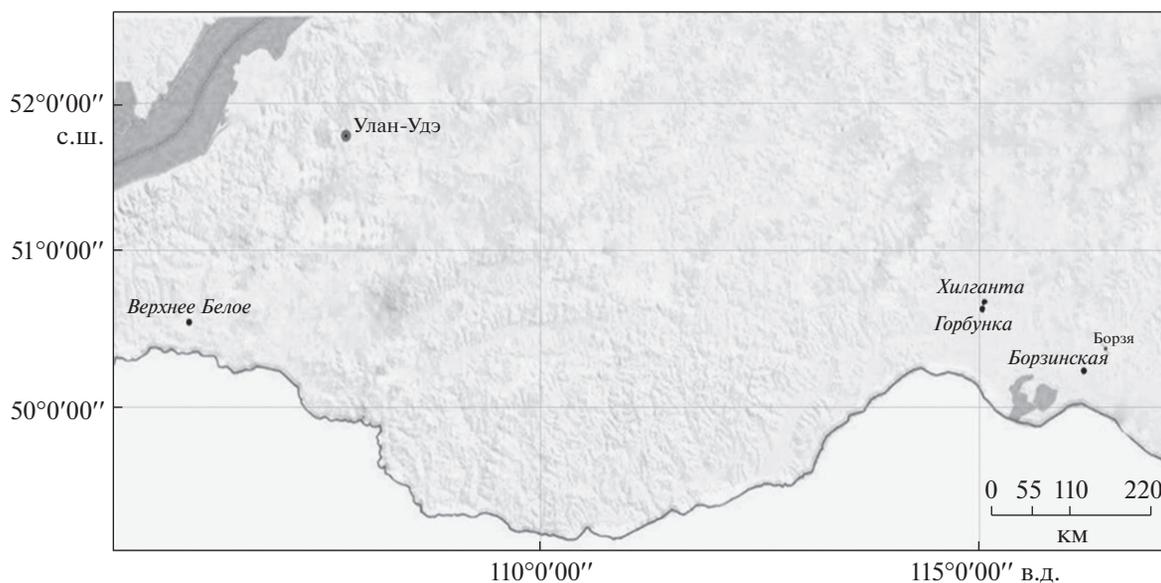


Рис. 1. Карта-схема мест отбора проб.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Физико-химическая характеристика мест отбора проб. Исследования микробных сообществ в осадках соленых озер Верхнее Белое (Республика Бурятия, Россия), а также Хилганта, Горбунка и Борзинское (Забайкальский край, Россия) были проведены в сентябре 2015 г. (рис. 1). Минерализация варьировала от 12 г/л в оз. В. Белое до 430 г/л в оз. Борзинское, а в озерах Хилганта и Горбунка составляла 36 и 58 г/л соответственно. Озера Горбунка и Хилганта отличались мелководностью, резкими колебаниями общей минерализации и содержания основных ионов, испытывали сильное влияние сезонных и годовых колебаний уровня воды, вплоть до полного пересыхания озера Хилганта. Минерализация воды в оз. Хилганта по многолетним наблюдениям варьировала от 30 до 230 г/л, в воде оз. Горбунка изменялась в пределах 56–350 г/л. Все озера характеризовались мелководностью с глубинами до 2 м и щелочным значением pH; по химическому составу воды и составу минералов в осадках озера различались. Озера Борзинское, Хилганта и Горбунка отличались высоким содержанием хлоридов (от 73 до 84% от общего содержания анионов) и незначительным содержанием карбонатов (не более 12% от общего содержания анионов) и сульфатов (до 17%). Оз. Верхнее Белое по гидрохимическим характеристикам является содовым озером, с преобладанием в анионном составе карбонатов. В катионном составе воды озера Борзинское, Хилганта и В. Белое доминировал натрий (до 99% от содержания катионов). В воде оз. Горбунка обнаружено значительное количество ионов Mg^{2+} (более 40% от состава катионов). Были определены зна-

чительные отличия в микроэлементном составе придонной воды (табл. 1). Донные осадки озер были представлены илами от темно-серого до сине-черного цвета, толщиной от 15–20 см с разрывами газа и растительными остатками, ниже до глубины 70–100 см, распространялся серый маслянистый ил. Результаты анализа твердых фаз показали, что состав минералов в осадках озер различался. В осадках оз. Борзинское и Горбунка преобладали силикаты, алюмосиликаты и кварц. В оз. Хилганта более 40% минеральной фазы составлял фосфат циркония, также обнаружено значительное содержание алюмосиликата натрия и кварца. В твердых фазах оз. В. Белое преобладали алюмосиликаты и хроматы, обнаружены достаточно редко встречающиеся минералы на основе теллура (теллурид, цумоит) и мышьяка (теннантит).

Анализ гидрохимических данных методом главных компонент показал, что минерализация и содержание хлоридов вносили наибольший вклад в первую главную компоненту (PC1), которая определяла 34% вариаций в исследуемых параметрах и распределении озер на графике главных компонент (рис. 2). Кроме того, значительный вклад оказывали содержание сульфатов, натрия, кальция и некоторые микроэлементы, в меньшей степени – карбонаты, калий и магний. Именно эти параметры обуславливали распределение образцов на графике и сходство гидрохимических характеристик озера Хилганта и Горбунка. Наиболее значимыми при определении второй компоненты (PC2), которая объясняла 19% наблюдаемых вариаций в гидрохимических данных, были микроэлементы Mo, Sn, Cs, Bi, Cr, Mn, Ni, Cd, Zn и La, высокие

Таблица 1. Физико-химические и минералогические характеристики исследованных озер

	Верхнее Белое	Хилганта	Горбунка	Борзинское
Дата отбора	20.08.2015	25.09.2015	25.09.2015	25.09.2015
Координаты	50°38' N 105°43' E	50°42' N 115°06' E	50°39' N 115°04' E	50°24' N 116°27' E
Температура, °C	19	10.8	9.8	13.7
pH	10.1	10.0	9.98	9.51
Минерализация, г/л	13	36	58	430
Площадь, км ²	4.5	0.3	1.5	3.8
Глубина, м	2	0.6	0.6–0.8	1.5
Минералы (>20%)	Анортоклаз, лопецит	Претулит, циркон	Кварц	Альбит, кварц
Катионы, г/л				
Na ⁺	4	5.3	12.3	129.6
Ca ²⁺	0.008	0.018	0.034	0.04
Mg ²⁺	0.021	0.68	0.92	0.012
K ⁺	0.03	0.04	0.09	0.175
Анионы, г/л				
CO ₃ ²⁻	4.5	0.335	0.405	27.4
Cl ⁻	1.8	8.5	19.0	155.1
SO ₄ ²⁻	2.1	1.9	3.3	32.6
NO ₃ ²⁻ , мг/л	0.13	0.52	0.46	0.35
NO ₂ ⁻ , мг/л	Н.о.	0.00	0.10	0.00
М/элементы, мкг/л				
Co	2.27	1.33	1.39	2.88
Ni	106.87	18.9	25.44	35.79
Zn	306.98	42.77	94.79	204.2
Fe	574.73	77.55	203.94	626.35
Mn	79.96	6.11	5.12	19.59
Cr	43.8	5.55	6.7	8.48
Cs	0.866	0.06	0.069	0.221
Bi	0.753	0.026	0.068	0.17
Sn	30.68	1.2	1.69	6.98
As	94.68	6.94	59.78	879.26
B	2093	1328	1543	21948
Be	0.85	0.135	0.944	6.665
U	512.82	191.78	140.02	2254
Sr	1054	2831	3063	185.1
Ba	101.4	88.2	115.63	116.29
Pr	0.235	0.059	0.278	0.43
Mo	516.99	151.36	19.31	109.33

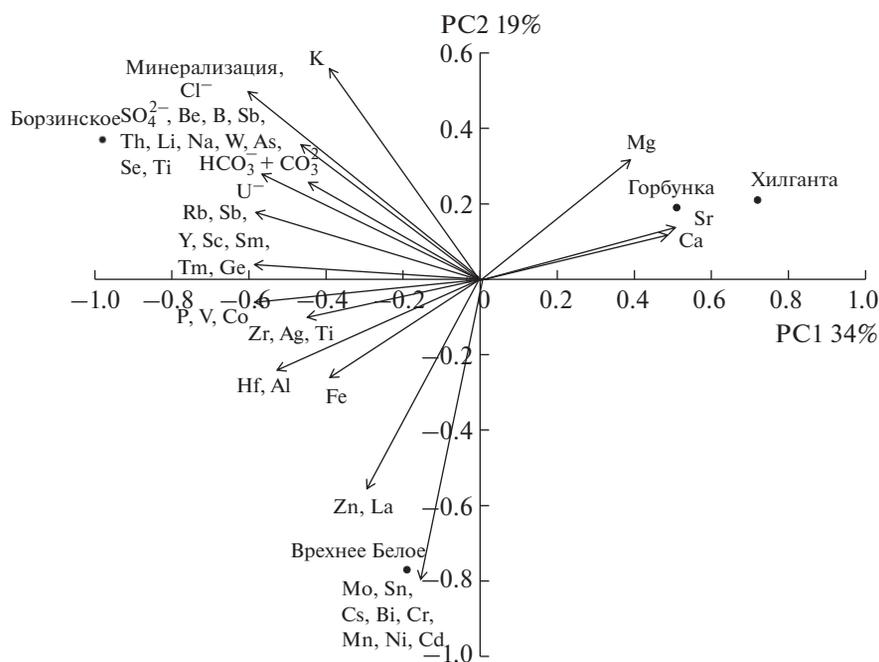


Рис. 2. Распределение исследуемых озер на основе анализа гидрохимических данных по методу главных компонент.

концентрации которых были характерны для экосистемы озера Верхнее Белое.

Разнообразие микробных сообществ в донных осадках озер. В результате высокопроизводительного секвенирования образцов осадков было получено 120953 последовательности генов 16S рРНК, их количество в пробах варьировало от 23094 до 47976 (табл. 2). В пробах высокоминерализованного озера Борзинское при солёности 430 г/л было обнаружено 1794 ОТЕ, при понижении солёности в озерах Хилганта (минерализация 36 г/л) и Горбунка (минерализация 58 г/л) микробное разнообразие возрастало, количество определенных ОТЕ увеличивалось до 3037 и 2847 соответственно. Во всех образцах были многочисленны ОТЕ, представленные единичными (до 10) последовательностями, их количество варьировало от 78.7 до 87% от общего числа ОТЕ.

В целом, в осадках щелочных озер было определено 47 прокариотных филумов, в том числе 42 бактериальных и 5 архейных. Доминировали филумы *Proteobacteria*, *Euryarchaeota*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Actinobacteria* и *Firmicutes*, которые составляли более 95% от числа классифицированных последовательностей (рис. 3). Сравнительное обилие архей возрастало с градиентом солёности от менее 1% в осадке оз. Верхнее Белое до 35% в микробном сообществе осадков оз. Борзинское. Представители филума *Euryarchaeota* составляли более 30% в микробных сообществах озер Хилганта и Борзинское. В микробных сообществах осадков оз. Борзинское при минерализации 430 г/л были обнаружены 28 бактериальных и 3 архейных филума.

Наиболее многочисленные бактериальные ОТЕ представлены галоалкалофильными гамма-протеобактериями рода *Halomonas* (до 15% от

Таблица 2. Влияние минерализации на количественные характеристики ОТЕ

Место отбора	М, г/л	Общее кол-во последовательностей	Общее количество ОТЕ	ОТЕ, представленные единичными последовательностями (до 10)
Верхнее Белое	13	47976	2266	1783
Хилганта	38	24952	3036	2644
Горбунка	56	23094	2847	2492
Борзинское	430	24931	1793	1496

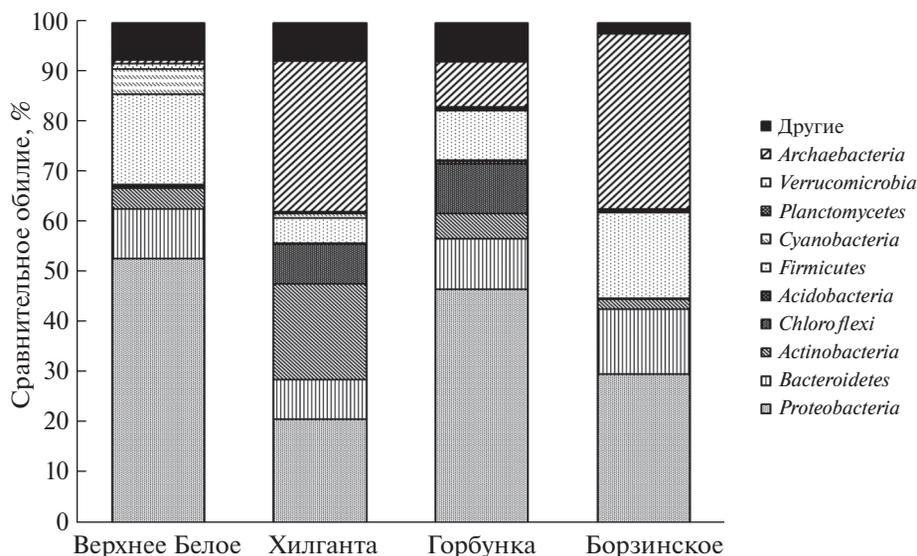


Рис. 3. Сравнительное обилие доминирующих филумов в осадках щелочных озер.

числа классифицированных последовательностей). Галоалкалофильные пурпурные несерные бактерии р. *Rhodobaca* были наиболее многочисленны в микробном сообществе оз. Верхнее Белое, галоалкалофильные актинобактерии р. *Nitri-liruptor* доминировали в оз. Горбунка при солёности 58 г/л.

Наиболее многочисленные архейные ОТЕ были классифицированы на уровне рода как представители родов *Halorubrum* и *Halohasta*, принадлежащих к семейству экстремально-галофильных эвриархей *Halorubraceae*; количество последовательностей этих ОТЕ составляло более 21% от общего разнообразия прокариот в оз. Борзинское. ОТЕ, представляющие филумы *Nanohaloarchaeota* и *Woesearchaeota*, были обнаружены в образцах осадков при минерализации 58 и 430 г/л, немногочисленные представители архейных филумов *Thaumarchaeota* и Miscellaneous Crenarchaeotic Group были определены лишь в микробном сообществе оз. Горбунка и занимали, соответственно, 0,2 и 0,9% от общего разнообразия архей.

Содержание *Proteobacteria* от общего числа классифицированных последовательностей в сообществах осадков варьировало от 21–30% (оз. Хилганта и Борзинское) до 47–53% (оз. Горбунка и В. Белое) (рис. 3). Во всех образцах наибольшее количество последовательностей представляли γ-протеобактерии, состав доминирующих родов в разных озерах варьировал. Галофильные бактерии р. *Halomonas* доминировали в микробных сообществах осадков при разных значениях солёности, варьируя от 2% (оз. Хилганта) до 15% (оз. Борзинское) от общего числа последовательностей. Другими обильно представленными родами являлись: *Marinospirillum*, *Marinicella* и *Nitrincola* в осадках озера

В. Белое; *Thioalkalivibrio* и *Aliidomarina* в осадках озера Борзинское. Литоавтотрофные сероокисляющие бактерии рода *Thioalkalispira*, впервые выделенные из осадков содового озера Фазда (Вади Натрун, Египет) (Sorokin et al., 2002), доминировали в осадках оз. Хилганта (>1% от общего числа последовательностей).

Класс α-протеобактерий был обнаружен во всех осадках, количество последовательностей этих бактерий значительно снижалось в пробах с высокой минерализацией (рис. 4). В основном, последовательности соотносились с порядком *Rhodobacterales*, за исключением осадков оз. Хилганта, где преобладали бактерии порядка *Rhizobiales*. В образцах озера В. Белое 41% от класса α-протеобактерий занимали алкалофильные бактерии р. *Rhodobaca*, 6% родов от класса составляли *Roseibaca* – алкалотолерантные и бактериохлорофилл-а-продуцирующие бактерии, единственный представитель которого *Roseibaca ekhonensis* выделен из гиперсоленого озера Эхо.

Филум *Firmicutes* во всех озерах был представлен, в основном, классом *Clostridia* с очень большой долей некультивируемых бактерий (рис. 4). В микробном сообществе оз. Верхнее Белое доминировали умеренно-галофильные бактерии р. *Anoxinatronum* (4% от всех последовательностей), в Хилганте и Горбунке возрастало количество последовательностей бактерий р. *Alkaliphilus* (1–2%). Лишь в оз. Борзинское первичные анаэробы были представлены экстремально-галофильными бактериями порядков *Halanaerobiales* и *Natranaerobiales* (4 и 0,5% от общего числа, соответственно). 60 ОТЕ, представляющие порядок *Halanaerobiales*, были соотнесены с родами *Halanaerobiales*, были соотнесены с родами *Halanaerobiales*, были соотнесены с родами *Halanaerobiales*.

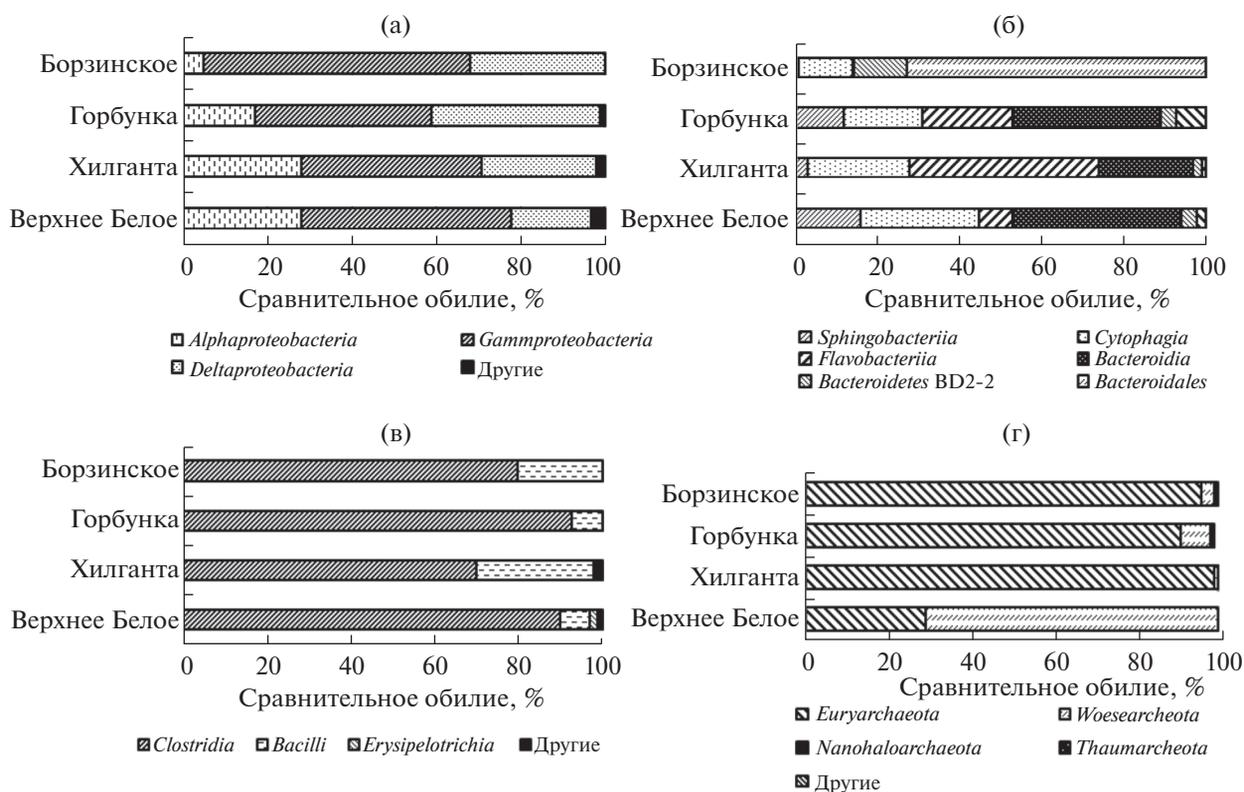


Рис. 4. Разнообразие доминирующих филумов на уровне классов: а – *Proteobacteria*; б – *Bacteroidetes*; в – *Firmicutes*; г – филумы домена *Archaea*.

aerobium, *Halarsenatibacter*, *Halocella*, *Natroniella* с уровнем сходства от 93 до 100%.

Состав филума *Bacteroidetes* изменялся в зависимости от минерализации (рис. 4). В осадках озер В. Белое и Горбунка в составе бактериоидов преобладали представители класса *Bacteroidia*, количество последовательностей, ассоциированных с классом *Flavobacteriia*, варьировало от 8 до 46% в осадках озер, за исключением высокоминерализованного оз. Борзинское (рис. 4). Доля некультивируемых бактерий этого филума составляла до 25–30%. Кроме того, значительное число последовательностей – от 5–9 (оз. Хилганта и Горбунка) до 36–71% (озера В. Белое и Борзинское) – соотносилось с группой водных организмов ML635J-40, участвующих в деструкции полимерных соединений (Nolla-Ardevol et al., 2015).

Во всех исследуемых озерных осадках было выявлено значительное количество и разнообразие микроорганизмов, участвующих в цикле серы: в восстановительной (представители *Deltaproteobacteria*) и окислительной (представители *Chromatiales*) частях. Цикл метана в осадках озер осуществляется микроорганизмами, представляющими метаногенные археи *Methanomicrobia*, их количество составляло от 0.3 до 2% архейного разнообразия в озерах Борзинское и Горбунка со-

ответственно. Метилотрофные *Gammaproteobacteria* (*Methylnatronum* sp.) отмечались в микробных сообществах осадков озер Верхнее Белое и Борзинское.

Во всех исследованных осадках озер была определена активность продукционных процессов. Наибольшая активность общего фотосинтеза обнаружена в илах оз. Верхнее Белое (до 300 мг С/дм³ в сут). Подобные результаты изотопных исследований хорошо согласуются с анализом таксономического разнообразия микробных сообществ. В озере В. Белое количество последовательностей, ассоциированных с филумом *Cyanobacteria*, было значительным, составляя 5% от общего числа классифицированных последовательностей. Наиболее многочисленные ОТЕ были соотнесены с родами *Prochlorococcus*, *Lyngbia*, *Oscillatoria*, *Cyanobacterium* и *Anabaenopsis*. Представленные единичными последовательностями роды *Phormidium*, *Meristopedia*, *Synechococcus*, *Spirulina*, *Chloroplast* и *Nodularia*, также присутствовали в микробных сообществах всех исследованных озер, включая высокоминерализованное оз. Борзинское.

Филогенетический анализ показал значительное разнообразие сульфатредуцирующих бактерий. Ранее была показана ведущая роль сульфат- и сероредуцирующих бактерий в микробных сообще-

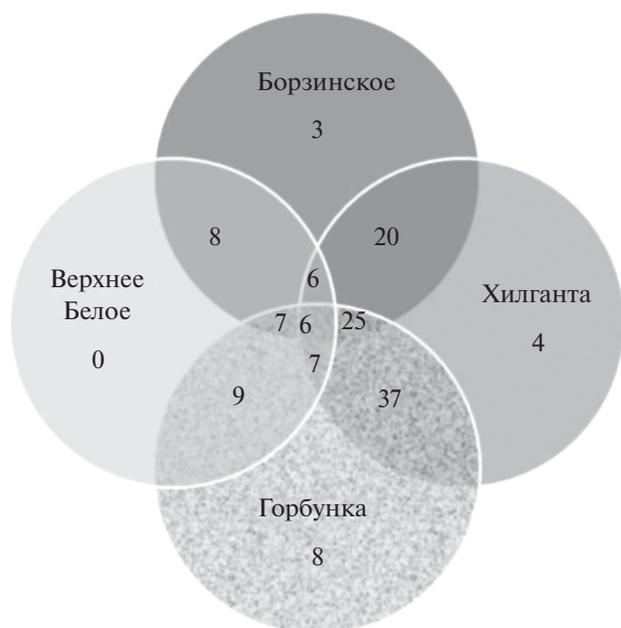


Рис. 5. Диаграмма Венна для уникальных и общих родов архей в микробных сообществах.

ствах содовых озер (Foti et al., 2007; Sorokin et al., 2004, 2011, 2015). В осадках содовых озер доминировали литотрофные сульфатредуцирующие бактерии порядков *Desulfovibrionales*, в том числе галоалкалофильные представители родов *Desulfonatronum*, *Desulfonatronovibrio* и *Desulfonatronospira*, и *Desulfobacterales*. В исследуемых микробных сообществах экстремальные галоалкалофилы рода *Desulfonatronospira* были обнаружены лишь в микробном сообществе высокоминерализованного оз. Борзинское, их сравнительное обилие составляло 36% среди представителей *Desulfovibrionales*; отмечены также галоалкалофильные бактерии р. *Desulfonatronovibrio* (11% среди *Desulfovibrionales*). В менее минерализованных озерах Горбунка, Хилганта и В. Белое среди литотрофных СРБ преобладали галоалкалофильные бактерии р. *Desulfonatronum* (12–92%) (Sorokin et al., 2015). Численность гетеротрофных СРБ порядка *Desulfobacterales* (Foti et al., 2007), в том числе представителей родов *Desulfonatronobacter*, *Desulfobulbus* и *Desulfobotulus*, окисляющих ЛЖК, также варьировала в зависимости от минерализации. Так, сульфатредуцирующие бактерии р. *Desulfonatronobacter* с уровнем сходства от 97 до 99.65% и типовым видом *D. acidivorans* (Sorokin et al., 2012) преобладали в осадках оз. Борзинское (6% от общего числа классифицированных последовательностей), в то время как в менее соленых озерах их количество не превышало 0.2–0.6% от общего числа последовательностей. Только в осадках оз. В. Белое обнаружены сульфатредукторы р. *Desulfobotulus*, в осадках озера Хилганта, Горбунка и В. Белое бактерии р. *Desul-*

fobulbus занимали от 1 до 6% от числа *Deltaproteobacteria*. Данные по анализу филогенетического разнообразия отражают значительную роль СРБ в процессах микробной деструкции в осадках озер. Определение скоростей терминальных процессов сульфатов варьировала от 16 до 887 мг S/дм³ в сут, наибольшая скорость сульфатредукции обнаружена в осадках оз. Борзинское.

Распространение архей в микробных сообществах. Было исследовано распространение архей в микробных сообществах озер в зависимости от их минерализации. При концентрации солей 12 г/л архейное разнообразие составляло 111 ОТЕ, доминировали представители филума *Woesearchaeota* (рис. 4). При повышении солености разнообразие архей возрастало, в осадках оз. Хилганта при минерализации 36 г/л было обнаружено 1039 архейных ОТЕ, наиболее многочисленные ОТЕ были представлены некультивируемыми археями, а также родами *Natronococcus*, *Halovivax* и *Haloterrigena*. В микробном сообществе осадков оз. Горбунка при минерализации 58 г/л было определено 531 архейных ОТЕ, в основном представлены некультивируемыми археями, причем только 49 ОТЕ были представлены более чем 10 последовательностями. Максимальное разнообразие и доминирование архей в микробном сообществе поверхностного осадка было определено в микробном сообществе оз. Борзинское (рис. 4). Наиболее представительные ОТЕ были соотнесены с некультивируемыми археями родов *Halorubrum*, *Natronomonas* и *Halohasta*. Во всех исследованных озерах были обнаружены последовательности, представляющие класс *Methanomicrobia*. В осадках озера Горбунка выявлено наибольшее разнообразие и обилие метаногенов (7 родов: *Methanoculleus*, *Methanogenium*, *Methanosarcina*, *Methanohalophilus*, *Methanolobus*). Метаногенные археи в поверхностных осадках оз. Борзинское были, в основном (87% от *Methanomicrobia*, 0.3% от *Archaea*), представлены галофильными и алкалофильными археями р. *Methanosalsum*, которые ранее были выделены из гиперсоленых озер Вади Натрун и Магади (Kevbrin et al., 1997) и Кулундинской степи (Sorokin et al., 2015). Во всех образцах единичными последовательностями были представлены метилотрофные метаногены р. *Methanolobus*. Ранее умеренно галотолерантные представители этого рода были отмечены в осадках гиперсоленого озера Фазда (Mesbah et al., 2007) и оз. Танатар (Vavourakis et al., 2016). На диаграмме Венна показано количество родов архебактерий, уникальных и общих для микробных сообществ озер (рис. 5). В целом, можно отметить высокий уровень сходства архейных сообществ озер Горбунка, Хилганта и Борзинское на уровне родов.

Ранее методом высокопроизводительного секвенирования было исследовано микробное раз-

нообразии в воде соленых озер Тибетского плато в градиенте солености от <1 до 344 г/л и было показано, что минерализация и содержание основных ионов (Mg^{2+} , K^+ , Cl^- , Na^+ , SO_4^{2-} , Ca^{2+}) определяли разнообразие прокариот (Zhong et al., 2016). Бактерии доминировали в воде озер с минерализацией до 100 г/л; при минерализации от 317 до 344 г/л развивались микробные сообщества с преобладанием архей (79–89% от общего разнообразия), среди которых подавляющее число последовательностей было представлено семейством *Halobacteriaceae* филума *Euryarchaeota*. Нужно отметить, что в воде большинства озер Тибетского плато, даже при высоких значениях минерализации (92–99 г/л) количество экстремально-галофильных архей не превышало 0.1–0.5% от общего разнообразия.

В микробных сообществах осадков высокоминерализованной лагуны Тебенкуйче (Чили) археи доминировали во всех образцах в градиенте минерализации от 62 до 150 г/л, представители филума *Euryarchaeota* составляли от 62 до 97% от общего разнообразия прокариот при минерализации 150 и 117 г/л соответственно (Fernandez et al., 2016). Бактериальное разнообразие в пробе с минерализацией 150 г/л определялось, в основном, филумами *Planctomycetes*, *Acetothermia*, *Chloroflexi* и *Firmicutes*. Последовательности 16S рРНК, соотнесенные с этими филумами, занимали от 2 до 7% общего разнообразия прокариот.

На основании исследований, проведенных в соленых озерах с различным географическим положением, показано, что из имеющихся более, чем 100 штаммов рода *Thioalkalivibrio* большинство геномных видов имеют тенденцию встречаться в одном географическом регионе, таком как Центральная Азия (Монголия и Южно-Сибирские степи) и Африка (Кения или Египет) (Foti et al., 2006; Ahn et al., 2017). Генотипы, представленные культурами, выделенными из разных местобитаний, обладали сходными физиолого-биохимическими характеристиками по отношению к минерализации, концентрации хлоридов, отношению к кислороду, что показывает важность локальных географических особенностей каждого озера (Foti et al., 2006). По нашим данным гамма-протеобактерии *Thioalkalivibrio* широко представлены в исследуемых озерах, их сравнительное обилие варьировало от 0.1% в Хилганте до 1% в Борзинском. Наибольшее разнообразие, представленное 17 ОТЕ, выявлено в осадке оз. Горбунка, наименьшее – в озерах Верхнее Белое и Хилганта (6 и 8 ОТЕ соответственно). Большая часть последовательностей была соотнесена с генотипом, характерным для монгольских (*Thioalkalivibrio* sp. ALMg11) и Кулундинских озер (*Thioalkalivibrio* sp. AKL3), что подтверждает тенденцию к эндемизму; также отмечены единичные

последовательности, близкие к изолятам из египетского озера Вади Натрун (*T. nitratireducens* и *Thioalkalivibrio* sp. ALE19).

Таким образом, в микробных сообществах поверхностных осадков мелководных щелочных озер Забайкалья определено высокое таксономическое разнообразие бактерий и архей, показано влияние солености на состав доминирующих и минорных групп микроорганизмов, а также исследованы гидрохимические и минералогические характеристики, которые отражают возможные особенности экосистемы каждого озера.

Исследование было выполнено в рамках бюджетного проекта VI.55.1.2 “Микробные сообщества экстремальных природных экосистем: биологическое и функциональное разнообразие, биотехнологический потенциал” (№ 0337-2016-0004).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Васильев Е.К. Качественный рентгенофазовый анализ / Под ред. Брандта С.Б. Новосибирск: Наука. 1986. 195 с.
- Горленко В.М., Намсараев Б.Б., Кулырова А.В., Заварзина Д.Г., Жилина Т.Н. Активность сульфатредуцирующих бактерий в донных осадках содовых озер Юго-Восточного Забайкалья // Микробиология. 1999. Т. 68. № 5. С. 664–670.
- Gorlenko V.M., Namsaraev B.B., Kulyrova A.V., Zavarzina D.G., Zhilina T.N. The activity of sulfate-reducing bacteria in bottom sediments of soda lakes of the Southeastern Transbaikalian region // Microbiology (Moscow). 1999. V. 68. P. 580–586.
- Зайцева С.В., Абидуева Е.Ю., Бурюхаев С.П., Намсараев Б.Б. Факторы, контролирующие активность микробного сообщества щелочного озера Белое (Забайкалье) // Микробиология. 2012. Т. 81. № 4. С. 508–516.
- Zaitseva S.V., Abidueva E.Yu., Buryukhaev S.P., Namsaraev B.B. Factors controlling the activity of the microbial community of the alkaline Lake Beloe (Transbaikalian region) // Microbiology (Moscow). 2012. V. 81. P. 468–476.
- Намсараев Б.Б., Горленко В.М., Намсараев З.Б., Дагурова О.П., Бархутова Д.Д., Бурюхаев С.П., Хахинов В.В. Полевой практикум по водной микробиологии и гидрохимии: Методическое пособие / Отв. ред. Вайнштейн М.В. Улан-Удэ: Изд-во Бурятского государственного университета, 2005. 68 с.
- Цыренова Д.Д., Брянская А.В., Козырева Л.П., Намсараев З.Б., Намсараев Б.Б. Структура и особенности формирования галоалкалофильного сообщества озера Хилганта // Микробиология. 2011. Т. 80. № 2. С. 251–257.
- Tsyrenova D.D., Kozyreva L.P., Namsaraev B.B., Bryanskaya A.V., Namsaraev Z.B. Structure and formation properties of the haloalkaliphilic community of Lake Khilganta // Microbiology (Moscow). 2011. V. 80. P. 237–243.
- Цыренова Д.Д., Брянская А.В., Намсараев З.Б., Акимов В.Н. Таксономическая и экологическая характеристика цианобактерий некоторых солоноватых и соленых озер Южного Забайкалья // Микробиология. 2011. Т. 80. № 2. С. 230–240.
- Tsyrenova D.D., Bryanskaya A.V., Namsaraev Z.B., Akimov V.N. Taxonomic and ecological characterization of cyanobacteria from some brackish and saline lakes of Southern Trans-

- baikal Region // *Microbiology (Moscow)*. 2011. V. 80. P. 216–227.
- Ahn A.-C., Meier-Kolthof J.P., Overmars L., Richter M., Woyke T., Sorokin D.Y., Muyzer G. Genomic diversity within the haloalkaliphilic genus *Thioalkalivibrio* // *PLoS One*. 2017. 12(3): e0173517.
- Baatar B., Chiang P.-W., Rogozin D.Y., Wu Y.-T., Tseng C.-H., Yang C.-Y., Chiu H.-H., Oyuntsetseg B., Degermendzhy A.G., Tang S.-L. Bacterial communities of three saline meromictic lakes in Central Asia // *PLoS One*. 2016. 11: e0150847.
- Fadrosch D.W., Ma B., Gajer P., Sengamalay N., Ott S., Brotman R.M., Ravel J. An improved dual-indexing approach for multiplexed 16S rRNA gene sequencing on the Illumina MiSeq platform // *Microbiome*. 2014. V. 2. P. 6.
- Fernandez A.B., Rasuk M.C., Visscher P.T., Contreras M., Novoa F., Poire D.G., Patterson M.M., Ventosa A., Farias M.E. Microbial diversity in sediment ecosystems (vaporates domes, microbial mats, and crusts) of hypersaline Laguna Tebenquiche, Salar de Atacama, Chile // *Front. Microbiol.* 2016. V. 7. P. 1284.
- Foti M., Ma S., Sorokin D.Y., Rademaker J.L.W., Kuenen J.G., Muyzer G. Genetic diversity and biogeography of haloalkaliphilic sulphur-oxidizing bacteria belonging to the genus *Thioalkalivibrio* // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2006. V. 56. P. 95–101.
- Foti M., Sorokin D.Y., Lomans B., Mussman M., Zakharova E.E., Pimenov N.V., Kuenen J.G., Muyzer G. Diversity, activity and abundance of sulfate-reducing bacteria in saline and hypersaline soda lakes // *Appl. Environ. Microbiol.* 2007. V. 73. P. 2093–2100.
- Groth D., Hartmann S., Klie S., Selbig J. Principal Components Analysis // *Computational Toxicology. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)* / Eds. Reisfeld B., Mayeno A. Totowa, NJ: Humana Press, 2013. 930 p.
- Kevbrin V.V., Lysenko A.M., Zhilina T.N. Physiology of alkaliphilic methanogen Z-7936, a new strain of *Methanosalsus zhilinae* isolated from Lake Magadi // *Microbiology (Moscow)*. 1997. V. 66. P. 261–266.
- Kozyreva L.P., Egorova D.V., Anan'ina L.N., Plotnikova E.A., Namsaraev B.B. Microbial diversity of cellulolytic community of the sandy mat from lake Zun-Torey (southern Transbaikalia) // *Inland Water Biol.* 2014. V. 7. P. 134–140.
- Kozyreva L., Egorova D., Anan'ina L., Plotnikova E., Ariskina E., Prisyazhnaya N., Radnaeva L., Namsaraev B. *Belliella buryatensis* sp. nov., isolated from the Lake Solenoe (Buryatia, Russia) // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2016. V. 66. P. 137–143.
- La Cono V., Smedile F., Bortoluzzi G., Arcadi E., Maimone G., Messina E., Borghini M., Oliveri E., Mazzola S., L'Haridon S., Toffin L., Genovese L., Ferrer M., Giuliano L., Golyshin P.N., Yakimov M.M. Unveiling microbial life in new deep-sea hypersaline Lake Thetis. Part I: Prokaryotes and environmental settings // *Environ. Microbiol.* 2011. V. 13. P. 2250–2268.
- Lever M.A., Torti A., Eickenbusch P., Michaud A.B., Šantl-Temkiv T., Jørgensen B.B. A modular method for the extraction of DNA and RNA, and the separation of DNA pools from diverse environmental sample types // *Front. Microbiol.* 2015. V. 6. P. 476.
- Merkel A.Yu., Pimenov N.V., Rusanov I.I., Slobodkin A.I., Slobodkina G.B., Tarnovetskii I.Yu., Frolov E. N., Dubin A.V., Perevalova A.A., Bonch-Osmolovskaya E.A. Microbial diversity and autotrophic activity in Kamchatka hot springs // *Extremophiles*. 2017. V. 21. P. 307–317.
- Mesbah N.M., Abou-El-Ela S.H., Wiegel J. Novel and unexpected prokaryotic diversity in water and sediments of the alkaline, hypersaline lakes of the Wadi An Natrun, Egypt // *PLoS One*. 2013. 8(8):e72577.
- Namsaraev Z.B., Zaitseva S.V., Gorlenko V.M., Kozyreva L.P., Namsaraev B.B. Microbial processes and factors controlling their activities in alkaline lakes of the Mongolian plateau // *Chin. J. Oceanol. Limnol.* 2015. V. 33. P. 1391–1401.
- Nolla-Ardevol V., Strous M., Tegetmeyer H.E. Anaerobic digestion of the microalga *Spirulina* at extreme alkaline conditions: biogas production, metagenome, and metatranscriptome // *Front. Microbiol.* 2015. V. 6. P. 597.
- Quast C., Pruesse E., Yilmaz P., Gerken J., Schweer T., Yarza P., Peplies J., Glöckner F.O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools // *Nucl. Acids Res.* 2013. V. 41. P. D590–D596.
- Simachew A., Lanzén A., Gessesse A., Øvreås L. Prokaryotic community diversity along an increasing salt gradient in a soda ash concentration pond // *Microbial Ecol.* 2016. V. 71. P. 326–338.
- Sorokin D.Y., Chernyh N.A., Poroshina M.N. *Desulfonatronobacter acetioxydans* sp. nov., — a first acetate-oxidizing extremely salt-tolerant alkaliphilic sulfate-reducing bacterium from a hypersaline soda lake // *Extremophiles*. 2015. V. 19. P. 899–907.
- Sorokin D.Y., Gorlenko V.M., Namsaraev B.B., Namsaraev Z.B., Lysenko A.M., Eshinimaev B.T., Khmelenina V.N., Troitsenko Y.A., Kuenen J.G. Prokaryotic communities of the north-eastern Mongolian soda lakes // *Hydrobiologia*. 2004. V. 522. P. 235–248.
- Sorokin D.Y., Kuenen J.G., Muyzer G. The microbial sulfur cycle at extremely haloalkaline conditions of soda lakes // *Front. Microbiol.* 2011. V. 2. P. 1–16.
- Sorokin D.Y., Berben T., Melton E.D., Overmars L., Vavourakis C., Muyzer G. Microbial diversity and biogeochemical cycling in soda lakes // *Extremophiles*. 2014. V. 18. P. 791–809.
- Sorokin D.Y., Makarova K.S., Abbas B., Ferrer M., Golyshin P.N., Galinski E.A., Ciordia S., Mena M.C., Merkel A.Y., Wolf Y.I., van Loosdrecht M.C.M., Koonin E.V. Discovery of extremely halophilic, methyl-reducing euryarchaea provides insights into the evolutionary origin of methanogenesis // *Nat. Microbiol.* 2017. V. 2. Article 17081.
- Sorokin D.Y., Tourova T.P., Kolganova T.V., Sjollem K.A., Kuenen J.G. *Thioalkalispira microaerophila* gen. nov., sp. nov., a novel lithoautotrophic, sulfur-oxidizing bacterium from a soda lake // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2002. V. 52. P. 2175–2182.
- Sorokin D.Y., Panteleeva A.N., Tourova T.P., Muyzer G. Haloalkaliphilic heterotrophic sulfate-reducing bacteria from soda lakes and description of *Desulfonatronobacter acidivorans* gen. nov., sp. nov., and *Desulfobulbus alkaliphilus* sp. nov. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2012. V. 62. P. 2107–2113.
- Vavourakis C.D., Ghai R., Rodriguez-Valera F., Sorokin D.Y., Tringe S.G., Hugenholtz P., Muyzer G. Metagenomic insights into the uncultured diversity and physiology of microbes in four hypersaline soda lake brines // *Front. Microbiol.* 2016. V. 7. P. 211.

Xiong J., Liu Y., Lin X., Zhang H., Zeng J., Hou J., Yang Y., Yao T., Knight R., Chu H. Geographic distance and pH drive bacterial distribution in alkaline lake sediments across Tibetan Plateau // Environ. Microbiol. 2012. V. 14. P. 2457–2466.

Zakharyuk A.G., Kozyreva L.P., Khijniak T.V., Namsaraev B.B., Shcherbakova V.A. *Desulfonatronum zhilinae* sp. nov., a novel haloalkaliphilic sulfate-reducing bacterium from soda Lake Alginskoe, Trans-Baikal Region, Russia // Extremophiles. 2015. V.19. P. 673–680.

Zakharyuk A., Kozyreva L., Ariskina E., Troshina O., Kopitsyn D., Shcherbakova V. *Alkaliphilus namsaraevii* sp. nov., an alkaliphilic iron- and sulfur-reducing bacterium isolated from a steppe soda lake // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2017. V. 67. P. 1990–1995.

Zhong Z.-P., Liu Y., Miao L.-L., Wang F., Chu L.-M., Wang J.-L., Liu Z.-P. Prokaryotic community structure driven by salinity and ionic concentrations in plateau lakes of the Tibetan Plateau // Appl. Environ. Microbiol. 2016. V. 82. P. 1846–1858.

Structure of Microbial Communities of the Sediments of Alkaline Transbaikalia Lakes with Different Salinity

S. V. Zaitseva¹, *, E. Yu. Abidueva¹, A. A. Radnagurueva¹, S. M. Bazarov¹, and S. P. Buryukhaev¹

Institute of General and Experimental Biology, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Ulan-Ude, Russia

*e-mail: svet_zait@mail.ru

Received December 11, 2017

Abstract—The goal of the work was to reveal the differences in the structure of microbial communities of Transbaikalia alkaline lakes stemming from the differences in their salinity and hydrochemical parameters. The lakes studied were Verkhnee Beloe (Buryat Republic, Russia), as well as Khilganta, Gorbunka, and Borzinskoe (Transbaikal krai, Russia) with salinity from 12.3 to 430 g/L, which differed in the mineral composition of the sediments and hydrochemical parameters. Lake sediments were found to contain 47 prokaryotic phyla (42 bacterial and 5 archaeal ones). The phyla *Proteobacteria*, *Euryarchaeota*, *Bacteroides*, *Chloroflexi*, *Actinobacteria*, and *Firmicutes* were predominant, comprising over 95% of the classified sequences. Comparative abundance of archaea increased with salinity from below 1% in Lake Verkhnee Beloe to 35% in Lake Borzinskoe. The most numerous bacterial OTUs belonged to gammaproteobacteria of the genus *Halomonas* (up to 15% of the number of classified sequences). The most numerous archaeal OTUs were identified at the genus level as members of the genera *Halorubrum* and *Halohasta* belonging to the family *Halorubraceae*, which comprises extremely halophilic *Euryarchaeota*.

Keywords: microbial diversity, saline lakes, high-throughput sequencing, 16S rRNA

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИ

РАЗНООБРАЗИЕ ПРОКАРИОТ В ПЛАНКТОННЫХ СООБЩЕСТВАХ
СОЛЕННЫХ СОЛЬ-ИЛЕЦКИХ ОЗЕР (ОРЕНБУРГСКАЯ ОБЛАСТЬ)

© 2018 г. Е. А. Селиванова^{a, *}, Д. В. Пошвина^a, Ю. А. Хлопко^a,
Н. Е. Гоголева^{b, c}, А. О. Плотников^a

^aИнститут клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения
Российской академии наук, Оренбург, Россия

^bКазанский институт биохимии и биофизики ФИЦ Казанского научного центра
Российской академии наук, Казань, Россия

^cКазанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

*e-mail: selivanova-81@mail.ru

Поступила в редакцию 11.12.2017 г.

Впервые методом высокопроизводительного секвенирования по технологии Illumina исследовано разнообразие прокариот в планктонных сообществах шести Соль-Илецких озер (Оренбургская область), различающихся уровнем минерализации. В сообществах озер с уровнем минерализации 285–300‰ доминировали экстремально галофильные археи филумов *Euryarchaeota* и *Nanohaloarchaeota*, бактерии филума *Bacteroidetes*. В озерах с минерализацией 110–180‰ преобладали представители филумов *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* и класса *Gamma proteobacteria*. В оз. Большом Городском с уровнем минерализации 10‰ наблюдалось массовое развитие *Cyanobacteria*. Доминирующие ОТЕ в водоемах с высокой минерализацией были представлены археями *Halonotius* sp., некультивируемым классом *Nanohaloarchaea* и бактериями *Salinibacter* sp.; в водоемах со средним уровнем минерализации – гаммапротеобактериями *Spiribacter* spp., альфапротеобактериями *Roseovarius* sp., актинобактериями *Pontimonas* sp. и *Rhodoluna* sp., флавобактериями *Psychroflexus* sp. и неидентифицированными археями семейства *Haloferracaceae*. В слабоминерализованном озере преобладали цианобактерии рода *Planktothrix*. Продемонстрировано влияние уровня солености на таксономическое богатство, состав и разнообразие прокариот в планктонных сообществах исследуемых озер.

Ключевые слова: соленые озера, биоразнообразие, прокариоты, галофильные бактерии, археи, планктонные сообщества, высокопроизводительное секвенирование, Illumina, ген 16S rPHK

DOI: 10.1134/S002636561804016X

Соль-Илецкие озера располагаются на территории Оренбургской области у границы России с Казахстаном. Озера сформировались на поверхности Илецкого соляного купола, возникшего в конце пермской эпохи более 200 млн лет назад, и имеют карстово-антропогенное происхождение (Петрищев, 2010). Добыча каменной соли на Илецком месторождении ведется уже более двух столетий, и в настоящее время его поверхность представляет собой крупную впадину с системой озер, обрамленную по окраинам сохранившимися остатками соляного ядра (гора Туз-Тюбе). Территория озер находится в условиях семиаридного климата Южного Приуралья и характеризуется нестабильным гидрогеологическим режимом (Петрищев, 2015). Соль-Илецкие карстовые озера имеют важное рекреационно-бальнеологическое значение, являясь региональным курортным центром, а некоторые озера относятся к объектам природного наследия Оренбургского Предуралья.

Отдельные исследования микробиоты Соль-Илецких озер, в частности микроводорослей, проводились в середине XX в. (Блюмина, 1958); активное эколого-гидробиологическое и гидрохимическое изучение началось в 90-х гг. и было связано, прежде всего, с их использованием в бальнеологии (Павлов, 1993; Абдрахманов, 2001; Абдрахманов и соавт., 2005). Микробные сообщества Соль-Илецких водоемов исследовали на протяжении многих лет с помощью традиционных культуральных методов, что позволило обнаружить представителей основных доменов жизни *Archaea*, *Bacteria* и *Eukarya* (Абдрахманов, 2001; Шабанов, 2001; Плотников, 2002). В результате установлена зависимость структуры микробиоценозов озер от уровня минерализации и трофического статуса водоема (Селиванова, 2007), выделены, идентифицированы и изучены культуры некоторых прокариот (Селиванова, Немцева, 2013) и эукариот (Плотников и соавт. 2011, 2015). Описаны новые виды протистов (Harding et al.,

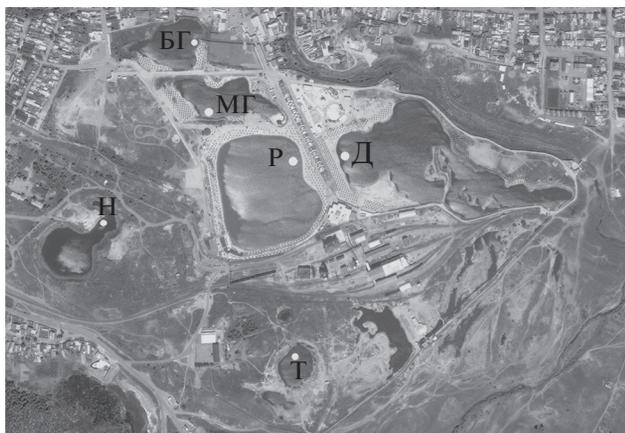


Рис. 1. Карта отбора проб в Соль-Илецких озерах. Обозначения: Р – Развал, Д – Дунино, МГ – Малое Городское, Т – Тузлучное, Н – Новое, БГ – Большое Городское.

2013; Мыльников, 2015), и обоснована биотехнологическая ценность местных штаммов зеленых водорослей рода *Dunaliella* (Немцева и соавт., 2013; Соловченко и соавт., 2015). В то же время структура и разнообразие прокариотических сообществ близко расположенных, но различающихся по уровню минерализации, Соль-Илецких озер с применением современного метагеномного подхода до настоящего времени оставались неизученными.

Известное положение о том, что видовое богатство и видовое разнообразие сообществ резко снижается с увеличением уровня минерализации, справедливо для многих высокоминерализованных озер. Однако применение генетических методов оценки разнообразия гипергалинных водоемов в последние годы демонстрирует высокое таксономическое разнообразие прокариот на уровне рода и вида. Так, в семействе экстремально галофильных архей *Halobacteriaceae* описаны уже 47 родов и 165 видов, хотя они являются лишь небольшой частью реального разнообразия галофильных прокариот в природе (Oren, 2014). Исследование природных микробных сообществ с помощью метагеномного подхода демонстрирует, что, как правило, не более 0.1–1% микроорганизмов могут быть выделены в чистой культуре в стандартных лабораторных условиях. Благодаря некультуральным подходам, в частности, метагеномным исследованиям, обнаружены новые таксоны прокариот, присутствующих в гипергалинных местобитаниях. Примером может служить организм DL31, выявленный в Глубоком озере в Антарктиде, представляющий собой новый род архей семейства *Halobacteriaceae* (DeMaere et al., 2013). В соляных прудах выявлены и описаны экстремально галофильные археи *Haloquadratum walsbyi* и бактерии *Salinibacter ruber* (Legault et al., 2006;

Anton et al., 2002). Последние публикации свидетельствуют о возможности обнаружения крупных таксонов прокариот, которые пока не поддаются культивированию и могут быть изучены только *in situ*, например, новый класс архей *Nanohaloarchaea* или достигающие массового развития гамма-протеобактерии *Spiribacter salinus* (Ghai et al., 2011; Leon et al., 2014). Большое количество эволюционно древних линий архей, о которых стало известно благодаря анализу последовательностей гена 16S рРНК, выделенных непосредственно из природной среды, до настоящего времени остаются некультивируемыми и практически неизученными (Sorensen et al., 2006; Teske et al., 2008).

Учитывая отсутствие метагеномных данных по филогенетическому разнообразию прокариот в Соль-Илецких озерах, целью нашей работы стало изучение филогенетического разнообразия микробных сообществ в различающихся по уровню минерализации Соль-Илецких озерах методом высокопроизводительного секвенирования фрагментов гена 16S рРНК, оценка сходства и различий изученных сообществ прокариот с сообществами подобных водоемов другой географической локализации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Отбор проб воды из шести Соль-Илецких озер проводили в октябре 2015 г. Карта расположения точек отбора проб показана на рис. 1. Минерализацию воды определяли портативным рефрактометром Master S-28α (“Atago”, Япония), температуру воды – прецизионным портативным термометром ЛТ-300 (“Термэкс”, Россия), рН – портативным рН-метром 150-МИ (“Измерительная техника”, Россия).

Основные физико-химические характеристики воды в точках отбора проб указаны в табл. 1. Минерализация озер составляла от 10‰ (Большое Городское) до 300‰ (Развал и Дунино). K^+ , Na^+ и Cl^- являются главными ионами и вносят основной вклад в различия данных озер по минерализации и солёности (Павлов, 1993). Вода в озерах Развал, Дунино, Малое Городское, Новое, Тузлучное имеет хлоридно-натриевый тип, а в озере Большое Городское – хлоридно-сульфатно-натриевый тип. Таким образом, согласно Венецианской классификации, озера Развал, Дунино, Малое Городское, Новое и Тузлучное относятся к гипергалинным; Большое Городское входит в группу миксогалинных. Следует отметить, что солёность в оз. Малое Городское значительно повысилась в последние годы, по сравнению с началом XXI в. (2.0–26.3‰), за счет искусственного внесения соли в озеро, начиная с 2009 г., в целях предотвращения обрушения берега. Значения рН воды были либо близкими к нейтральным (7.1–7.9) в озерах Развал, Дунино, Малое Город-

Таблица 1. Уровень минерализации воды исследованных водоемов

Озеро	Развал	Дунино	Малое Городское	Тузлучное	Новое	Большое Городское
Минерализация (‰)	300	300	285	180	110	10
pH	7.5	7.1	7.8	8.2	8.1	8.5
Температура (°C)	10.2	11.8	9	8.8	9.5	8.8
Координаты точек отбора проб, °с.ш., в.д.	51.1510, 55.0019	51.1510, 55.0050	51.1522, 54.9998	51.1448, 55.0022	51.1486, 54.9946	51.1531, 54.9988

ское, либо слабощелочными (8–8.5) в озерах Новое, Тузлучное, Большое Городское. Значения температуры воды в исследуемых озерах варьировали в диапазоне от 8.8 до 11.8°C.

Планктонные пробы для последующего выделения тотальной ДНК отбирали в стерильную посуду, образцы воды объемом 50–100 мл фильтровали на месте отбора через мембранные фильтры с диаметром пор 0.22 мкм. Фильтры помещали в стерильные пластиковые пробирки типа Эппендорф и транспортировали образцы в замороженном виде (в жидком азоте).

Выделение тотальной ДНК. Из фильтров тотальную ДНК выделяли комбинированным методом, включавшим механическую гомогенизацию в сочетании с методом ферментативного лизиса (Белькова, 2009). К образцам добавляли 400 мкл *трис*-солевого буфера (20 ммоль/л ЭДТА, 750 ммоль/л NaCl, 100 ммоль/л *трис*-HCl, pH 8.0) и гомогенизировали с помощью гомогенизатора TissueLyser LT (“QIAGEN”, Германия) с использованием лизирующего матрикса E (“MP Bio-medicals”, США) в течение 1 мин при частоте 50 Гц. После этого добавляли 50 мкл *трис*-солевого буфера с лизоцимом (50 мг/мл) и инкубировали 60 мин при 37°C. Затем в смесь вносили 10% раствор додецилсульфата натрия до конечной концентрации 1% и 2 мкл раствора протеиназы K (10 мг/мл), инкубировали 60 мин при 60°C. После экстракции смесь фенол–хлороформ–изоамиловый спирт (25 : 24 : 1) и последующей экстракции системой растворителей хлороформ–изоамиловый спирт (24 : 1) ДНК из водной фазы осаждали трехкратным объемом абсолютного этанола с добавлением 10 М ацетата аммония (1 : 10) при –20°C в течение ночи. После центрифугирования и двойной отмывки 80% этанолом ДНК высушивали и растворяли в 30 мкл деионизированной автоклавированной воды. Для исключения из данных высокопроизводительного секвенирования возможной контаминации на этапе пробоподготовки использовали отрицательный контроль, для приготвления которого 100 мкл деионизированной автоклавированной воды обрабатывали с использованием описанной выше методики. Чистоту ДНК контролировали с помощью электрофореза в 1% агарозном геле и фотометрии на при-

боре NanoDrop 8000 (“Thermo Fisher Scientific Inc.”, США). Концентрацию ДНК определяли на флуориметре Quantus (“Promega”, США) с применением набора Quanti Fluor dsDNA (“Promega”, США).

Высокопроизводительное секвенирование. ДНК-библиотеки для секвенирования были созданы по протоколу Illumina (http://support.illumina.com/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf) с праймерами к варибельному участку V3–V4 гена 16S рРНК S-D-Bact-0341-b-S-17 и S-D-Bact-0785-a-A-21 (Klindworth et al., 2013). Секвенирование проводили на платформе MiSeq (“Illumina”, США) с использованием набора реактивов MiSeq Reagent Kit V3 PE600 (“Illumina”, США) в Центре коллективного пользования научным оборудованием “Персистенция микроорганизмов” Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН. Последовательности, полученные в результате секвенирования, депонированы в базе данных SRA NCBI под номерами SRR6781505–SRR6781510 (SRP133454).

Биоинформатическая обработка. Оценку качества прочтений проводили с использованием программы FastQC v0.11.5. На следующем этапе объединяли парно-концевые риды в контиги (объединенные риды), используя программу PEAR (Zhang, 2014). С помощью программы USEARCH v9.0.1623_win32 (Edgar, 2010) осуществляли фильтрацию объединенных ридов по качеству и длине, используя команду *fastq_filt*. Формирование ОТЕ (операционные таксономические единицы) проводили путем последовательной дерепликации и кластеризации на уровне 97%, что соответствует межвидовым различиям, используя алгоритм UPARSE (Edgar, 2013). В процессе кластеризации удаляли химерные последовательности. Для оценки количественной представленности полученных ОТЕ в образцах применяли глобальное выравнивание последовательностей ОТЕ на первоначальные объединенные риды. Из полученных данных исключали синглтоны и даблтоны (последовательности, встречающиеся однократно или дважды). Для последующего анализа из библиотек также были удалены ОТЕ, соответствующие ДНК хлоропластов. Таксономическую классификация ОТЕ про-

Таблица 2. Количественные результаты биоинформатического анализа ДНК-библиотек из планктонных образцов Соль-Илецких озер

Озеро, минерализация (‰)	Общее количество ридов	Количество контигов после слияния ридов	Количество ридов после фильтрации	Уникальные последовательности	ОТЕ	ОТЕ (количество ≥ 3)
Развал, 300	17101	15853	1692	1526	84	61
Дунино, 300	16433	15501	2075	1916	114	75
Малое Городское, 285	28981	27187	3455	2617	169	117
Тузлучное, 180	16446	15631	2455	2303	181	107
Новое, 110	15991	15165	2812	2578	162	90
Большое Городское, 10	17659	17006	3530	2261	248	140

водили с использованием базы данных RDP (<http://rdp.cme.msu.edu>), а также на платформе VAMPS (база данных SILVA 119) (Huse, 2014). Таксономическую структуру сообщества оценивали по удельной численности ОТЕ, отнесенных к разным таксонам. Кривые насыщения были построены с использованием USEARCH (Edgar, 2013).

Количество общих ОТЕ в списках, полученных для анализируемых образцов на платформе VAMPS, визуализировали с помощью диаграмм Венна. Сравнение списков ОТЕ для трех образцов с построением диаграммы Венна проводили с применением интерактивного инструмента Vennu 2.1 (Oliveros, 2015). Для сравнения шести образцов формировали шаблон диаграммы в MS Excel 2007 с использованием функции "SmartArt". Число общих ОТЕ вносили в шаблон по результатам сравнения списков ОТЕ в MS Excel 2007 с использованием функции "Фильтр".

Разнообразие прокариотных сообществ исследуемых озер оценивали с использованием нескольких показателей: количества выделенных ОТЕ – аналога видового богатства; индекса Chao1, отражающего предположительное максимальное количество ОТЕ в сообществе; а также индексов разнообразия Шеннона и Симпсона, рассчитанных в программе PAST 2.08 (Hammer et al., 2001).

Ординацию образцов, нормализованных по удельной численности, проводили по индексу таксономического сходства Брея-Кертиса с помощью программы VAMPS (Huse et al., 2014). Для этого на основе матрицы расстояний между образцами формировали "тепловую карту", а затем ее подвергали анализу методом главных компонент с построением 3D диаграммы.

Некоторые ОТЕ выравнивали с использованием алгоритма BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) на базу данных нуклеотидных последовательностей nt/nt (NCBI). Количественные результаты биоинформатического анализа суммированы в табл. 2.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Оценка таксономического богатства и разнообразия прокариот в планктонных образцах Соль-Илецких озер. Анализ показателей таксономического богатства (табл. 3) демонстрирует тенденцию к уменьшению богатства прокариотных сообществ Соль-Илецких озер по мере увеличения уровня их минерализации. Так, наибольшее число ОТЕ и максимально возможное видовое богатство, оцениваемое по индексу Chao 1, зарегистрировано в образце миксогалинного оз. Большое Городское. Минимальные значения количества ОТЕ и рассчитанных показателей видового богатства наблюдаются в образцах из озер с минерализацией 300‰. Аналогичная закономерность выявлена при оценке таксономического богатства прокариот на уровне таксонов высокого ранга (табл. 4). Однако в отношении индексов разнообразия такой зависимости не прослеживается. Для большинства Соль-Илецких озер индексы Шеннона и Симпсона одинаково высоки, отражая не только значительное таксономическое богатство, но и равномерность распределения ОТЕ. Наименее разнообразными согласно индексам Шеннона и Симпсона оказались оз. Развал с наименьшим числом ОТЕ в образце рапы и оз. Большое Городское, в планктонном образце которого, напротив, количество зарегистрированных ОТЕ было максимальным, но в то же время наблюдалось цветение и, соответственно, доминирование цианобактерий.

Таблица 3. Индексы таксономического богатства и разнообразия ОТЕ прокариот в планктонных образцах Соль-Илецких озер

Озеро, минерализация (‰)	Индексы разнообразия		
	Chao 1	Симпсона	Шеннона
Развал, 300	89	0.73	2.1
Дунино, 300	124	0.91	3.1
Малое Городское, 285	185	0.92	3.2
Тузлучное, 180	192	0.92	3.2
Новое, 110	194	0.92	3.1
Большое Городское, 10	297	0.43	1.6

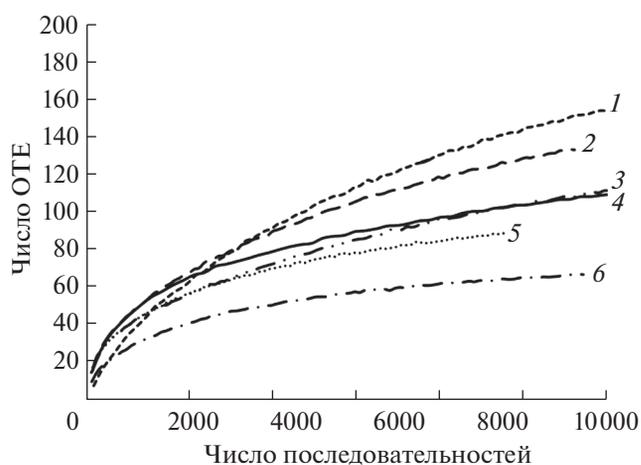
Таблица 4. Число таксонов прокариот различного ранга, выявленных в планктонных образцах Соль-Илецких озер

Озеро, минерализация (‰)	Домены	Филумы	Классы	Порядки	Семейства	Роды
Развал, 300	2	4	6	6	7	22
Дунино, 300	2	5	7	7	8	22
Малое Городское, 285	2	7	12	20	27	48
Тузлучное, 180	1	10	18	23	33	41
Новое, 110	2	10	18	29	40	50
Большое Городское, 10	1	13	25	40	57	73

Полученные кривые разрежения при увеличении числа анализируемых последовательностей приближаются к плато, однако не достигают его, по крайней мере, на уровне ОТЕ, что свидетельствует о том, что для полной характеристики разнообразия сообществ исследуемых водоемов необходимо проводить дальнейшее более глубокое секвенирование. В целом кривые разрежения имеют сходную форму и демонстрируют более высокое таксономическое богатство в озерах Большое Городское и Тузлучное (рис. 2).

Сравнительный анализ таксономической структуры прокариот в планктонных образцах Соль-Илецких озер. Сравнение таксономической структуры микробных сообществ Соль-Илецких озер проведено с использованием диаграмм Венна (рис. 3). Наибольшее количество общих ОТЕ было зарегистрировано в образцах со сходным уровнем солености. Так, для озер Развал, Дунино, Малое Городское с наивысшим уровнем солености значительное число ОТЕ оказалось общим, их доля от всей совокупности ОТЕ в этих образцах составила от 46% в оз. Малое Городское до 85% в оз. Дунино и 91% в оз. Развал. Уникальными оказались ОТЕ, принадлежащие единичным минорным видам, таким как: в образце оз. Развал – *Halococcus* sp., *Halorubrum orientale*; оз. Дунино – археи *Halorubrum kocurii*, *Natronarchaeum* sp., *Halanaerobacter chitinivorans*, бактерии *Sulfurimonas* sp. В образце оз. Малое Городское список уникальных видов прокариот был значи-

тельно шире и включал как экстремально галофильные археи *Haloarcula marismortui*, *Halobacterium noricense*, *Halomicrobium mukohataei*, *Halopenitus* sp. и др., так и умеренно галофильные бактерии *Psychroflexus sediminis*, *Halomonas* sp., *Marinomonas aquimarina* и т.д. Для образцов из озер Новое и Тузлучное с близкими значениями солености об-

**Рис. 2.** Оценка α -разнообразия ОТЕ прокариот в планктонных образцах Соль-Илецких озер при помощи кривых разрежения. Обозначения: 1 – Большое Городское, 2 – Тузлучное, 3 – Новое, 4 – Малое Городское, 5 – Дунино, 6 – Развал.

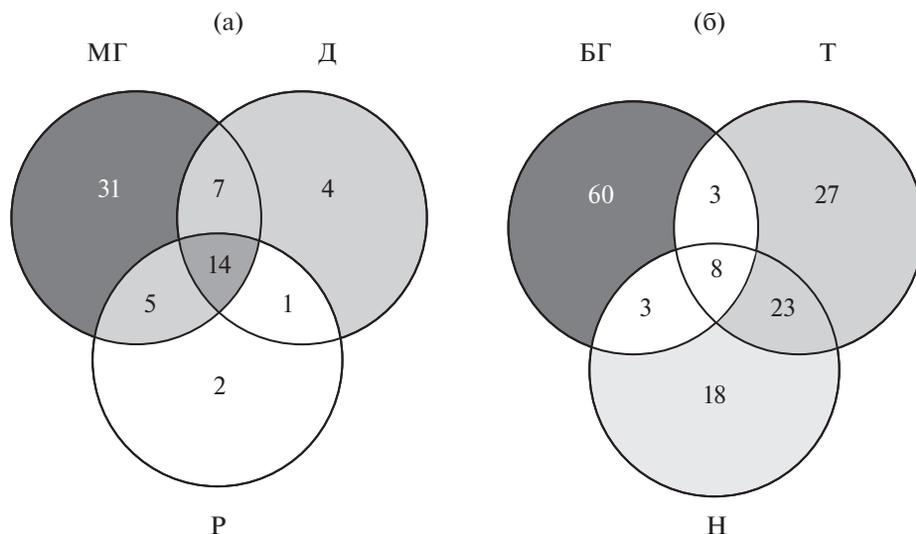


Рис. 3. β-Разнообразие ОТЕ прокариот в планктонных образцах Соль-Илецких озер с соленостью 285–300‰ (а) и с соленостью 10–180‰ (б), охарактеризованное при помощи диаграмм Венна. Обозначения как на рис. 1.

щими оказались более 50% ОТЕ, среди которых – *Psychroflexus* sp., *Gracilimonas* sp., *Roseovarius* sp., *Sediminimonas* sp., *Spiribacter* sp., *Halomonas* sp. и др. В образце миксогалинного оз. Большое Городское более 80% ОТЕ были уникальными, не встречавшимися в других образцах Соль-Илецких озер.

При сравнении списков ОТЕ не было выявлено последовательностей общих для всех шести озер (рис. 4). Общими для пяти озер оказались гаммапротеобактерии рода *Spiribacter*, обнаруженные при уровне солености от 110 до 300‰, и последовательности некультивируемых микроорганизмов “*Ca. Parcubacteria*”, обнаруженные при уровне солености от 10 до 300‰. Среди других общих для четырех Соль-Илецких озер были единичные, в основном, минорные ОТЕ, в частности неидентифицированные альфапротеобактерии порядка *Rickettsiales* и фирмикуты рода *Fusibacter*. Единственным исключением оказались представители рода *Spiribacter*, не только обнаруженные в пяти озерах при уровне солености от 110 до 300‰, но и входящие в состав доминантов. Преобладание набора уникальных ОТЕ в каждой группе слабо-, средне- и высокоминерализованных озер говорит о значительной зависимости состава прокариотных планктонных сообществ Соль-Илецких озер от солености.

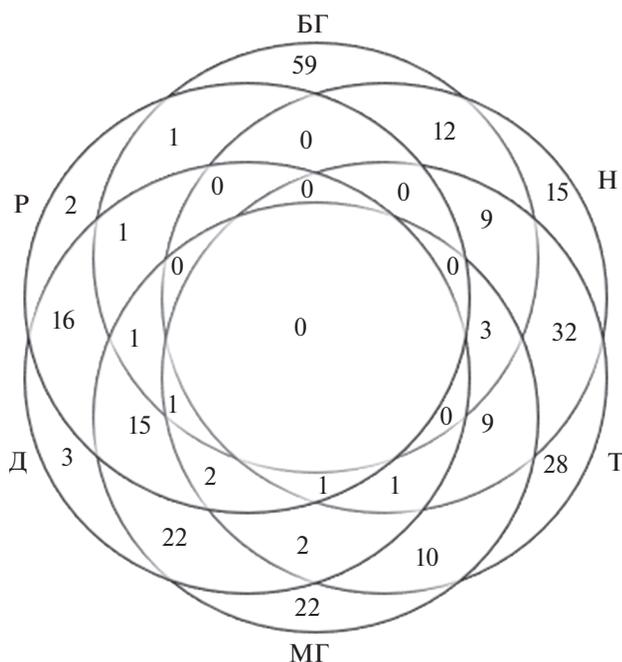


Рис. 4. β-Разнообразие ОТЕ прокариот в планктонных образцах шести Соль-Илецких озер, охарактеризованное при помощи диаграмм Венна. Обозначения как на рис. 1.

Сравнение таксономического состава прокариотных сообществ в планктонных образцах исследуемых водоемов проводили методом главных компонент на основе индекса сходства Брея-Кертиса (рис. 5). Полученный 3D график характеризует более 90% общей изменчивости родового состава прокариот в исследуемых образцах. Образцы из озер Развал, Дунино и Малое Городское с наивысшей соленостью находятся рядом, сформировав отчетливый кластер. Образцы из озер с меньшей соленостью Новое и Тузлучное расположены отдельно и могут быть объединены в отдельную группу. Образец оз. Большое Городское с наименьшей соленостью значительно удален от остальных. В целом, данная диаграмма демон-

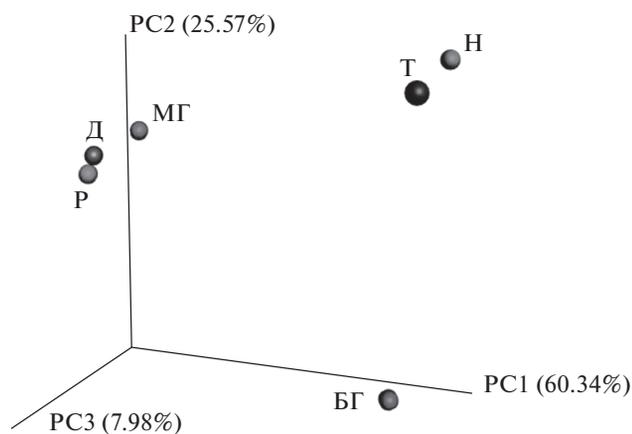


Рис. 5. Ординация планктонных прокариотных сообществ Соль-Илецких озер, выполненная методом главных компонент. Обозначения как на рис. 1.

стрирует выраженные отличия в составе прокариот между озерами с разными уровнями минерализации – 10, 110–180 и 285–300‰.

Количественная характеристика таксонов прокариот высшего ранга в планктонных образцах Соль-Илецких озер. На рис. 6 представлено соотношение таксонов высшего ранга (филумы, классы) в структуре прокариотных сообществ в планктонных образцах Соль-Илецких озер. Соотношение разных филумов и классов прокариот имело четкие раз-

личия в зависимости от уровня минерализации водоемов. Так, в ДНК-библиотеках из озер с соленостью, близкой к уровню насыщения (Малое Городское, Дунино и Развал), преобладали экстремально галофильные представители филума *Euryarchaeota*, на долю которых приходилось около половины всех ридов. Также были выявлены последовательности архей филума *Nanohaloarchaeota*, удельная численность которых составила от 11 до 21%, в зависимости от образца. Соответственно, на долю бактериальных ОТЕ приходилось менее 50% и, в основном, они принадлежали филуму *Bacteroidetes*. Последовательности *Bacteroidetes* были наиболее многочисленны в образце озера Развал, где они составляли более 38%. В ДНК-библиотеках озер Развал, Дунино и Малое Городское были обнаружены последовательности класса *Gammaproteobacteria*, доля которых составляла 0,3, 6 и 10% соответственно. Часть ОТЕ относилась к филуму *Parcubacteria* (OD1). В незначительном количестве были выявлены бактериальные ОТЕ, принадлежащие филуму *Firmicutes*, а также классу *Epsilonproteobacteria*.

В озерах Новое и Тузлучное с минерализацией, соответственно, 110 и 180‰ таксономическая структура микробного сообщества значительно отличалась от водоемов с высокой соленостью и характеризовалась более разнообразным таксономическим составом. ОТЕ в каждой ДНК-библиотеке этих озер принадлежали 10 филумам. Архейные си-

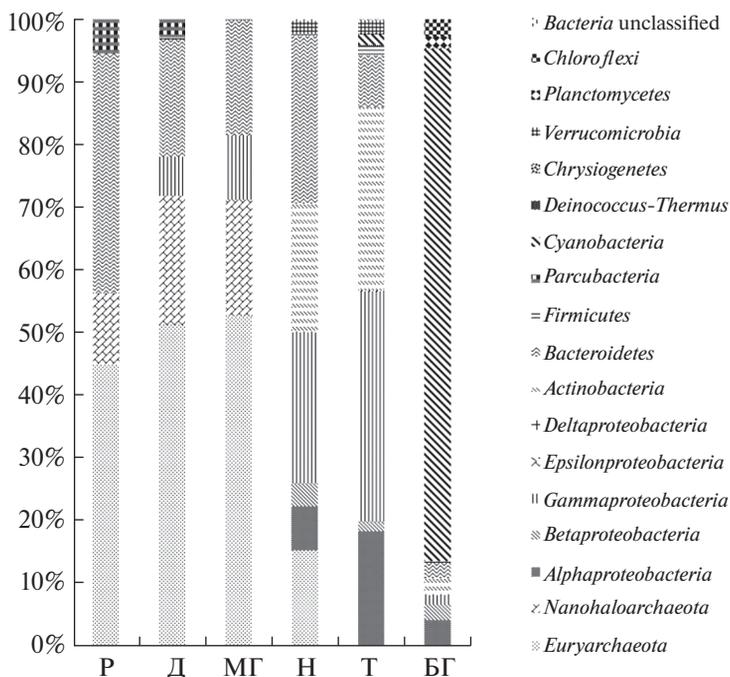


Рис. 6. Удельная численность ОТЕ доминирующих филумов прокариот (для протеобактерий указаны классы) в планктонных образцах Соль-Илецких озер. Обозначения как на рис. 1.

квенсы обнаружены только в образце из оз. Нового и были представлены неидентифицированными представителями семейства *Haloferacaceae* (филум *Euryarchaeota*), однако удельная численность их была довольно высока и достигала 15% от всех ридов. В обоих образцах наиболее многочисленными были представители филумов *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*. Протеобактерии включали классы *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria* и *Epsilonproteobacteria*, среди которых преобладали гамма- и альфапротеобактерии. Риды филума *Verrucomicrobia* составляли по 2% в каждом из описываемых сообществ. В образце из оз. Нового были также выявлены представители бактериальных филумов *Firmicutes*, *Deinococcus-Thermus*, *Chloroflexi*, *Chrysiogenetes*, однако их удельная численность была незначительной. В ДНК-библиотеке оз. Тузлучное на долю ОТЕ, относящихся к *Firmicutes* и *Cyanobacteria* приходилось по 1.6–1.7%, а среди минорных филумов оказались *Parcubacteria*, *Deinococcus-Thermus*, *Chloroflexi*, *Planctomycetes*.

Образец из миксогалинного оз. Большое Городское значительно отличался по таксономическому составу от образцов из других Соль-Илецких озер. В ДНК-библиотеке этого образца более 80% составляли риды филума *Cyanobacteria*, что соответствовало наблюдаемому цветению цианобактерий в этом водоеме. Отмечена высокая удельная численность представителей филумов *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Planctomycetes*, *Chloroflexi*, *Proteobacteria*, в последнем преобладали альфа-, бета- и гаммапротеобактерии. Также в сообществе выявлены ОТЕ, принадлежащие филумам *Verrucomicrobia*, *Tenericutes*, *Parcubacteria*, *Firmicutes*.

Доминирующие роды прокариот в планктонных образцах Соль-Илецких озер. При анализе таксономической структуры и относительного обилия на родовом уровне отмечено, что, в целом, в образцах из трех озер с высокой соленостью набор доминирующих родов, доля которых превышала 1%, был сходным (табл. 5). В ДНК-библиотеках озер Развал, Дунино и Малое Городское доминировали последовательности рода экстремально галофильных бактерий *Salinibacter*. В образце оз. Развал доля представителей этого рода превысила 50%. Также, значительную долю (18–27%) во всех трех ДНК-библиотеках составляли ОТЕ рода *Halonotius*. Однако, в отличие от двух других озер, в образце из оз. Малое Городское отмечена высокая удельная численность рода *Spiribacter* (более 9%), а в образцах из озер Развал и Дунино в большом количестве представлены последовательности *Parcubacteria*. В образцах из высокоминерализованных озер также доминировали последовательности архей филумов *Euryarchaeota* (роды *Haloarcula*, *Halomicroarcula*, *Halobellus*, *Halohasta*,

Halorubrum, *Natronomonas*) и *Nanohaloarchaeota* (“*Ca. Nanosalina*”). Таким образом, доминирующий комплекс, на долю которого приходилось около 70% всех ридов, в образце оз. Развал был представлен родами *Salinibacter* и *Halonotius*, образце оз. Дунино – *Salinibacter*, *Halonotius* и “*Ca. Nanosalina*”, образце оз. Малое Городское – *Salinibacter*, *Halonotius*, *Halorubrum* и “*Ca. Nanosalina*”.

В образцах озер Новое и Тузлучное, имеющих минерализацию 110 и 185‰ соответственно, значительную долю от общей численности ридов составляли гаммапротеобактерии рода *Spiribacter* (15–24%). Доминирующий комплекс оз. Нового, наряду со *Spiribacter*, включал в себя роды актинобактерий *Pontimonas*, флавобактерий *Psychroflexus* и неидентифицированных архей семейства *Haloferacaceae* sp. В образце из оз. Тузлучное доминировали также актинобактерии *Rhodoluna* и *Pontimonas*, а также альфапротеобактерии *Roseovarius*.

В образце планктона из оз. Большое Городское (минерализация 10‰) наблюдалось массовое цветение цианобактерий, что проявилось в выраженном преобладании в ДНК-библиотеке последовательностей рода *Planktothrix* порядка *Oscillatoriales*, доля которых превышала 77%. Среди доминантов зарегистрированы ОТЕ, принадлежащие цианобактериям *Oscillatoria*, альфапротеобактериям *Marivita*, метилотрофным гаммапротеобактериям *Methylomonas*, представителям рода *Litorilinea* филума *Chloroflexi*, неидентифицированным представителям порядка *Actinomycetales*, а также филума *Verrucomicrobia* класса *Spartobacteria*.

Доминирующие последовательности в планктонных образцах Соль-Илецких озер и их ближайшие гомологи в базе данных GenBank (NCBI). В исследуемых ДНК-библиотеках были выбраны доминирующие ОТЕ, удельная численность которых в совокупности составила более 60% от всех ридов в образце, для последующего выравнивания на базу данных нуклеотидных последовательностей nr/nt (NCBI) с использованием алгоритма BLAST (табл. 6). В ДНК-библиотеках озер с высокой соленостью Развал, Дунино и Малое Городское доминировали одинаковые ОТЕ, идентифицированные как представители рода *Salinibacter*. Наиболее близкой последовательностью в GenBank для них оказался некультивируемый бактериальный клон из крупного соленого тибетского оз. Чайерхан в провинции Цинхай, Китай (Zhang et al., 2013). Также во всех образцах из озер с высшей соленостью доминировали архейные ОТЕ, идентифицированные как *Halonotius pteroides*, ближайшие гомологи которых были обнаружены в образцах талассогалинных соляных прудов в Тунисе (Trigui et al., 2011), Герреро-Негро в Мексике (Dillon et al., 2013) и в Большом соленом

Таблица 5. Доминирующие роды прокариот ($\geq 1\%$) в планктонных образцах из Соль-Илецких озер

Филум	Класс	Род	Большое Городское	Тузлуное	Новое	Малое Городское	Дунино	Развал
<i>Cyanobacteria</i>	<i>Cyanobacteria</i>	<i>Planktothrix</i>	77.6	0	0	0	0	0
		<i>Oscillatoria</i>	1.3	0	0	0	0	0
<i>Chloroflexi</i>	<i>Caldilineae</i>	<i>Litorilinea</i>	2.7	0	0	0	0	0
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i> sp.	1.7	0	0.1	0	0	0
		<i>Pontimonas</i>	0	12.1	12.1	0	0	0
		<i>Rhodoluna</i>	0.1	15.2	7.9	0	0	0
		<i>Nitriliruptor</i>	0	1.8	0	0	0	0
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Flavobacteriia</i>	<i>Psychroflexus</i>	0	1.0	11.2	0	0	0
		<i>Cryomorphaceae</i> sp.	0.1	1.1	9.8	0	0	0
	<i>Sphingobacteriia</i>	<i>Gracilimonas</i>	0	3.6	1.6	0	0	0
		<i>Saprospiraceae</i> sp.	0.8	1.9	1.6	0	0	0
		<i>Chitinophagaceae</i> sp.	0	0	1.1	0	0	0
		<i>Salinibacter</i>	0	0	0	20.9	22.5	52.5
<i>Bacteroidetes</i> unclassified	0	0	0	3.2	2.3	1.5		
<i>Firmicutes</i>	<i>Erysipelotrichia</i>	<i>Erysipelotrichaceae</i> sp.	0	1.3	0	0	0	0
<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Marivita</i>	1.5	2.6	0	0	0	0
		<i>Roseovarius</i>	0	12.6	3.3	0	0	0
		<i>Sediminimonas</i>	0	0.57	1.8	0	0	0
		<i>Rhodobacteraceae</i> sp.	0.48	1.1	0.92	0	0	0
	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Alcaligenaceae</i> sp.	0.19	1.5	3.4	0	0	0
	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Methyloparacoccus</i>	1.2	0	0	0	0	0
		<i>Spiribacter</i>	0	24	16	9.1	0.11	0.04
		<i>Wenzhouxiangella</i>	0	4.2	4.2	0	0	0
		<i>Halomonas</i>	0	1.4	0.5	0	0	0
		<i>Francisella</i>	0	2.1	0.04	0	0	0
		<i>Methylophaga</i>	0	1.5	0.8	0	0	0
		<i>Gammaproteobacteria</i> unclassified	0	1.4	0.5	0	0	0
	<i>Verrucomicrobia</i>	<i>Spartobacteria</i>	<i>Spartobacteria</i> sp.	1.5	0	0	0	0
<i>Opitutae</i>		<i>Coralimargarita</i>	0	0.46	1.2	0	0	0
		<i>Puniceicoccus</i>	0	1.6	0	0	0	0
<i>Euryarchaeota</i>	<i>Halobacteria</i>	<i>Haloferacaceae</i> sp.	0	0	15.4	0	0	0
		<i>Halomicroarcula</i>	0	0	0	1.4	7.4	2.3
		<i>Halobellus</i>	0	0	0	5.4	3.8	1.9
		<i>Halohasta</i>	0	0	0	1.1	0	1.9
		<i>Halonotius</i>	0	0	0	20.3	27.3	18.3
		<i>Halorubrum</i>	0	0	0	12.9	6.4	2.9
		<i>Natronomonas</i>	0	0	0	2.9	3.1	0.1
		<i>Haloarcula</i>	0	0	0	1.4	0.3	0.3
<i>Nanohaloarchaeota</i>		<i>Cand. Nanosalina</i>	0	0	0	13.4	17.7	6.6
<i>Parcubacteria</i>		<i>Cand. Parcubacteria</i>	0.06	0.14	0	0.16	5.2	9.5

озере, США (Tazi et al., 2014). Другими представителями доминирующих архейных ОТЕ были неидентифицированные последовательности филума *Nanohaloarchaeota*, наиболее близкие гомологи которых были отмечены в соленых водоемах Центральной Монголии (Pagaling et al., 2009) и соляных прудах Испании (Ghai et al., 2011). Доминирующие ОТЕ, характерные только для оз. Дунино, были идентифицированы как *Halorubrum kocurii*, наиболее близкий гомолог которой найден в соленом оз. Урмия (Иран) (Jookar Kashi et al., 2014), и *Halorubrum orientale*, ближайший гомолог которой зарегистрирован в соляных прудах Герреро Негро (Dillon et al., 2013). Также в образце оз. Дунино доминировала ОТЕ, представляющая собой неидентифицированные археи семейства *Haloarculaceae*, гомолог которой был выявлен в ДНК-библиотеке из осадков эугалинной лагуны Фра Рамон в Испании (Llirós et al., 2013). Из трех водоемов с максимальной соленостью только в образце оз. Малое Городское значительную долю составляли ОТЕ, принадлежащие умеренно галофильным бактериям недавно описанного вида *Spiribacter roseus* (Leon et al., 2016), обнаруженного в различных соленых водоемах Испании. Кроме того, в том же образце доминировали архейные последовательности, принадлежащие *Halorubrum kocurii*, ближайшие гомологи которых выявлены в соляных прудах Туниса (Baati et al., 2010), и в гипергалинном оз. Мейган, Иран (Naghoni et al., 2017).

Для гипергалинных озер с уровнем солености менее 200‰ были характерны другие доминирующие ОТЕ. В образцах из озер Новое и Тузлучное сходными оказались ОТЕ актиномицетов, идентифицированные как *Pontimonas salivibrio* (Jang et al., 2013). Представитель данного вида впервые был выделен из морской воды, поступающей в бассейны для выпаривания соли в Корею, тогда как ближайший гомолог ОТЕ из наших озер выявлен в образце грунта морского побережья в Китае. Ближайший гомолог доминирующей ОТЕ рода *Spiribacter* из образца оз. Новое обнаружен в воде Аральского моря, соленость в большей части которого (Большой Арал) в настоящее время превышает 100‰, тогда как ближайший гомолог ОТЕ того же рода из образца оз. Тузлучное выявлен в соленом оз. Юньчэн (Китай). Общими доминирующими ОТЕ оказались также гаммапротеобактерии рода *Wenzhouxiangella*, ближайший гомолог которых был выявлен в соляных прудах Сфакса в Тунисе (Baati et al., 2010). В доминирующих ОТЕ, характерных для оз. Нового, обнаружены архейные ОТЕ, идентифицированные на уровне семейства *Haloferacaceae*, и ОТЕ актинобактерий *Herbiconiux*, ближайшие гомологи которых были найдены в Аральском море. Также в образце из этого озера доминировали ОТЕ, принадлежащие умеренно галофильной бактерии *Psychroflexus sediminis*, бли-

жайший гомолог которой был выявлен в соляном пруду с минерализацией 210‰ в Испании (Fernández et al., 2014), а также ОТЕ, идентифицированная на уровне порядка *Flavobacteriales*, ближайший гомолог которой был обнаружен в гипергалинном содовом озере Моно в Калифорнии, имеющем соленость 84–94‰ (Humayoun et al., 2003.) Другие доминирующие ОТЕ в образце оз. Тузлучное были определены как актинобактерии *Herbiconiux solani* и альфапротеобактерии *Roseovarius azorensis*. Их ближайшие гомологи обнаруживались, соответственно, в воде Аральского моря и рапе соленых водоемов в Японии.

В планктонном образце из оз. Большое Городское, в отличие от других Соль-Илецких озер, доминировали ОТЕ цианобактерий, среди которых преобладал представитель рода *Planktothrix*, удельная численность которого составила 77.2%. За счет массового развития этой цианобактерии наблюдалось цветение воды в озере. В основном, представители данного рода вызывают цветение пресных водоемов, однако верхний порог галотолерантности некоторых видов достигает 12.8–18.3‰ что позволяет им с успехом осваивать солоноватые водоемы (Suda et al., 2002).

ОБСУЖДЕНИЕ

Таким образом, в результате проведенного исследования впервые методом высокопроизводительного секвенирования изучено разнообразие прокариот в планктонных сообществах соленых Соль-Илецких озер. Располагаясь близко друг к другу, эти водоемы значительно различаются по солености, в соответствии с которой шесть изученных озер можно условно разделить на три группы: с высокой соленостью 285–300‰ (озера Развал, Дунино, Малое Городское), средней соленостью 110–180‰ (озера Новое, Тузлучное) и низкой соленостью 10‰ (оз. Большое Городское). Таксономическое богатство в озерах с высокой соленостью было меньше, по сравнению водоемами с меньшей соленостью, о чем свидетельствовало как число зарегистрированных таксонов различного уровня, так и индекс Chao 1, отражающий предполагаемое видовое богатство. Ранее с использованием метагеномного подхода отмечали снижение таксономического богатства микробного сообщества по мере увеличения солености воды в градиенте солености на примере соляных испарительных прудов (Ghai et al., 2011). Однако во многих исследованиях описывается высокое таксономическое разнообразие микробных сообществ гипергалинных водоемов, например, таких как Большое соленое озеро или соляные испарительные пруды в Тунисе (Baati et al., 2010). В проведенном исследовании не было выявлено четкой статистической зависимости показателей видового разнообразия от солености. Индекс Шеннона для планктонных

Таблица 6. Краткая характеристика доминирующих последовательностей фрагментов гена 16S рРНК в планктонных образцах Соль-Илецких озер и их ближайших гомологов в базе данных GenBank (NCBI). К доминирующим относили ОТЕ, удельная численность которых в сумме составляла более 60% от числа всех парных ридов в одной из ДНК-библиотек

Филогенетическое положение	ОТЕ	Длина фрагмента (пар оснований)	Ближайший гомолог (Ас. №)	Биотоп, в котором выявлен ближайший гомолог, и его географическое положение	Сходство с ближайшим гомологом	Ближайший культивируемый гомолог (Ас. №)	Сходство с ближайшим культивируемым гомологом
<i>Euryarchaeota</i> <i>Haloquatruncaceae</i>	P-2 Д-1 МГ-3	426	Uncultured archaeon clone TSHNAA23 (HQ157628.1)	Соляной пруд HNA2 (Сфакс, Тунис)	99%	<i>Halorotius pteroides</i> (FN994962.1)	97%
	P-4 Д-79 МГ-28	426	Uncultured archaeon clone SA_SAWN2_A13 (KF585328)	Большое соленое озеро, Южная линия (США, Юта)	99%	<i>Halorotius pteroides</i> (FN994962.1)	99%
	Д-30	309	Uncultured archaeon clone P11_2_4A (KF234337.1)	Соляные пруды Герреро Негро (Мексика)	99%	<i>Halorubrum orientale</i> strain CECT 7145 (NR_113483.1)	99%
	МГ-16	425	Uncultured <i>Halorubrum</i> sp., clone 209ZD06 (FN391184.1)	Осадки соляного пруда (Сфакс, Тунис)	99%	<i>Halorubrum orientale</i> strain CECT 7145 (NR_113483.1)	98%
	МГ-33	425	<i>Halorubrum kocurii</i> strain MLW3 (KY411786.1)	Вола гипералинного озера Мейган (Иран)	99%	<i>Halorubrum kocurii</i> strain MLW3 (KY411786.1)	99%
	Д-27	425	<i>Halorubrum</i> sp. O14 (KJ634458)	Соленое озеро Урмия (Иран)	99%	<i>Halorubrum kocurii</i> strain JCM 14978 (NR_113215)	99%
<i>Euryarchaeota</i> <i>Haloquatruncaceae</i>	Д-22	425	Uncultured euryarchaeote clone FR-J-Sd-W3-C4 (KC661802.1)	Осадки эуалинной лагуны Фра Рамон (Испания)	99%	<i>Halomicroaureula pellucida</i> strain BNERC31 (NR_114351.1)	96%
	Н-1	425	Uncultured archaeon clone SeqA24 (MG388251.1)	Вола Аральского моря (Узбекистан)	99%	<i>Halobellus rufus</i> strain CBA1103 (NR_126292.1)	94%
<i>Candidatus</i> <i>Nanohaloarchaeota</i> <i>Nanohaloarchaeae</i>	P-28 Д-4 МГ-6	429	Uncultured archaeon, clone AGA19 (FM210904)	Соленое озеро (Китай, Центральная Монголия)	99%	<i>Nanohaloarchaeae</i> archaeon SG9 (CP012986.1)	89%
	P-7 Д-6	430	Uncultured archaeon clone 4097 (KJ546112)	Соляной пруд (Испания)	99%	<i>Nanohaloarchaeae</i> archaeon SG9 (CP012986.1)	92%
<i>Bacteroidetes</i> <i>Rhodothermaceae</i>	P-1 Д-5 МГ-4	459	Uncultured bacterium clone SINI397 (HM126809)	Тибетское озеро Черхан (Китай)	99%	<i>Salinibacter ruber</i> strain POLA 18 (AF323502.1)	95%

Таблица 6. Окончание

Филогенетическое положение	ОТЕ	Длина фрагмента (пар оснований)	Ближайший гомолог (Ас. №)	Биотоп, в котором выявлен ближайший гомолог, и его географическое положение	Сходство с ближайшим гомологом	Ближайший культивируемый гомолог (Ас. №)	Сходство с ближайшим культивируемым гомологом
<i>Cand. Parcubacteria</i>	P-3 Д-15	445	Uncultured bacterium, clone EN165 (FM210995)	Соленое озеро (Китай, Центральная Монголия)	97% 98%	<i>Cand. Sonnebornia yantaiensis</i> clone УТРагаВас3 (KC495062.1)	81%
<i>Astinobacteria Microbacteriaceae</i>	H-3 Т-8	445	Uncultured actinomycete clone ZY-139 (JX242806.1)	Грунт морского побережья (Китай)	99%	<i>Pontinonax salivibrio</i> strain CL-TW6 (NR_109611.1)	99%
	H-7 Т-2	445	Uncultured bacterium clone SeqB17 (MG388270.1)	Вода Аральского моря (Узбекистан)	99%	<i>Herbiconiux flava</i> strain NBRC 16403 (NR_113225.1)	98%
<i>Bacteroidetes Flavobacteriaceae</i>	H-2	460	Uncultured bacterium clone IC21-C1758 (KJ588890.1)	Соляные пруды (Исла Кристина, Испания)	99%	<i>Psychroflexus sediminis</i> strain Bsw-36a (KX161385.1)	99%
	H-5	460	Uncultured CFV group bacterium clone ML110J-35 (AF452592.1)	Гипералинное озеро Моно (Калифорния, США)	99%	<i>Owenweekia hongkongensis</i> strain DSM 17368 (NR_074100.1)	90%
<i>Proteobacteria Ectothiorhodospiraceae</i>	МГ-30	465	<i>Spiribacter</i> sp. SP30, strain SP30 (LT714150.1)	Соленый водоем (Испания)	99%	<i>Spiribacter roseus</i> , strain SSL4 (LT604083.1)	99%
	H-19	465	Uncultured bacterium clone SeqB20 (MG388273.1)	Вода Аральского моря (Узбекистан)	99%	<i>Spiribacter roseus</i> strain SSL50 (NR_152089.1)	97%
	Т-47	465	Bacterium YC-ZSS-LKJ110 (KP174462.1)	Соленое озеро Юньчэн (Китай)	99%	<i>Spiribacter salinus</i> M19-40 (CP005963.1)	99%
<i>Proteobacteria Rhodobacteraceae</i>	Т-1	440	<i>Roseovarius</i> sp. A-2 (LC010105.1)	Рапа соленого водоема (Тиба, Япония)	99%	<i>Roseovarius azorensis</i> strain SSW084 (NR_126272.1)	99%
<i>Proteobacteria Wenzhouxiangellaceae</i>	H-8 Т-3	465	Uncultured bacterium clone 185ZA01 (CU467480.1)	Соляные пруды (Сфакс, Тунис)	99%	<i>Wenzhouxiangella marina</i> strain KCTS 42284 (CP012154.1)	96%
<i>Cyanobacteria Microcoleaceae</i>	БГ-1	443	<i>Planktothrix rubescens</i> , strain NIES-1267 (LC319765.1)	Коллекция культур NIES:1267	99%	<i>Planktothrix agardhii</i> strain NIES-204 (NR_112126.1)	99%

сообществ прокариот Соль-Илецких озер в основном составлял 3.1–3.2 за исключением двух озер (Большое Городское и Развал).

Сравнительный анализ таксономического состава планктонных сообществ прокариот в Соль-Илецких озерах продемонстрировал глубокие различия в зависимости от уровня солености водоема, что было продемонстрировано на уровне таксонов как высокого, так и низкого ранга. В озерах с максимальной соленостью (оз. Развал, Дунино и Малое Городское) большей удельной численностью характеризовались экстремально галофильные археи филумов *Euryarchaeota* и *Nanohaloarchaeota*, а также бактерии филума *Bacteroidetes*. Доминирование *Euryarchaeota* и *Bacteroidetes*, а также повышение разнообразия архей характерно для соленых водоемов с уровнем солености более 200‰ (Oren, 2014). Для водоемов со средним уровнем солености (оз. Тузлучное, Новое) было характерно преобладание филумов *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*. Подобное влияние градиента солености на микробное сообщество хорошо показано на соляных испарительных прудах, где большинством исследователей отмечается снижение таксономического разнообразия бактерий и повышение разнообразия архей при нарастании уровня солености. В солоноватом озере Большое Городское наблюдалось массовое развитие представителей филума *Cyanobacteria*, цветение которых может свидетельствовать о неблагоприятном экологическом состоянии этого озера.

В Соль-Илецких озерах с соленостью 285–300‰ определен доминирующий комплекс ОТЕ, представленный археями *Halonotius* sp., некультивируемыми представителями класса *Nanohaloarchaea* и бактериями *Salinibacter* sp. Все зарегистрированные в озерах ОТЕ прокариот относятся к таксонам экстремальных галофилов, большинство из которых ранее обнаруживались в гипергалинных местообитаниях другой локализации, в том числе недавно описанные бактерии рода *Spiribacter* и археи класса *Nanohaloarchaea*. Однако, несмотря на сходство таксономической структуры и списка родов прокариот в гипергалинных местообитаниях, есть и существенные различия в составе доминантных комплексов. Так, для соленых испарительных прудов в Испании, Израиле, Австралии, Турции и Тунисе с соленостью, близкой к уровню насыщения, доминирующими родами были археи *Haloquadratum* sp. или *Halorubrum* sp. и бактерии *Salinibacter* sp. (Anton et al., 2002; Legault et al., 2006; Trigui et al., 2011). В то же время в Соль-Илецких озерах такой распространенный и массово развивающийся род как *Haloquadratum* не был зарегистрирован, а развитие представителей рода *Halorubrum* было сравнительно незначительным. Доминирующий комплекс оз. Тузлучное (180‰) включал гаммапротеобактерии рода *Spiribacter*, актинобактерии *Pontimonas* sp. и *Rhodoluna* sp.,

альфапротеобактерии *Roseovarius* sp., а в оз. Новое (110‰) наряду с актинобактериями рода *Pontimonas* и гаммапротеобактериями рода *Spiribacter*, доминировали еще и неидентифицированные археи семейства *Haloferacaceae* и флавобактерии рода *Psychroflexus*. Солоноватое озеро Большое Городское характеризовалось доминированием цианобактерий рода *Planktothrix*.

Отсутствие общих ОТЕ для всех шести Соль-Илецких озер и преобладание набора уникальных ОТЕ в каждой группе слабо-, средне- и высокоминерализованных озер, несмотря на их близкую локализацию, говорит о значительной зависимости состава прокариотных планктонных сообществ Соль-Илецких озер от солености, поскольку по другим признакам исследуемые озера практически не отличаются. С другой стороны, присутствие рода *Spiribacter* в пяти озерах при уровне солености от 110 до 300‰ и высокие показатели относительного обилия в образцах с соленостью до 285‰ свидетельствует о широкой экологической валентности представителей этого рода и важной роли в галофильных микробных сообществах. Обнаружение в библиотеках многих образцов последовательностей филума *Parcubacteria*, включающего некультивируемых микроорганизмов-симбионтов (Nelson, Stegen, 2015), вероятно, говорит о существенном вкладе эукариотических организмов в развитие прокариотного сообщества в гипергалинных озерах.

Анализ географической локализации ближайших гомологов доминирующих ОТЕ демонстрирует, с одной стороны, их космополитичное распространение, так как сходные последовательности обнаруживали в соленых водоемах Евразии, Африки и Северной Америки. С другой стороны, это свидетельствует о ведущей роли солености как фактора, определяющего таксономический состав планктонного сообщества прокариот в соленых водоемах. Так, ОТЕ, доминирующие в озерах с высокой соленостью Развал, Дунино и Малое Городское, регистрировались ранее в соляных прудах Туниса (Сфакс), Мексики (Герреро Негро), Испании, соленых озерах Китая, Монголии, а также в Большом соленом озере в США, в озерах Урмия и Мейган в Иране. Последовательности, сходные с доминантными ОТЕ из умеренно минерализованных озер Тузлучное и Новое, были обнаружены в воде Аральского моря (Узбекистан), в морской воде и рапе с промежуточной соленостью (Испания, Тунис), в грунте морского побережья, в гипергалинном озере Моно (США). У всех этих водоемов уровень солености был менее 200‰. Отсутствие специфичности таксономического состава прокариот в гипергалинных водоемах различной локализации отмечалось ранее на примере микробных сообществ соленых озер Монголии и Аргентины (Pagaling et al., 2009), однако для полной характеристики влияния гео-

графической локализации гипергалинных водоемов на формирование микробных сообществ требуются дальнейшие исследования.

В сообществах водоемов с высокой минерализацией среди выявленных микроорганизмов многие не идентифицированы, и, возможно, представляют собой новые таксоны. Таким образом, первые данные об особенностях таксономического состава и разнообразия планктонных сообществ Соль-Илецких озер, полученные с применением метода высокопроизводительного секвенирования, расширяют наши представления об изменчивости структуры и функционировании галофильных микробиоценозов.

Работа выполнена в ЦКП “Персистенция микроорганизмов” ИКВС УрО РАН (г. Оренбург) и частично поддержана грантами РФФИ № 16-44-560316 и 17-04-00135.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Абдрахманов А.Р. Микрофлора соленого водоема (озеро Развал Оренбургской области). Автореферат дис. ... канд. мед. наук. 26.06.2001. Оренбург: Оренбургская государственная медицинская академия. 2001. 21 с.
- Абдрахманов А.Р., Абдрахманов А.Р., Буткова Г.А. Минеральные и грязевые озера Соль-Илецка. Соль-Илецк, 2005. 68 с.
- Белькова Н.Л. Модифицированная методика выделения суммарной ДНК из водных проб и грунтовых вытяжек методом ферментативного лизиса. Молекулярно-генетические методы анализа микробных сообществ. Разнообразие микробных сообществ внутренних водоемов России: Учебно-методическое пособие. Ярославль: Принтхаус, 2009. С. 53–63.
- Блюмина Л.С. Биология соленых Соль-Илецких озер. Автореферат дис. ... канд. биол. наук. 23.01.1959. Оренбург: Оренбургский медицинский институт, 1958. 24 с.
- Немцева Н.В., Селиванова Е.А., Игнатенко М.Е., Шаранова Н.В. Характеристика нового штамма *Dunaliella salina* (Chlorophyta) и оценка параметров его культивирования // Физиология растений. 2013. Т. 60. № 4. С. 561–568.
- Nemtseva N.V., Selivanova E.A., Ignatenko M.E., Sharapova N.V. Characterization of a novel *Dunaliella salina* (Chlorophyta) strain and the assessment of its cultivation parameters // Russian J. Plant Physiol. V. 60. P. 529–535.
- Мыльников А.П. Новый жгутиконосец *Percolomonas lacustris* sp. nov. (*Excavata*, *Percolozoa*) из континентального соленого озера (юго-восток Европейской части России) // Зоологический журнал. 2015. Т. 94. № 4. С. 375–382.
- Павлов А.О. Отчет о детальной разведке лечебных грязей озер Тузлучное и Дунино, а также по изучению рапы озера Развал для обеспечения грязевыми и рапными ресурсами Соль-Илецкой курортной зоны Оренбургской области. Москва, 1993.
- Петрищев В.П. Ландшафты соляных куполов: проблемы рационального использования природных ресурсов нуклеарных геосистем // Альманах молодой науки. 2015. № 4. С. 14–22.
- Петрищев В.П. Солянокупольные морфоструктуры Южного Приуралья // Геоморфология. 2010. № 1. С. 86–94.
- Плотников А.О. Механизмы формирования протозойно-бактериальных ассоциаций в водных экосистемах (экспериментальное исследование). Автореферат дис. ... канд. мед. наук. 26.09.2002. Оренбург: Оренбургская государственная медицинская академия, 2002. 24 с.
- Плотников А.О., Мыльников А.П., Селиванова Е.А. Морфология и жизненный цикл амебофлагелляты *Pharyngomonas* sp. (*Heterolobosea*, *Excavata*) из гипергалинного континентального озера Развал // Зоологический журнал. 2015. Т. 94. № 3. С. 275–286.
- Плотников А.О., Селиванова Е.А., Немцева Н.В. Видовой состав гетеротрофных жгутиконосцев соленых Соль-Илецких озер // Изв. Пензенского гос. пед. ун-та им. В.Г. Белинского. 2011. № 25. С. 577–586.
- Селиванова Е.А. Симбиотические связи микроорганизмов в планктонных сообществах соленых водоемов. Автореферат дис. ... канд. мед. наук. 27.09.2007. Оренбург: Оренбургская государственная медицинская академия, 2007. 24 с.
- Селиванова Е.А., Немцева Н.В. Экспериментальное взаимодействие галофильных прокариот и условно патогенных бактерий в рапе // Журн. микробиол., эпидемиол. иммунобиол. 2013. № 5. С. 86–91.
- Соловченко А.Е., Селиванова Е.А., Чеканов К.А., Сидоров Р.А., Немцева Н.В., Лобакова Е.С. Индукция вторичного каротиногенеза у новых галофильных микроводорослей из рода *Dunaliella* (Chlorophyceae) // Биохимия. 2015. Т. 80. № 11. С. 1724–1730.
- Solovchenko A.E., Chekanov K.A., Lobakova E.S., Sidorov R.A., Selivanova E.A., Nemtseva N.V. Induction of secondary carotenogenesis in new halophile microalgae from the genus *Dunaliella* (Chlorophyceae) // Biochemistry (Moscow). 2015. V. 80. P. 1508–1513.
- Шабанов С.В. Биологическая роль антилизозимной активности у водорослей. Автореферат дис. ... канд. биол. наук. 26.06.2001. Оренбург: Оренбургская государственная медицинская академия, 2001. 24 с.
- Anton J., Oren A., Benlloch S., Rodriguez-Valera F., Amann R., Rossello-Mora R. *Salinibacter ruber* gen. nov., sp. nov., a novel, extremely halophilic member of the *Bacteria* from saltern crystallizer ponds // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2002. V. 52. P. 485–491.
- Baati H., Guerrazi S., Gharsallah N., Sghir A., Ammar E. Novel prokaryotic diversity in sediments of Tunisian multipond solar saltern // Res. Microbiol. 2010. V. 161. P. 573–582.
- DeMaere M.Z., Williams T.J., Allen M.A., Brown M.V., Gibson J.A., Rich J., Lauro F.M., Dyll-Smith M., Davenport K.W., Woyke T., Kyrpides N.C., Tringe S.G., Cavicchioli R. High level of intergenera gene exchange shapes the evolution of haloarchaea in an isolated Antarctic lake // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2013. V. 110. P. 16939–16944.
- Dillon J.G., Carlin M., Gutierrez A., Nguyen V., McLain N. Patterns of microbial diversity along a salinity gradient in the Guerrero Negro solar saltern, Baja CA Sur, Mexico // Front. Microbiol. 2013. V. 4. 399 eCollection 2013. doi 10.3389/fmicb.2013.00399
- Edgar R.C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST // Bioinformatics. 2010. V. 26. P. 2460–2461.

- Edgar R.C. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads // *Nature Methods*. 2013. V. 10. P. 996–998.
- Fernández A.B., León M.J., Vera B., Sánchez-Porro C., Ventosa A. Metagenomic sequence of prokaryotic microbiota from an intermediate-salinity pond of a saltern in Isla Cristina, Spain // *Genome Announc.* 2014. V. 2. № 1. pii: e00045-14. doi 10.1128/genomeA.00045-14
- Ghai R., Pasic L., Fernandez A.B., Martin-Cuadrado A.B., Mizuno C.M., McMahon K.D., Papke R.T., Stepanauskas R., Rodriguez-Brito B., Rohwer F., Sanchez-Porro C., Ventosa A., Rodriguez-Valera F. New abundant microbial groups in aquatic hypersaline environments // *Sci. Rep.* 2011. 1:135. doi 10.1038/srep00135
- Hammer O., Harper D.A.T., Ryan P.D. PAST: Paleontological Statistic software package for education and data analysis // *Paleontologia Electronica*. 2001. V. 4. № 1. P. 1–9. http://palaeelectronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm [Accessed: 04/X/2011].
- Harding T., Brown M.W., Plotnikov A., Selivanova E., Park J.S., Gunderson J.H., Baumgartner M., Silberman J.D., Roger A.J., Simpson A.G. Amoeba stages in the deepest branching heteroloboseans, including *Pharyngomonas*: Evolutionary and systematic implications // *Protist*. 2013. V. 164. P. 272–286.
- Huse S.M., Mark Welch D.B., Voorhis A., Shipunova A., Morrison H.G., Eren A.M., Sogin M.L. VAMPS: a website for visualization and analysis of microbial population structures // *BMC Bioinform.* 2014. V. 41. doi 10.1186/1471-2105-15-41
- Jang G.I., Cho Y., Cho B.C. *Pontimonas salivibrio* gen. nov., sp. nov., a new member of the family *Microbacteriaceae* isolated from a seawater reservoir of a solar saltern // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2013. V. 63. P. 2124–2131.
- Jookar Kashi F., Owlia P., Amoozegar M.A., Yakhchali B. Culturable prokaryotic diversity of Urmia salt lake // *Modern Genetics J.* 2014. V. 9. № 3 (38). P. 313–328.
- Klindworth A., Pruesse E., Schweer T., Peplies J., Quast C., Horn M., Glöckner F.O. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies // *Nucleic Acids Res.* 2013. V. 41. № 1. e1. doi 10.1093/nar/gks808
- Legault B.A., Lopez-Lopez A., Alba-Casado J.C., Doolittle W.F., Bolhuis H., Rodriguez-Valera F., Papke R.T. Environmental genomics of “*Haloquadratum walsbyi*” in a saltern crystallizer indicates a large pool of accessory genes in an otherwise coherent species // *BMC Genomics*. 2006. V. 7. № 171. doi 10.1186/1471-2164-7-171
- Leon M.J., Fernandez A.B., Ghai R., Sanchez-Porro C., Rodriguez-Valera F., Ventosa A. From metagenomics to pure culture: isolation and characterization of the moderately halophilic bacterium *Spiribacter salinus* gen. nov., sp. nov. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2014. V. 80. P. 3850–3857.
- León M.J., Vera-Gargallo B., Sanchez-Porro C., Ventosa A. *Spiribacter roseus* sp. nov., a moderately halophilic species of the genus *Spiribacter* from salterns // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2016. V. 66. P. 4218–4224.
- Llirós M., Trias R., Borrego C., Bañeras L. Specific archaeal communities are selected on the root surfaces of *Ruppia* spp. and *Phragmites australis* // *Society of Wetland Scientists*. 2013. doi 10.1007/s13157-013-0507-9
- Naghoni A., Emtiazi G., Amoozegar M.A., Cretoiu M.S., Sta L.J., Etemadifar Z., Fazeli S.A.S., Bolhuis H. Microbial diversity in the hypersaline Lake Meyghan, Iran // *Sci. Rep.* 2017. 7: 11522. doi 10.1038/s41598-017-11585-3
- Nelson W.C., Stegen J.C. The reduced genomes of *Parcubacteria* (OD1) contain signatures of a symbiotic lifestyle // *Front. Microbiol.* 2015. V. 6. 713. eCollection 2015. doi 10.3389/fmicb.2015.00713
- Oliveros J.C. Venny. An interactive tool for comparing lists with Venn’s diagrams. 2015. <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>.
- Oren A. Taxonomy of halophilic *Archaea*: current status and future challenges // *Extremophiles*. 2014. V. 18. P. 825–834.
- Pagaling E., Wang H., Venables M., Wallace A., Grant W.D., Cowan D.A., Jones B.E., Ma Y., Ventosa A., Heaphy S. Microbial biogeography of six salt lakes in Inner Mongolia, China, and a salt lake in Argentina // *Appl. Environ. Microbiol.* 2009. V. 75. P. 5750–5760.
- Humayoun S.B., Bano Nasreen, Hollibaugh J.T. Depth distribution of microbial diversity in Mono Lake, a meromictic soda lake in California // *Appl. Environ. Microbiol.* 2003. V. 69. P. 1030–1042.
- Sorensen K.B., Teske A. Stratified communities of active *Archaea* in deep marine subsurface sediments // *Appl. Environ. Microbiol.* 2006. V. 72. P. 4596–4603.
- Suda S., Watanabe M.M., Otsuka S., Mahakahant A., Yongmanitchai W., Nopartnaraporn N., Liu Y., Day J.G. Taxonomic revision of water-bloom-forming species of oscillatorioid cyanobacteria // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2002. V. 52. P. 1577–1595.
- Tazi L., Breakwell D.P., Harker A.R., Crandall K.A. Life in extreme environments: microbial diversity in Great Salt Lake, Utah // *Extremophiles*. 2014. V. 18. P. 525–535.
- Teske A., Sorensen K.B. Uncultured archaea in deep marine subsurface sediments: have we caught them all? // *ISME J.* 2008. V. 2. P. 3–18.
- Trigui H., Masmoudi S., Brochier-Armanet C., Barani A., Gregori G., Denis M., Dukan S., Maalej S. Characterization of heterotrophic prokaryote subgroups in the Sfax coastal solar salterns by combining flow cytometry cell sorting and phylogenetic analysis // *Extremophiles*. 2011. V. 15. P. 347–358.
- Zhang J., Kobert K., Flouri T., Stamatakis A. PEAR: a fast and accurate Illumina Paired-End reAd merger // *Bioinformatics*. 2014. V. 30. P. 614–620.
- Zhang R., Wu Q., Piceno Y.M., Desantis T.Z., Saunders F.M., Andersen G.L., Liu W.T. Diversity of bacterioplankton in contrasting Tibetan lakes revealed by high-density microarray and clone library analysis // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2013. V. 86. P. 277–287.

Diversity of Prokaryotes in Planktonic Communities of Saline Sol-Iletsk Lakes (Orenburg Oblast, Russia)

E. A. Selivanova^{1,*}, D. V. Poshvina¹, Yu. A. Khlopko¹, N. E. Gogoleva^{2,3}, and A. O. Plotnikov¹

¹*Institute for Cellular and Intracellular Symbiosis, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Orenburg, Russia*

²*Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Russian Academy of Sciences, Kazan, Russia*

³*Kazan Federal University, Kazan, Russia*

*e-mail: selivanova-81@mail.ru

Received December 11, 2017

Abstract—Prokaryotic diversity was studied in the planktonic communities of six Sol-Iletsk lakes (Orenburg oblast, Russia) varying in salinity level using the Illumina technology of high-throughput sequencing. The extremely halophilic archaea of the phyla *Euryarchaeota* and *Nanohaloarchaeota*, as well as the bacterial phylum *Bacteroidetes* predominated in the communities of lakes with salinity of 285–300%. Representatives of the phyla *Bacteroidetes* and *Actinobacteria*, as well as of the class *Gammaproteobacteria* were predominant in the lakes with salinity 110–180%. A bloom of *Cyanobacteria* was observed in Bolshoe Gorodskoe Lake (10% salinity). The dominant OTUs in the lakes with high salinity were represented by archaea *Halonotius* sp., uncultured *Nanohaloarchaea*, and bacteria *Salinibacter* sp. In the lakes with medium salinity level the dominants included gammaproteobacteria *Spiribacter* sp., alphaproteobacteria *Roseovarius* sp., flavobacteria *Psychroflexus* sp., unidentified archaea of the family *Haloferaceae*, actinobacteria *Pontimonas* sp. and *Rhodoluna* sp. In the lake with low salinity level cyanobacteria of the genus *Planktothrix* were predominant. Effect of salinity on prokaryotic taxonomic richness, composition, and diversity in planktonic communities of the studied lakes was demonstrated.

Keywords: saline lakes, biodiversity, prokaryotes, halophilic bacteria, archaea, planktonic communities, high-throughput sequencing, Illumina, 16S rRNA gene

РАЗНООБРАЗИЕ ЦИАНОБАКТЕРИЙ В ЩЕЛОЧНОМ ОЗЕРЕ ХИЛГАНТА В ЗАСУШЛИВЫЙ И ВЛАЖНЫЙ ПЕРИОД

© 2018 г. З. Б. Намсараев^{a, *}, Т. В. Колганова^b, Е. О. Патутина^b,
Д. Д. Цыренова^c, О. С. Самылина^d

^aНациональный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия

^bФедеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук,
Институт биоинженерии, Москва, Россия

^cИнститут общей и экспериментальной биологии СО РАН, Улан-Удэ, Россия

^dФедеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук,
Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, Москва, Россия

*e-mail: zorigto@gmail.com

Поступила в редакцию 15.03.2018 г.

С использованием клоновых библиотек и морфологического анализа было изучено разнообразие цианобактерий в цианобактериальном мате и сухой корке на дне мелководного соленого щелочного озера Хилганта, расположенного в Южной Сибири. Исследование показало, что в засушливый период (2006 г.) в сообществе доминировали представители рода *Phormidium*, а во влажный период (1995 и 2012 гг.) нитчатые цианобактерии *Coleofasciculus chthonoplastes*. Состав сообщества во влажный и сухой период значительно отличался друг от друга. Всего в озере выявлено 11 операционных таксономических единиц цианобактерий, из них только 3 обнаружены и во влажный и в сухой период. Присутствие космополитной цианобактерии *C. chthonoplastes*, характерной для нейтральных соленых водоемов, нетипично для щелочного внутриконтинентального озера и может быть объяснено сходством состава доминирующих ионов в воде озера, и в морской воде.

Ключевые слова: цианобактерии, соленые озера, щелочные озера, цианобактериальный мат, *Coleofasciculus chthonoplastes*

DOI: 10.1134/S0026365618040134

Цианобактериальные маты — многослойные органоминеральные образования с доминированием цианобактерий, которые преимущественно формируются в экстремальных условиях, таких как соленые и содовые озера, гидротермы и т.д. Цианобактериальные маты содовых озер рассматриваются в качестве современных аналогов строматолитобразующих сообществ, доминировавших на поверхности Земли в течение Протерозоя (2500–541 млн лет назад) (Заварзин, 1993). Формирование содовых озер происходит в результате углекислотного выветривания силикатных пород, в ходе которого происходит накопление бикарбонатных вод в бессточных областях. Экстраполяция этого механизма на докембрийские условия позволила Г.А. Заварзину предположить широкое распространение во внутриконтинентальных областях Земли обширных мелководных водоемов содового типа и их основополагающую роль в формировании наземной биоты (гипотеза “содового континента”). В пользу этой теории свидетельствуют данные о значительно более тяжелом изотопном составе азота ($\delta^{15}\text{N}$) озерных пород формации

Тумбиана (2.72 млрд лет назад) по сравнению с архейскими морскими осадочными породами, предположительно вызванными диссоциацией аммония в щелочных анаэробных условиях. Также предполагают, что континентальные содовые озера могли быть широко распространены в позднем Архее (Stüeken et al., 2015).

Модельным объектом для изучения возможных механизмов выветривания силикатов и формирования строматолитов в эпиконтинентальных водоемах докембрия стало озеро Хилганта, расположенное в Южной Сибири (Заварзин, 1993; Алексеева и соавт., 2009). В зависимости от климатических условий озеро имеет минерализацию от 40 до 260 г/л и рН от 7.1 до 9.9, при этом на дне озера развивается цианобактериальный мат толщиной до 2–3 см (Намсараев и соавт., 2010). Исследования фототрофного сообщества озера показали, что в составе цианобактериального мата одним из доминирующих морфотипов цианобактерий является *Coleofasciculus chthonoplastes* (Герасименко и соавт., 2003). При этом среди культивируемых представителей сообщества присутствуют цианобакте-

рии, принадлежащие к группам *Geitlerinema*, *Nodularia*, *Phormidium* (Цыренова и соавт., 2011), а среди культивируемых представителей аноксигенных фототрофных бактерий – представители родов *Ectothiorhodospira*, *Allochromatium*, *Thiocapsa*, *Rhodovulum* (Компанцева и соавт., 2005).

Coleofasciculus chthonoplastes – это новое название широко известного вида матобразующих цианобактерий *Microcoleus chthonoplastes* (Siegestmund et al., 2008). Этот вид обладает характерной морфологией (пучки из тесно переплетающихся трихомов, заключенные в общий чехол) и имеет космополитное распространение, будучи широко представлен в соленых и гиперсоленых, близких к нейтральным условиям, как правило, связанных с морскими местообитаниями (Oren, 2010). Таким образом, развитие *C. chthonoplastes* в составе фототрофного сообщества щелочного внутриконтинентального озера Хилганта является нетипичным и пока еще не получило объяснения. Кроме того, ситуацию усложняют отсутствие молекулярных данных о разнообразии цианобактерий в озере и противоречивые данные по идентификации штамма *Microcoleus (Coleofasciculus) chthonoplastes*, выделенного из озера Хилганта.

Целью работы было проведение комплексного исследования разнообразия цианобактерий в фототрофном сообществе озера Хилганта при смене климатических условий с использованием морфологического и молекулярного подходов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования. Озеро Хилганта (50°42.535' с.ш., 115°06.086' в.д.) расположено в степной зоне Юго-Восточного Забайкалья в 76 км южнее поселка Агинское. Озеро округлой формы, с пологими берегами, бессточное, вода озера по химическому составу принадлежит к хлоридно-сульфатному натриевому типу. Максимальная площадь водного зеркала озера в многоводный период достигает 0.3 км², наибольшая глубина водной толщи – 64 см. Непосредственно на месте отбора проб измеряли температуру, pH, концентрацию карбонатов титрованием и минерализацию воды рефрактометром. Данные о суммарных количествах годовых осадков, начиная с 2005 г., для поселка Агинское были получены из базы данных World Meteorological Organization, идентификатор метеостанции WMOID 30859 (<https://www.ncdc.noaa.gov/data-access/land-based-station-data/land-based-datasets>).

Анализ морфологического разнообразия цианобактерий. Для определения видового состава цианобактерий образцы фиксировали 4% формалином. При микроскопировании образцов сухой корки и цианобактериального мата кусочки образца растирали на предметном стекле, заливали 5% раствором соляной кислоты для удаления кар-

бонатов и затем рассматривали на оптическом микроскопе при увеличении ×400–1000. Морфологическую идентификацию цианобактерий проводили с использованием определителей (Голлербах и соавт., 1953; Komárek, Anagnostidis, 2005).

Анализ разнообразия генов 16S рРНК цианобактерий. Выделение ДНК из природных образцов проводили по методике Wilson et al. (1992) с СТАВ. Для проведения полимеразной цепной реакции использовали праймеры CYA106F и CYA781R (Nübel et al., 1997), специфичные для цианобактерий. Клонирование полученных ПЦР-продуктов проводили с использованием набора реактивов pGEM-T Easy system (Promega, США) согласно рекомендациям производителя. Секвенирование клональных вставок библиотеки клонов проводили по методу Sanger et al. (1977) с помощью набора реактивов Big Dye Terminator v. 3.1 (Applied Biosystems, Inc., США) на научном оборудовании ЦКП ФИЦ Биотехнологии РАН. При этом для секвенирования использовали универсальные плазмидные праймеры.

Полученные последовательности генов 16S рРНК цианобактерий анализировали на наличие химер с помощью программы DECIPHER (Wright et al., 2012). Анализ оставшихся последовательностей проводили с помощью пакета программ USEARCH (Edgar, 2010). На первом этапе анализируемые последовательности выравнивали с помощью алгоритма MUSCLE. Затем проводили кластерный анализ выровненных последовательностей на уровне сходства 97%. Для каждой полученной в результате кластеризации операционной таксономической единицы (ОТЕ) была выбрана репрезентативная нуклеотидная последовательность “центроид”, соответствующая “центру” кластера. Таксономическую классификацию репрезентативных последовательностей проводили путем сравнения с базой данных нуклеотидных последовательностей GenBank по протоколу BLAST. Затем из последующего анализа были исключены последовательности, встречающиеся только один раз (синглтоны) (Brown et al., 2015). Полученные последовательности были депонированы в GenBank под номерами MH211207–MH211220. Построение филогенетических деревьев производили с помощью алгоритма FastTree v2.1.10 методом приближенного максимального правдоподобия с оценкой расстояния методом Jukes-Cantor (Price et al., 2010). Значения местной поддержки вычислялись с помощью теста Шимодайра–Хасегава и 1000 репликаций. Визуализацию построенных деревьев проводили с помощью программы FigTree v. 4.3. (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

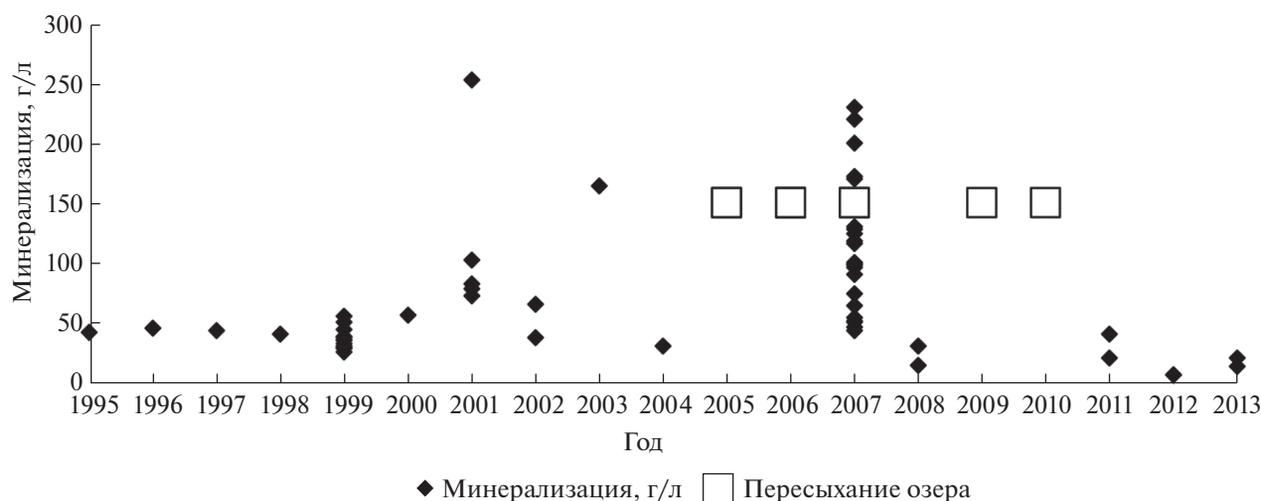


Рис. 1. Минерализация воды и эпизоды пересыхания озера Хилганта в период с 1995 по 2013 гг.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Гидрологический режим озера Хилганта. Исследования озера Хилганта проводились в засушливый и влажный периоды. В 2006 г. сумма осадков, измеренная на метеостанции поселка Агинское, составила 259 мм (рис. 1). Во время проведения исследований 21 июля 2006 г. озерная котловина была полностью высохшей, и на поверхности донных осадков находились корки цианобактериальных матов (рис. 2б). В 2012 г. сумма осадков составила 342 мм, при этом 30 июля 2012 г. в момент отбора проб озерная котловина была заполнена водой, и ее минерализация составляла 6.5 г/л (рН 9.5). На дне развивался слоистый цианобактериальный мат толщиной от 0.5 до 3 см (рис. 2а). И сухая корка, и цианобактериальный мат имели четко выраженные слои, в которых более темные слои с микроорганизмами чередовались с более светлыми слоями с высоким содержанием минеральных компонентов.

Морфологическое разнообразие цианобактерий. На основе морфологических параметров было изучено видовое разнообразие цианобактерий. В сухой корке 2006 года было выявлено 5 морфотипов: одноклеточная цианобактерия *Chroococcus minutus* и нитчатые цианобактерии *Leptolyngbya tenuis*, *Leptolyngbya woronichinii*, *Coleofasciculus chthonoplastes* и *Phormidium breve* (рис. 2). *Ph. breve* являлся доминирующим морфотипом. В цианобактериальном сообществе, изученном в 2012 г., доминировал *C. chthonoplastes*. Также были обнаружены морфотипы, идентифицированные как одноклеточная цианобактерия *Chroococcus minutus* и нитчатые цианобактерии *Oscillatoria* sp., *Lyngbya* sp. Послойный анализ сухой корки и цианобактериального мата показал, что максимальное разнообразие морфотипов цианобактерий наблюдается в самом верхнем слое образца, тогда

как в более глубоких слоях клетки цианобактерий деградируют, и увеличивается количество пустых чехлов нитчатых цианобактерий.

Молекулярное разнообразие цианобактерий. Из сухой корки, отобранной в 2006 г., была получена 91 нуклеотидная последовательность, не содержащая химер и принадлежащая цианобактериям. В результате проведенного кластерного анализа было получено 13 ОТЕ, из них 6 ОТЕ было представлено в клоновой библиотеке только одной последовательностью (синглтоны). Эти 6 ОТЕ были удалены из анализа. Наиболее представленной (41 последовательность) была ОТЕ с репрезентативной нуклеотидной последовательностью “Dry mat, clone F07”, наиболее близкой по результатам анализа BLAST (более 97% сходства) к представителям вида *Phormidium etoshii* и космополитного вида *Phormidium autumnale* (рис. 3). На втором месте (21 последовательность) была ОТЕ с репрезентативной последовательностью “Dry mat, clone G07”, по результатам анализа имеющая сходство более 97% с нуклеотидными последовательностями, принадлежащими представителям родов *Geitlerinema*, *Leptolyngbya*, *Oscillatoria* и *Phormidium*, а также штамму *Microcoleus* sp. IPPAS B-353 (номер GenBank KU375124), выделенному ранее из озера Хилганта (Kupriyanova et al., 2016). Оставшиеся 5 ОТЕ, включавшие в себя более чем 1 (от 2 до 6) нуклеотидную последовательность, были близкородственными представителями родов гетероцистных цианобактерий *Nodularia* и *Anabaena* (последовательность Dry mat, clone G02), родов нитчатых цианобактерий *Lyngbya* и *Planktothrix* (Dry mat, clone G01), *Leptolyngbya* и *Nodosilinea* (Dry mat, clone G09), одноклеточных цианобактерий родов *Aphanothece*, *Synechococcus*, *Cyanobacterium* (Dry mat, clone H09). ОТЕ с репрезентативной последовательностью “Dry mat,

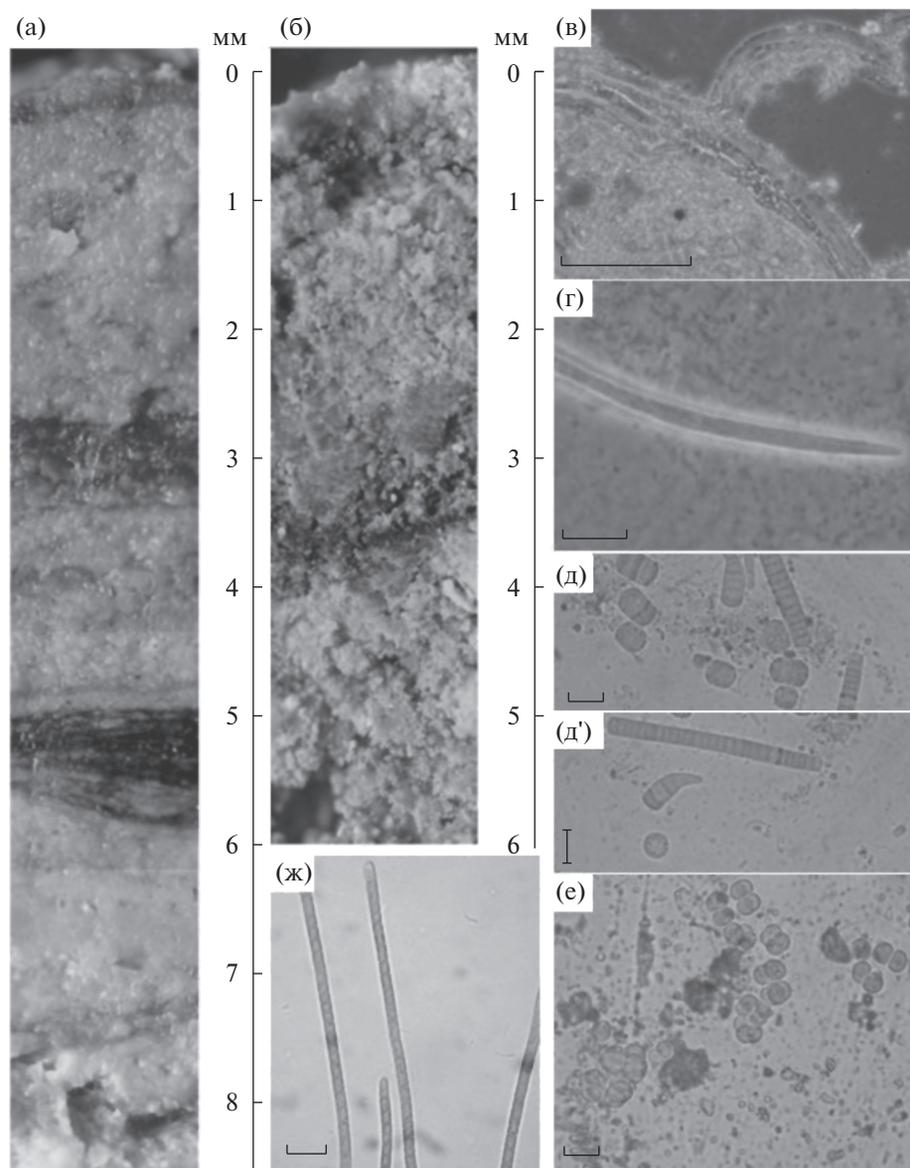


Рис. 2. Цианобактериальный мат из озера Хилганта и разнообразие цианобактерий в нем: (а) структура мата во влажный период 2012 г.; (б) структура сухой корки в засушливый период 2006 г.; (в, г) *Coleofasciculus chthonoplastes* в 2012 г.; (д, д') *Phormidium breve* в 2006 г.; (е) *Chroococcus minutus* в 2006 г.; (ж) *Microcoleus* sp. IPPAS B-353. Масштабная метка – 10 мкм.

clone A09” не имела близкородственных культивируемых представителей.

Из цианобактериального мата, отобранного в 2012 г., было получено 89 нуклеотидных последовательностей, не содержащих химер и принадлежащих цианобактериям. В результате проведенного кластерного анализа было получено 8 ОТЕ, из которых 1 ОТЕ, представленная только одной последовательностью, была удалена из анализа. Наиболее представленной (38 последовательностей) была ОТЕ с репрезентативной нуклеотидной последовательностью “Wet mat, clone H01” по результатам анализа BLAST наиболее близкой

к представителям вида *C. chthonoplastes*. Второй по представленности (26 последовательностей) была ОТЕ, имеющая сходство выше 97% с нитчатыми цианобактериями родов *Leptolyngbya* и *Nodosilinea* (последовательность “Wet mat, clone H05”). Остальные 5 ОТЕ, включавшие в себя от 2 до 12 последовательностей, были близки представителям нитчатых цианобактерий родов *Leptolyngbya* и *Nodosilinea* (Wet mat, clone A01), *Leptolyngbya* (Wet mat, clone F09), *Phormidium* и *Oscillatoria* (Wet mat, clone C11), гетероцистных цианобактерий *Nodularia* и *Anabaena* (Wet mat, clone E07). ОТЕ с репрезентативной последовательностью

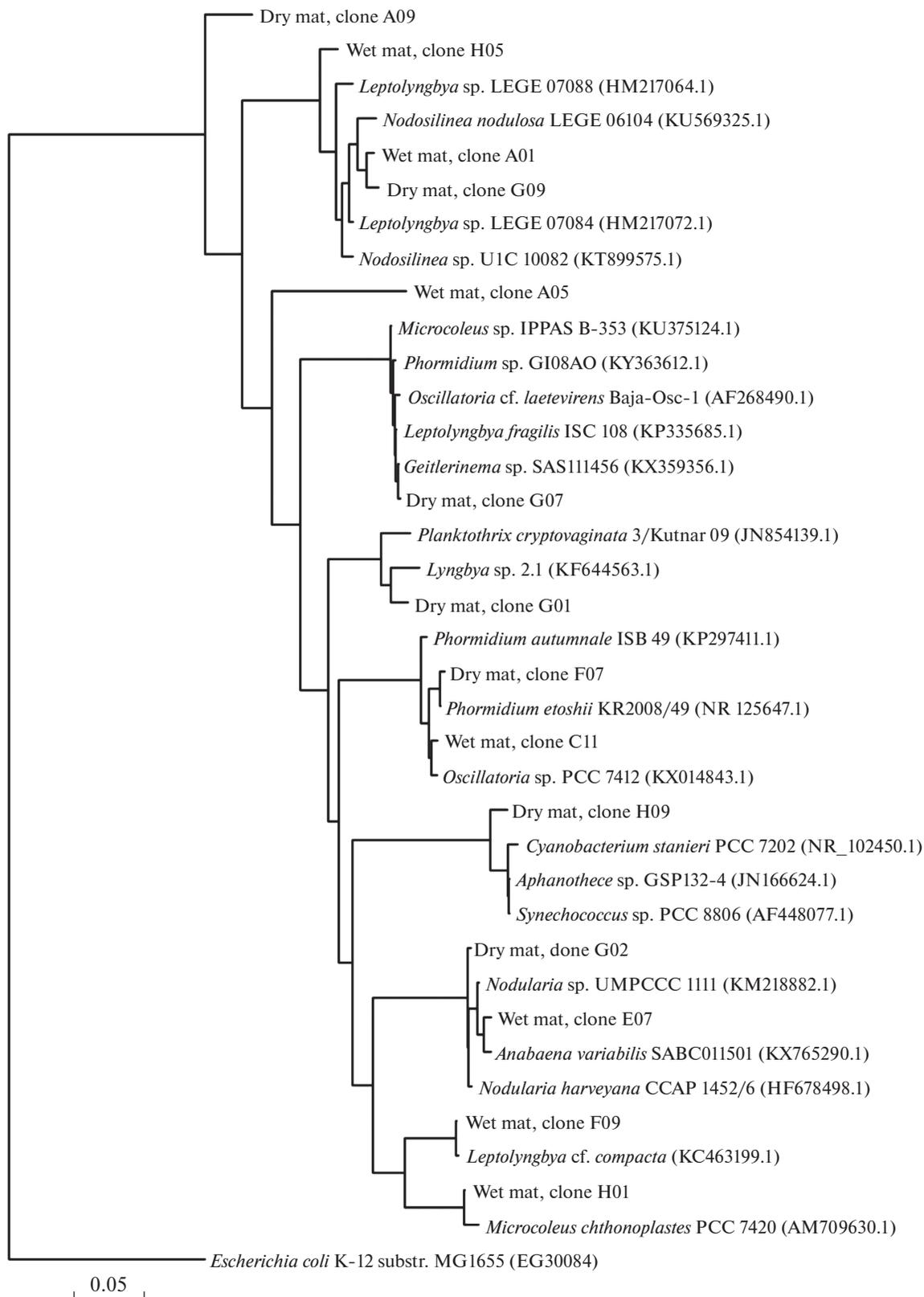


Рис. 3. Филогенетическое дерево репрезентативных нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК цианобактериальных ОТЕ из озера Хилганта и их гомологичных последовательностей с уровнем сходства более 97%. “Dry mat, clone XXX” – нуклеотидные последовательности из сухой корки 2006 г., “Wet mat, clone XXX” – нуклеотидные последовательности из цианобактериального мата 2012 г. Филогенетическое дерево построено методом приближительного максимального правдоподобия.

стью “Wet mat, clone A05” не имела близкородственных культивируемых представителей.

Сравнение ОТЕ, обнаруженных в образцах 2006 и 2012 гг., показывает, что разнообразие цианобактерий в озере Хилганта относительно невелико. В засушливый и влажный периоды было обнаружено по 7 ОТЕ цианобактерий, при этом только 3 ОТЕ встречались в оба периода. Это ОТЕ, включающая в себя последовательности “Dry mat, clone G02” и “Wet mat, clone E07” и близкая к представителям гетероцистных цианобактерий родов *Nodularia* и *Anabaena*, а также 2 ОТЕ нитчатых цианобактерий, близкородственных представителям *Leptolyngbya* и *Nodosilinea* (последовательности “Dry mat, clone G09” и “Wet mat, clone A01”) и представителям рода *Phormidium* (последовательности “Dry mat, clone F07” и “Wet mat, clone C11”). Таким образом, общее количество уникальных ОТЕ, обнаруженных в ходе исследования озера Хилганта, составляет 11 единиц. Все изученные ОТЕ имеют космополитное распространение, их представители обнаружены в широком географическом диапазоне.

ОБСУЖДЕНИЕ

Микробные сообщества в соленом щелочном озере Хилганта развиваются в виде слоистых матов с доминированием нитчатых цианобактерий. Морфологическое и молекулярно-биологическое изучение разнообразия цианобактерий выявило, что в засушливые и во влажные периоды состав цианобактерий различен. Так, в сухой период (2006 г.) доминировала нитчатая цианобактерия, морфологически отнесенная к виду *Phormidium breve*. Это согласуется с данными молекулярно-биологического анализа, показавшими преобладание в образце сухой корки последовательности “Dry mat, clone F07”, близкой к последовательности гена 16S рДНК вида *Phormidium etoshii* KR2008/49 (NR_125647.1). *Ph. breve* из озера Хилганта (рис. 2д) морфологически и экологически соответствует *Ph. etoshii*, описанному в соленощелочных местообитаниях солончака Этоша-Пан в Намибии (Dadheech et al., 2013).

Во влажный период 2012 г., согласно как морфологическим, так и молекулярно-биологическим данным, доминирующим видом цианобактерий был *C. chthonoplastes* “Wet mat, clone H01”. В образце сухой корки, отобранной в 2006 г., с помощью микроскопии обнаруживались отдельные нити *C. chthonoplastes*, но в составе клоновой библиотеки его нуклеотидные последовательности не были обнаружены.

Учитывая более ранние противоречивые сведения о присутствии *C. chthonoplastes* в озере Хилганта,

мы провели ретроспективный анализ данных, полученных при изучении образцов, отобранных в этом озере летом 1995 г. Герасименко и соавт. (2003) эти образцы были послойно изучены на трансмиссионном электронном микроскопе. Было показано, что доминирующими в различных слоях мата цианобактериями были нитчатые негетероцистные формы, идентифицированные как *Phormidium molle* и *Microcoleus chthonoplastes* (*C. chthonoplastes*) (Голлербах и соавт., 1953). Ультраструктурные особенности срезов клеток цианобактерий, приведенных в публикации Л.М. Герасименко и соавт. (2003), позволяют говорить о правильной таксономической идентификации *C. chthonoplastes*. Таксономически значимыми признаками, характерными для этого вида, были пучки параллельных трихомов, объединенные общим слизистым чехлом, и радиальное расположение тилакоидов в клетках (Герасименко и соавт., 2003).

Из этого мата Л.М. Герасименко был выделен штамм Z-9627, идентифицированный как *Microcoleus chthonoplastes* и ставший модельным для изучения компонентов CO₂-концентрирующего механизма у галоалкалофильных цианобактерий (Куприянова и соавт., 2004; Куприянова, Самылина, 2015; Kupriyanova et al., 2011, 2016) и моделирования трансформаций различных минералов в щелочных условиях (Алексеева и соавт., 2009; Заварзин и соавт., 2003; Зайцева и соавт., 2007). Штамм депонирован в две коллекции: коллекцию микроводорослей Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН (*Microcoleus* sp. IPPAS B-353) и коллекцию культур автотрофных организмов Института Ботаники Чешской Республики (*Microcoleus chthonoplastes* CCALA 1011). В результате исследований, связанных с получением снимков на трансмиссионном электронном микроскопе (Kupriyanova et al., 2011), выяснилось, что ультраструктурные особенности этого штамма не соответствуют таковым на снимках интактных матов из озера Хилганта, опубликованных Л.М. Герасименко и соавт. (2003). В частности, для клеток штамма B-353 характерно париетальное расположение тилакоидов, что у цианобактерий является таксономически значимым и не зависит от фазы роста или условий культивирования. Анализ нуклеотидной последовательности гена 16S рНК этого штамма позволяет отнести его к филогенетической группе *Geitlerinema*, группа IV (по Perkerson et al., 2010) или “морским *Geitlerinema*” (по Strunecký et al., 2017). Последовательности, входящие в эту филогенетическую группу, образуют тесный кластер и впоследствии могут быть описаны в качестве нового



Рис. 4. Карта, показывающая распространение нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК с уровнем сходства не менее 97% с нуклеотидной последовательностью типового штамма вида *C. chthonoplastes* SAG 2209 (NR_125521.1). 1 – озеро Хилганта. Для построения карты использовались данные о географическом расположении последовательностей: AV784075, AF210048, AM709630.1, AY500274.1, DQ058853, EF160050.1, EF654025.1–EF654089.1, EU251080.1, FN678385.1, GQ402017.1, GQ441199.1, GU213185.1, HG938320.1, HM628456.1, HQ343413.1, JN166563.1, JN427152.1, JX002103.1, KJ998017.1, KT037024.1, NR_125521.1, X70770.1.

таксона родового уровня. Нуклеотидные последовательности этого кластера также были обнаружены в образце, отобранном в озере Хилганта в 2006 г. с репрезентативной последовательностью “Dry mat, clone G07”, где были вторыми по представленности и принадлежали, таким образом, субдоминантному морфотипу цианобактерий.

Таким образом, данные, полученные при изучении озера Хилганта, показывают, что во влажные периоды (1995 и 2012 гг.) *C. chthonoplastes* является одним из доминантов в озере, тогда как в засушливый период (2006 г.) *C. chthonoplastes* не является преобладающим в составе сообщества.

Анализ биогеографического распространения 4.7 тыс. нуклеотидных последовательностей, имеющих сходство более 97% с нуклеотидной последовательностью типового штамма вида *C. chthonoplastes* SAG 2209 (NR_125521.1), показал, что представители этого вида в основном распространены в местообитаниях, находящихся в прибрежных зонах морей и океанов, засоленных почвах, солеварнях и соленых озерах (рис. 4). Это не противоречит более ранним выводам о его космополитном распространении и приуроченности к галофильным околонейтральным местообитаниям,

сделанным на основании морфологического и молекулярного анализа (Garcia-Pichel et al., 1996; Oren, 2010). Тем не менее, периодическое доминирование *C. chthonoplastes* в щелочном внутриконтинентальном озере, расположенном на расстоянии не менее чем 1200 км до ближайшего моря, требует дополнительного обсуждения. При этом обращает на себя внимание тот факт, что *C. chthonoplastes* доминирует в составе цианобактериального сообщества во влажный период, когда рН воды озера находится в диапазоне 9.5–9.9.

Гидрохимические данные о воде озера, полученные З.Б. Намсараевым и соавт. (2010), показывают, что по своему химическому составу озеро Хилганта близко к морским и значительно отличается от классических содовых озерах, в которых доля карбонатов превышает 30% от суммы анионов (Namsaraev et al., 2015). Во влажный период вода озера, так же как и морская вода, принадлежит к хлоридно-сульфатному натриевого типу. При этом содержание карбонатов в воде озера не превышает 3.5% от суммы ионов. Тем не менее, во влажный период вода озера является щелочной со стабильно высоким значением рН. Этот факт может быть объ-

яснен соотношением концентраций ионов карбонатов и кальция согласно соотношению Харди—Эгстера: $2m\text{Ca}^{2+} = m\text{HCO}_3^- + 2m\text{CO}_3^{2-}$ (Hardie, Eugster, 1970). Во влажный период содержание карбонатов в воде озера превышает содержание кальция, что приводит к высоким значениям рН. Тем не менее, доля карбонатов относительно хлорида натрия и сульфатов очень мала и, вероятно, не оказывает значительного влияния на *C. chthonoplastes*, позволяя ему существовать в озере Хилганта. Необходимо отметить, что этот вид цианобактерий пока еще не был обнаружен в классических содовых озерах с высоким содержанием карбонатов. При этом в классических содовых озерах распространены “морские *Geitlerinema*” (Самылина и соавт., 2015), к которым относятся *Microcoleus* sp. IPPAS B-353, и представители ОТЕ с репрезентативной последовательностью “Dyumat, clone G07” из озера Хилганта.

Полученные данные о составе цианобактериального сообщества озера Хилганта позволяют предположить два возможных сценария развития сообщества озера в зависимости от погодно-климатических условий Юго-Восточного Забайкалья. Учитывая, что в данном регионе около 70% осадков выпадает в летний период, существует зависимость между годовой суммой осадков и уровнем воды в котловине озера в летний период. При относительно высокой увлажненности территории (как, например, в 2012 г. — 342 мм) озерная котловина заполняется водой, и устанавливается невысокая минерализация воды озера (6.5–55 г/л) с рН в диапазоне 9.5–9.9. Нитчатые цианобактерии *C. chthonoplastes* являются одними из доминантов в сообществе в такие периоды. При относительно низкой увлажненности территории (259 мм в 2006 г., 152 мм в 2007 г.) котловина озера заполняется только во время кратковременных дождей, после которых вода быстро испаряется, и дно озера покрывает сухая корка, и тогда в составе цианобактериального сообщества доминируют представители нитчатых цианобактерий родов *Phormidium* и “морские *Geitlerinema*”, при этом *C. chthonoplastes* не являются преобладающими, как в годы с высокой увлажненностью.

Таким образом, можно сделать предположение, что формирование толстого многослойного цианобактериального мата в озере Хилганта, привлекавшего внимание исследователей, связано с особенностями химического состава воды озера, близкого к морскому, что позволяет нитчатой цианобактерии *C. chthonoplastes* формировать цианобактериальный мат на дне озера.

Статья посвящена памяти проф. Б.Б. Намсараева, д.б.н. Л.М. Герасименко, к.б.н. Б.Б. Кузнецова и Б.К. Бумажкина, принимавших участие в исследовании разнообразия цианобактерий в озере Хилганта.

Работа выполнена в рамках темы Госзадания № АААА-А17-117011810034-9 и Тематического плана НИОКР НИЦ “Курчатовский институт”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Алексеева Т.В., Сапова Е.В., Герасименко Л.М., Алексеев А.О.* Преобразование глинистых минералов под воздействием алкалофильного циано-бактериального сообщества // *Микробиология*. 2009. Т. 78. С. 816–825.
- Alekseeva T.V., Alekseev A.O., Sapova E.V., Gerasimenko L.M.* Transformation of clay minerals caused by an alkaliphilic cyanobacterial community // *Microbiology (Moscow)*. 2009. V. 78. P. 776–784.
- Герасименко Л.М., Митюшина Л.Л., Намсараев Б.Б.* Маты *Microcoleus* из алкалофильных и галофильных сообществ // *Микробиология*. 2003. Т. 72. С. 84–92.
- Gerasimenko L.M., Mityushina L.L., Namsaraev B.B.* *Microcoleus* mats from alkaliphilic and halophilic communities // *Microbiology (Moscow)*. 2003. V. 72. P. 71–79.
- Голлербах М.М., Косинская Е.К., Полянский В.И.* Синезеленые водоросли. Определитель пресноводных водорослей СССР, вып. 2. М.: Гос. изд-во “Советская наука”, 1953. 651 с.
- Заварзин Г.А.* Эпиконтинентальные содовые водоемы как предполагаемые реликтовые биотопы формирования наземной биоты // *Микробиология*. 1993. Т. 62. С. 789–800.
- Zavarzin G.A.* Epicontinental soda lakes as probable relict biotopes of terrestrial biota formation // *Microbiology (Moscow)*. 1993. V. 62. P. 473–479.
- Заварзин Г.А., Орлеанский В.К., Герасименко Л.М., Пушко С.Н., Ушатинская Г.Т.* Лабораторные модели цианобактериальных матов щелочного геохимического барьера // *Микробиология*. 2003. Т. 72. С. 93–98.
- Zavarzin G.A., Orleanskii V.K., Gerasimenko L.M., Pushko S.N., Ushatinskaya G.T.* Laboratory simulations of cyanobacterial mats of the alkaline geochemical barrier // *Microbiology (Moscow)*. 2003. V. 72. P. 80–85.
- Зайцева Л.В., Орлеанский В.К., Алексеев А.О., Ушатинская Г.Т., Герасименко Л.М.* Трансформация карбонатных минералов в цианобактериальном мате при лабораторном моделировании // *Микробиология*. 2007. Т. 76. С. 390–404.
- Zaitseva L.V., Orleanskii V.K., Gerasimenko L.M., Alekseev A.O., Ushatinskaya G.T.* Transformation of carbonate minerals in a cyano-bacterial mat in the course of laboratory modeling // *Microbiology (Moscow)*. 2007. V. 76. P. 342–356.
- Компанцева Е.И., Сорокин Д.Ю., Горленко В.М., Намсараев Б.Б.* Фототрофное сообщество соленого щелочного озера Хилганта (Юго-Восточное Забайкалье) // *Микробиология*. 2005. Т. 74. С. 410–419.

- Kompantseva E.I., Sorokin D.Yu., Gorlenko V.M., Namsaraev B.B.* The phototrophic community found in Lake Khilganta (an alkaline saline lake located in the southeastern Transbaikal Region) // *Microbiology (Moscow)*. 2005. T. 74. С. 352–361.
- Куприянова Е.В., Маркелова А.Г., Лебедева Н.В., Герасименко Л.М., Заварзин Г.А., Пронина Н.А.* Карбоангидраза алкалофильной цианобактерии *Microcoleus chthonoplastes* // *Микробиология*. 2004. Т. 73. С. 307–311.
- Kupriyanova E.V., Markelova A.G., Lebedeva N.V., Gerasimenko L.M., Zavarzin G.A., Pronina N.A.* Carbonic anhydrase of the alkaliphilic cyanobacterium *Microcoleus chthonoplastes* // *Microbiology (Moscow)*. 2004. V. 73. P. 255–259.
- Куприянова Е.В., Самылина О.С.* CO₂-концентрирующий механизм и его особенности у галоалкалофильных цианобактерий // *Микробиология*. 2015. Т. 84. С. 144–159.
- Kupriyanova E.V., Samylina O.S.* CO₂-concentrating mechanism and its traits in haloalkaliphilic cyanobacteria // *Microbiology (Moscow)*. 2015. V. 84. P. 112–124.
- Намсараев З.Б., Горленко В.М., Бурюхаев С.П., Бархутова Д.Д., Дамбаев В.Б., Дулов Л.Е., Сорокин В.В., Намсараев Б.Б.* Водный режим и изменение гидрохимических показателей щелочного соленого озера Хилганта (Юго-Восточное Забайкалье) // *Водные ресурсы*. 2010. Т. 37. С. 477–483.
- Namsaraev Z.B., Gorlenko V.M., Buryukhaev S.P., Barkhutova D.D., Dambaev V.D., Dulov L.E., Sorokin V.V., Namsaraev B.B.* Water regime and variations in hydrochemical characteristics of the soda salt lake Khilganta (South-eastern Transbaikalia) // *Water Resources (Moscow)*. 2010. V. 37. P. 513–519.
- Самылина О.С., Сапожников Ф.В., Гайнанова О.Ю., Рябова А.В., Никитин М.А., Сорокин Д.Ю.* Альго-бактериальные сообщества содовых озер Кулундинской степи (Алтайский край, Россия) // *Микробиология*. 2015. Т. 84. С. 107–119.
- Samylina O.S., Sapozhnikov F.V., Gainanova O.Yu., Ryabova A.V., Nikitin M.A., Sorokin D.Yu.* Algo-bacterial communities of the Kulunda Steppe (Altai Region, Russia) soda lakes // *Microbiology (Moscow)*. 2014. V. 83. P. 849–860.
- Цыренова Д.Д., Брянская А.В., Намсараев З.Б., Акимов В.Н.* Таксономическая и экологическая характеристика цианобактерий некоторых солоноватых и соленых озер Южного Забайкалья // *Микробиология*. 2011. Т. 80. С. 230–240.
- Tsyrenova D.D., Bryanskaya A.V., Namsaraev Z.B., Akimov V.N.* Taxonomic and ecological characterization of cyanobacteria from some brackish and saline lakes of Southern Transbaikal region // *Microbiology (Moscow)*. 2011. V. 80. P. 216–227.
- Brown S.P., Veach A.M., Rigdon-Huss A.R., Grond K., Lickteig S.K., Lothamer K., Oliver A.K., Jumpponen A.* Scraping the bottom of the barrel: are rare high throughput sequences artifacts? // *Fungal Ecol.* 2015. V. 13. P. 221–225.
- Dadheech P.K., Casamatta D.A., Casper P., Krienitz L.* *Phormidium etoshii* sp. nov. (Oscillatoriales, Cyanobacteria) described from the Etosha Pan, Namibia, based on morphological, molecular and ecological features // *Fottea*. 2013. V. 13. P. 235–244.
- Edgar R.C.* Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST // *Bioinformatics*. 2010. V. 26. P. 2460–2461.
- Garcia-Pichel F., Prufert-Bebout L., Muyzer G.* Phenotypic and phylogenetic analyses show *Microcoleus chthonoplastes* to be a cosmopolitan cyanobacterium // *Appl. Environ. Microbiol.* 1996. V. 62. P. 3284–3291.
- Hardie L.A., Eugster H.P.* The evolution of closed-basin brines // *Mineralogical Society of America*. 1970. P. 253–273.
- Komárek J., Anagnostidis K.* Süßwasserflora von Mitteleuropa. 19/2. Cyanoprokariota. 2. Teil: Oscillatoriales / Eds. Büdel B., Gärtner G., Krienitz L., Schagerl M. Heidelberg: Elsevier, 2005. 759 p.
- Kupriyanova E.V., Cho S.M., Park Y.-I., Pronina N.A., Los D.A.* The complete genome of a cyanobacterium from a soda lake reveals the presence of the components of CO₂-concentrating mechanism // *Photosynth. Res.* 2016. V. 130. P. 151–165.
- Kupriyanova E.V., Sinetova M.A., Markelova A.G., Allakhverdiev S.I., Los D.A., Pronina N.A.* Extracellular β -class carbonic anhydrase of the alkaliphilic cyanobacterium *Microcoleus chthonoplastes* // *J. Photochem. Photobiol. B: Biobiology*. 2011. V. 103. P. 78–86.
- Namsaraev Z.B., Zaitseva S.V., Gorlenko V.M., Kozyreva L.P., Namsaraev B.B.* Microbial processes and factors controlling their activities in alkaline lakes of the Mongolian plateau // *Chinese J. Oceanol. Limnol.* 2015. V. 33. P. 1391–1401.
- Nübel U., Garcia-Pichel F., Muyzer G.* PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria // *Appl. Environ. Microbiol.* 1997. V. 63. P. 3327–3332.
- Oren A.* Mats of filamentous and unicellular cyanobacteria in hypersaline environments // *Microbial Mats* / Eds. Seckbach J., Oren A. Netherlands: Springer. 2010. P. 387–400.
- Perkerson III R.B., Perkerson E.A., Casamatta D.A.* Phylogenetic examination of the cyanobacterial genera *Geitlerinema* and *Limnotrix* (*Pseudanabaenaceae*) using 16S rDNA sequence data // *Algological Studies*. 2010. V. 134. P. 1–16.
- Price M.N., Dehal P.S., Arkin A.P.* FastTree 2 – Approximately Maximum Likelihood Trees for large alignments // *PLoS One*. 2010. V. 5. P. e9490.
- Siegismund M.A., Johansen J.R., Karsten U., Friedl T.* *Coleofasciculus* gen. nov. (Cyanobacteria): morphological and molecular criteria for revision of the genus *Microcoleus* Gomont. // *J. Phycol.* 2008. V. 44. P. 1572–1585.
- Strunecký O., Markéta M., Johansen J.R., Čapková K., Raabová L., Dvořák P., Komárek J.* A revision of the genus *Geitlerinema* and a description of the genus *Anagnostidinema* gen. nov. (Oscillatoriothycidae, Cyanobacteria) // *Fottea*. 2017. V. 17. P. 114–126.
- Stüeken E.E., Buick R., Schauer A.J.* Nitrogen isotope evidence for alkaline lakes on late Archean continents // *Earth and Planetary Sci. Lett.* 2015. V. 411. P. 1–10.
- Wilson H.D., Doebly J., Duvall M.* Chloroplast DNA diversity among wild and cultivated members of *Cucurbita* (Cucurbitaceae) // *Theor. Appl. Genet.* 1992. V. 84. P. 859–865.
- Wright E.S., Yilmaz L.S., Noguera D.R.* DECIPHER, a search-based approach to chimera identification for 16S rRNA sequences // *Appl. Environ. Microbiol.* 2012. V. 78. P. 717–725.

Cyanobacterial Diversity in the Alkaline Lake Khilganta during the Dry and Wet Periods**Z. B. Namsaraev^{1, *}, T. V. Kolganova², E. O. Patutina², D. D. Tsyrenova³, and O. S. Samylina⁴**¹*NRC Kurchatov Institute, Moscow, Russia*²*Institute of Bioengineering, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*³*Institute of General and Experimental Biology, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Ulan-Ude, Russia*⁴*Winogradsky Institute of Microbiology, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia***e-mail: zorigto@gmail.com*

Received March 15, 2018

Abstract—Clone libraries and morphological analysis were used to investigate cyanobacterial diversity in the cyanobacterial mat and dry crust at the bottom of the shallow, saline, alkaline Lake Khilganta (Southern Siberia, Russia). Filamentous cyanobacteria belonging to *Phormidium* genus and *Coleofasciculus chthonoplastes* were found to predominate during the dry period (2006) and the wet periods (1995 and 2012), respectively. Community composition during the dry and wet periods differed significantly. While 11 operational taxonomic units of cyanobacteria were revealed, only 3 occurred during both dry and wet periods. Occurrence of cosmopolitan *C. chthonoplastes*, which is common in neutral saline environments, is not typical of a continental alkaline lake and may be explained by the similarity of the dominant ions composition in lakewater and in seawater.

Keywords: cyanobacteria, saline lakes, alkaline lakes, cyanobacterial mat, *Coleofasciculus chthonoplastes*

СУКЦЕССИОННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ МИКРОБНОГО СООБЩЕСТВА ЩЕЛОЧНОГО ОЗЕРА ХИЛГАНТА В ЗАСУШЛИВЫЙ ПЕРИОД

© 2018 г. З. Б. Намсараев^{a, *}, В. М. Горленко^b, С. П. Бурюхаев^c

^aНациональный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия

^bФедеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, Москва, Россия

^cИнститут общей и экспериментальной биологии СО РАН, Улан-Удэ, Россия

*e-mail: zorigto@gmail.com

Поступила в редакцию 11.12.2017 г.

Исследовали активность микробных процессов в мелководном соленом щелочном озере Хилганта (Южная Сибирь) в засушливый период. Во время засухи на поверхности дна озера формировалась корка, в которой обнаружена невысокая активность продукционных процессов с доминированием аноксигенного фотосинтеза (2.3 мг С/(дм³ сут)). После кратковременных дождей активность микробных процессов увеличилась. В это время на дне озера формировался тонкий цианобактериальный мат с доминированием нитчатых цианобактерий рода *Geitlerinema* и фиксировался оксигенный фотосинтез (18 мг С/(дм³ сут)). При последующем испарении воды и повышении минерализации происходило изменение типов сообществ и их активности. На поверхности микробных матов появлялись пятна красного цвета, в которых доминировали аноксигенные фототрофные бактерии рода *Ectothiorhodospira*. Доминирующим продукционным процессом в микробных матах становился аноксигенный фотосинтез (60 мг С/(дм³ сут)). При повышении солёности до 200 г/л вода в озере сохранялась в небольших углублениях на дне, в которых доминировала экстремофильная зеленая микроводоросль *Dunaliella* sp., а скорость оксигенного фотосинтеза составляла (0.877 мг С/(дм³ сут)). Обнаруженная смена типов сообществ и их активности является примером сукцессии микробных сообществ соленых озер Южной Сибири в условиях засухи.

Ключевые слова: соленые озера, засушливый период, сукцессия сообщества, активность микробных процессов, фотосинтез, сульфатредукция, метаногенез

DOI: 10.1134/S0026365618040122

Сукцессия – последовательная смена ассоциаций видов на определенном участке среды в результате действия природных факторов, является одним из важнейших понятий в экологии. При сукцессии наблюдается не только последовательная смена видов и их ассоциаций, но и изменение косной составляющей экосистемы, в том числе накопления органического вещества, трансформации минералов, изменения геохимических параметров окружающей среды (Заварзин, 2007). В настоящее время исследования сукцессионных изменений микробных сообществ, в основном, сконцентрированы на изменении видового состава сообществ и выявлении взаимосвязей состава сообществ и факторов окружающей среды, тогда как исследования изменений функциональной активности во время сукцессионных изменений относительно редки (Dupraz, Visscher, 2005; Navarro et al., 2009; Podell et al., 2014).

Мы провели исследования микробного сообщества в соленом щелочном озере Хилганта, рас-

положенном в Южной Сибири. Ранее это озеро было интенсивно исследовано во влажный климатический период, когда параметры воды озера были относительно стабильными (Заварзин, 1993; Горленко и соавт., 1993; Герасименко и соавт., 2003; Компанцева и соавт., 2005; Намсараев, Намсараев, 2007; Цыренова и соавт., 2011а, 2011б). Начиная с 2000 года, район расположения озера подвергался засухам, что привело к частым пересыханиям озера и заполнению котловины озера водой только в ходе кратковременных дождей. После окончания дождей котловина озера снова высыхала, при этом минерализация воды в течение нескольких дней возрастала, приблизительно, от 40 до 260 г/л и выше (Намсараев и соавт., 2010). Резкие изменения параметров воды в озере позволили нам провести исследования, которые невозможно выполнить при стабильном состоянии экосистемы озера, и изучить сукцессионные изменения сообщества.

Целью данной работы стало исследование функциональной активности микробного сообщества озера Хилганта в ходе сукцессионных изменений, вызванных изменением минерализации воды озера.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования. Озеро Хилганта (50°42.535' с.ш., 115°06.086' в.д.) расположено в мелкосопочной степной зоне Юго-Восточного Забайкалья на водоразделе между реками Онон и Ага на высоте 668 м над уровнем моря в 76 км южнее поселка Агинское. Озеро округлой формы, с пологими берегами, бессточное. Максимальная площадь водного зеркала озера в многоводный период достигает 0.3 км², наибольшая глубина водной толщи – 64 см. В засушливый период озерная котловина полностью пересыхает.

Методы исследования. Непосредственно на месте отбора проб измеряли температуру, рН, окислительно-восстановительный потенциал (Eh), концентрацию карбонатов титрованием и минерализацию воды рефрактометром.

Концентрацию хлорофилла *a* и бактериохлорофилла *a* определяли спектрофотометрически (Намсараев, 2009). Минералогия донных осадков была изучена при помощи световой микроскопии (Намсараев и соавт., 2010).

Данные о погодных условиях и осадках были получены из базы данных World Meteorological Organization, метеостанция поселка Агинское, WMOID 30859 (<https://www.ncdc.noaa.gov/data-access/land-based-station-data/land-based-datasets>). Содержание влаги в донных осадках определяли путем их высушивания в термостате при 105°C и взвешивания образца до и после высушивания (ГОСТ 28268-89, 2009).

Активность фотосинтеза и темновой фиксации углекислоты определяли в изолированных пробах с радиоактивным ¹⁴C бикарбонатом, сульфатредукцию – с меченым ³⁵S-сульфатом (Кузнецов, Дубинина, 1989; Горленко и соавт., 1999), литотрофный метаногенез с меченым по ¹⁴C бикарбонатом (Намсараев и соавт., 1999). Расчет расхода углерода, используемого в микробных процессах сульфатредукции и метаногенеза, проводили по известным уравнениям (Беляев и соавт., 1981). Пробы воды, микробных матов, корки и донных осадков помещали в стеклянные флаконы объемом 20 мл и экспонировали в течение 12 ч в световых и температурных условиях *in situ*. При определении скорости фотосинтеза пробы инкубировали на свету, тогда как пробы для определения скорости темновой фиксации CO₂, сульфатредукции и метаногенеза – в темноте. Для определения скорости аноксигенного фотосинтеза использовали ингибитор диурон, который

добавляли в пробу. При расчете продукции по известной формуле (Кузнецов, Дубинина, 1989) учитывался только растворенный в воде углерод бикарбоната. Такое допущение было нами сделано с учетом превышения концентрации бикарбоната над карбонатом и предполагаемого медленного перераспределения меченого бикарбоната между природным и внесенным бикарбонатом.

Определение скоростей микробных процессов в цианобактериальных матах и пробах зеленой микроводоросли *Dunaliella* sp. проводили с добавлением озерной воды, собранной в момент отбора пробы. Для изучения влияния различного уровня солености на скорость продукционных процессов свежееотобранные образцы микробных матов заливали озерной водой, в которую добавляли пресную воду в различных соотношениях. Флаконы с образцами корки заполняли пресной водой, имитирующей выпадение дождевых осадков, выдерживали в течение 1 ч до растворения солей в образце (финальный рН 8.18, минерализация 50 г/л) и после этого инкубировали с радиоизотопной меткой на поверхности дна озера. Для определения видового состава фототрофов образцы фиксировали 4% формалином. При микроскопировании сухой корки кусочек образца растирали на предметном стекле, заливали 5% раствором соляной кислоты для удаления карбонатов и затем рассматривали в оптическом микроскопе при увеличении ×400–1000. При определении цианобактерий использовали определитель Komárek, Anagnostidis (2007), зеленых водорослей – определитель Дедусенко-Щеголевой и соавт. (1959), аноксигенных фототрофных бактерий – справочник Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (2005).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Климатические условия и гидрохимия озера Хилганта. Химический состав, рН и минерализация воды озера Хилганта зависят от климатических условий Юго-Восточного Забайкалья. Во влажные годы (до 1999 г.) при годовой сумме осадков до 550 мм озеро было заполнено водой, которая имела минерализацию около 40–50 г/л, рН 9.5–9.9 и принадлежала к хлоридно-сульфатно-натриевому типу. В засушливые годы, в том числе и в период проведения исследований (2006 г. – 259 мм осадков, 2007 г. – 152 мм), озеро, как правило, было полностью высохшим. В небольших углублениях на дне озера сохранялась вода насыщенно-зеленого цвета. Минерализация воды в углублениях составляла 200–260 г/л, рН 7.2–8.1, тип – хлоридно-сульфатно-натриевый. Также в засушливые годы вода появлялась в озере во время кратковременных дождей и из-за высокой дневной температуры испарялась в течение нескольких дней. Данное явление детально наблюдалось нами в августе 2007 года, когда минерализация воды возрастала от 43 до 260 г/л, при

этом в ходе испарения воды рН снижался от 9.5 до 7.99, а концентрация бикарбоната увеличивалась с 0.14 до 0.21 г/л. Результаты гидрохимического анализа были опубликованы ранее в статье Намсараев и соавт. (2010).

Донные отложения в засушливый период. В засушливый период озеро покрывались коркой толщиной около 0.5 см. На поверхности корки происходило выпадение кристаллов блоедита ($\text{Na}_2\text{Mg}(\text{SO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) и галита (NaCl). Влажность корки составляла 4.7% (2007 г.). Корка препятствует испарению влаги и иссушению донных осадков. Сразу под коркой на горизонте 0.5–2 см влажность осадков повышалась до 26.66%, затем снижалась до 11.83% (горизонт 55–70 см). С глубиной рН водной вытяжки донных осадков понижался от 8.6 (горизонт 0–3 см) до 8.13 (горизонт 70 см). Иловая вода обнаруживалась в раскопках в озере в 2006–2007 годах на глубине 35–80 см. Минерализация иловых вод составляла 128–155 г/л, рН 7.1–7.54.

Фототрофное сообщество в засушливый период. Микроскопия корки на дне высохшего озера показала, что в поверхностном, наиболее сухом слое корки толщиной до 1 мм обнаруживалось максимальное разнообразие морфотипов цианобактерий (*Chroococcus minutus*, *Leptolyngbya tenuis*, *Leptolyngbya woronichinii*, *Coleofasciculus chthonoplastes* и *Phormidium molle*) и зеленых водорослей (*Oocistis* sp., *Dunaliella salina*). Подповерхностный слой корки толщиной около 3–4 мм имел более мягкую консистенцию и часто был окрашен в пурпурный цвет. В этом слое увеличивалось количество аноксигенных фототрофных бактерий, среди которых встречались представители семейств *Ectothiorhodospiraceae* (*Ectothiorhodospira* sp.), *Chromatiaceae* (*Marichromatium* sp., *Allochromatium* sp., *Marichromatium* sp., *Allochromatium* sp.), пурпурных несерных бактерий (*Rhodobacter* sp., *Rhodovulum* sp.). Содержание в корке хлорофилла *a* достигало 448 мг/м², бактериохлорофилла *a* – 106 мг/м². Послойное микроскопирование показало, что в поверхностном слое корки соотношение пустых чехлов нитчатых цианобактерий к чехлам с цианобактериальными трихомами составляло ~1 : 1. В более глубоких слоях количество цианобактериальных чехлов с клетками значительно снижалось и их соотношение к пустым чехлам составляло ~1 : 10. Это, возможно, свидетельствует о том, что в более глубоких и влажных слоях деструкция клеток цианобактерий протекает более интенсивно, чем на поверхности.

Во время кратковременных дождей в засушливый период котловина озера ненадолго заполнялась водой. В течение 2–3 дней на дне озера развивалась тонкая пленка цианобактериального мата, которая отрывалась от поверхности дна и всплывала на поверхность воды под воздействием пузырей кислорода, образующихся внутри мата. В составе мата доминировали цианобактерии рода *Geitlerinema*,

также встречались цианобактерии родов *Nodularia* и *Oscillatoria*. Содержание хлорофилла *a* в цианобактериальных матах составляло 61–89 мг/м², содержание бактериохлорофилла *a* было ниже предела обнаружения. Через несколько дней в ходе испарения воды минерализация озера достигала около 100 г/л, при этом цианобактериальные маты оседали на дно и постепенно разрушались. В диапазоне солёности около 100–150 г/л на поверхности матов появлялись пятна пурпурных бактерий с доминированием *Ectothiorhodospira* sp. В цианобактериальных матах обнаруживались хлорофилл *a* (443 мг/м²) и бактериохлорофилл *a* (568 мг/м²). На заключительном этапе высыхания озера (при минерализации 200–260 г/л) в некоторых углублениях на дне озера оставались лужи с доминированием зеленой водоросли *Dunaliella salina*, не способных к формированию структурированных матов.

Активности продукционных процессов. Скорость оксигенного фотосинтеза в корке матов (2006 г.) составляла 1.5 мг С/(дм³ сут), тогда как скорость аноксигенного фотосинтеза была равна 2.3 мг С/(дм³ сут). Скорость темновой фиксации в сухой корке – 0.68 мг С/(дм³ сут).

Скорость оксигенного фотосинтеза в рассоле (2006 г.), преимущественно обусловленного *Dunaliella viridis*, доминировавшей после испарения основной водной массы, составляла 0.877 мг С/(дм³ сут), тогда как скорость аноксигенного фотосинтеза была ниже (0.029 мг С/(дм³ сут), а темновой фиксации – 0.034 мг С/(дм³ сут)).

Во время кратковременных дождей в засушливый период (2007 г.) котловина озера ненадолго заполнялась водой. В воде озера (2007 г., в момент измерения минерализация 50 г/л, рН 9.03) скорость оксигенного фотосинтеза составляла 3.28 мг С/(дм³ сут), скорость аноксигенного фотосинтеза – 0.27 мг С/(дм³ сут). При дальнейшем испарении воды минерализация в озере достигла 100 г/л, скорость оксигенного фотосинтеза в цианобактериальных матах – 18 мг С/(дм³ сут), аноксигенного – 16.6 мг С/(дм³ сут), темновой фиксации 8.2 мг С/(дм³ сут). При повышении минерализации до 170 г/л скорость оксигенного фотосинтеза в матах снижалась до 13.1 мг С/(дм³ сут), при этом резко увеличивались скорости аноксигенного фотосинтеза до 60.6 мг С/(дм³ сут) и темновой фиксации до 59.8 мг С/(дм³ сут). В иле под матом скорость темновой фиксации составляла 0.76 мг С/(дм³ сут).

Образцы цианобактериального и “пурпурного” матов, отобранные при минерализации 100 и 170 г/л, были проинкубированы при различной искусственно созданной солёности. Для этого рассол из озера разводили пресной водой в разных соотношениях. Результаты показали, что оксигенный фотосинтез имеет оптимум при минерализации 20–60 г/л

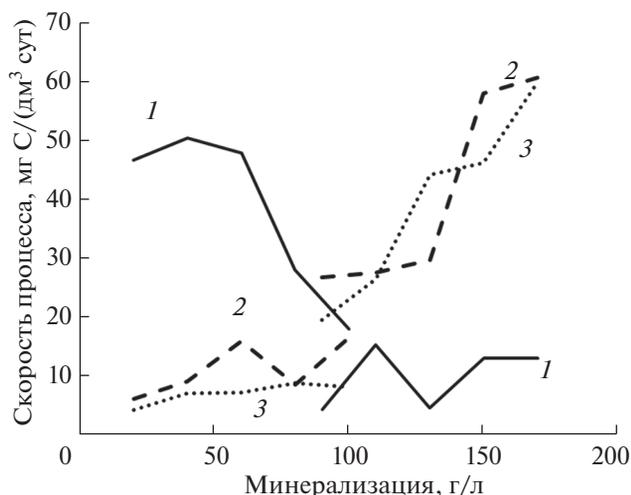


Рис. 1. Зависимость интенсивности продукционных процессов от минерализации: 1 – окислительный фотосинтез; 2 – аноксигенный фотосинтез; 3 – темновая фиксация. Графики со значениями минерализации 20–40–80–60–100 г/л – цианобактериальный мат. Графики со значениями минерализации 90–110–130–150–170 г/л – “пурпурный” мат.

(46.6–50.4 мг С/(дм³ сут)). При повышении минерализации до 80 г/л скорость окислительного фотосинтеза снижается до 28 мг С/(дм³ сут), а при 170 г/л – до 13.1 мг С/(дм³ сут). Поведение аноксигенного фотосинтеза и темновой фиксации имеет противоположный тренд. При минерализации 20–80 г/л скорости этих процессов составляют всего лишь 4.3–16 мг С/(дм³ сут), но при повышении минерализации до 170 г/л эти процессы доминируют, и их скорости достигают 60.6 и 59.8 мг С/(дм³ сут) соответственно (рис. 1).

Активности терминальных деструкционных процессов. Микробная сульфатредукция является доминирующим терминальным деструкционным процессом в донных осадках озера. Максимальные скорости сульфатредукции были обнаружены в корке – до 15.93 мг S/(дм³ сут), что соответствует расходу органического вещества 11.95 мг С/(дм³ сут). В корке через сульфатредукцию расходуется на 2 порядка больше органического вещества, чем через литотрофный метаногенез.

Сульфатредукция доминировала среди деструкционных процессов и в тонких цианобактериальных матах, развивавшихся в период кратковременных дождей. Скорость сульфатредукции в мате составляла 2.87 мг S/(дм³ сут), литотрофного метаногенеза 29.3 мкл CH₄/(дм³ сут) (минерализация в момент отбора 100 г/л). Расход органического вещества в матах через сульфатредукцию на 3 порядка превышал расход через метаногенез – 2.11 и 0.06 мг С/(дм³ сут) соответственно. Скорость терминальных процессов в верхних слоях донных осад-

ков, расположенных под цианобактериальным матом составляла: сульфатредукция – 48.05 мг S/(дм³ сут), метаногенез – 576 мкл CH₄/(дм³ сут). Расход углерода через сульфатредукцию и метаногенез составлял 36 и 1.2 мг С/(дм³ сут) соответственно.

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные во время исследования данные позволили реконструировать сукцессионные изменения функциональной активности микробного сообщества озера Хилганта в засушливый период. В ходе испарительного концентрирования и повышения минерализации воды после кратковременных дождей происходит смена типов микробных сообществ и доминирующих типов фиксации углерода. После кратковременных дождей в засушливый период котловина озера заполняется водой с минерализацией около 30–50 г/л и рН около 9–9.5, и в ней развивается тонкий цианобактериальный мат с доминированием нитчатой цианобактерии рода *Geitlerinema*. В течение приблизительно 10 дней вода постепенно испаряется, что сопровождается повышением ее минерализации (Намсараев и соавт., 2010). При минерализации 100 г/л была обнаружена максимальная активность окислительного фотосинтеза (18 мг С/(дм³ сут)). При дальнейшем повышении минерализации на поверхности цианобактериального мата появлялись пятна красного цвета, в которых доминировали аноксигенные фототрофные бактерии рода *Ectothiorhodospira*, скорость окислительного фотосинтеза снижалась и начинал доминировать аноксигенный фотосинтез (60.6 мг С/(дм³ сут)) и темновая фиксация CO₂ (59.8 мг С/(дм³ сут)), которые достигали максимума интенсивности при минерализации около 170 г/л. Смена доминирующих типов фотосинтетических процессов также сопровождалась изменением соотношения хлорофилла *a* и бактериохлорофилла *a* в микробных матах. При минерализации 100 г/л доминировал хлорофилл *a*, при 170 г/л – бактериохлорофилл *a*. При практически полном высыхании озера вода сохраняется на поверхности только в отдельных углублениях с доминированием экстремофильной галофильной эукариотической микроводоросли *Dunaliella* sp. и минерализацией 200–260 г/л. Преобладающим процессом на этой стадии является окислительный фотосинтез, причем скорость его относительно невысока (0.877 мг С/(дм³ сут)). При дальнейшем испарении образуется сухая корка с доминированием в ней процесса аноксигенного фотосинтеза, скорость которого (2.3 мг С/(дм³ сут)) незначительно превышает скорость окислительного фотосинтеза.

Повышение активности микробных процессов в период после кратковременных дождей играет важную роль в существовании сообщества, так как в этот период в озерной котловине продуцируется значительная часть органического вещества. В тон-

Таблица 1. Интенсивности продукционных и терминальных деструкционных процессов в озере Хилганта

Образец, проба	Оксигенный фотосинтез	Аноксигенный фотосинтез	Темновая фиксация	Сульфатредукция	Литотрофный метаногенез
	мг С / (дм ³ сут)			мг S / (дм ³ сут)	мкл СН ₄ / (дм ³ сут)
Корка на поверхности донных осадков (2006 г.)	1.5	2.3	0.68	15.93	230
Донные осадки под коркой (2006 г.)	Н.д.	Н.д.	0.24–1.082	0.4–2.2	20–379.5
Проба с <i>Dunaliella</i> sp. (2006 г.)	0.877	0.029	0.034	Н.д.	Н.д.
Вода озера (2007 г., М* 50 г/л)	3.28	0.27	Н.д.	Н.д.	Н.д.
Цианобактериальный мат (2007 г., М 100 г/л)	18	16.6	8.2	2.87	29.3
“Пурпурный мат” (2007 г., М 170 г/л)	13.1	60.6	59.8	Н.д.	Н.д.
Донные осадки под тонкими матами в период дождей (2007 г., М 50 г/л)	Н.д.	Н.д.	0.7	48.05	576
Цианобактериальные маты во влажный период (1999 г.)	57.6	328.4	2.6	Н.д.	Н.д.
Донные осадки под цианобактериальным матом во влажный период (1999 г.)	Н.д.	Н.д.	Н.д.	1.05–8.9	0.37–1.53

* М – общая минерализация.

ких цианобактериальных матах, появляющихся после дождей, доминирующим продукционным процессом являлся кислородный фотосинтез, при этом суммарная активность продукционных процессов превышала активность терминальных деструкционных процессов. Суммарная продукция достигала 42.8 мг С/(дм³ сут), тогда как потребление углерода через сульфатредукцию и литотрофный метаногенез составляло 2.1 мг С/(дм³ сут). При отсутствии дождей в корке на поверхности дна озера была обнаружена активность продукционных процессов, но ее значения на порядок ниже, чем во время дождей. Доминирующим процессом являлся аноксигенный фотосинтез, в пользу чего свидетельствует наличие визуально различимого пурпурного слоя под поверхностью корки. Суммарная продукция составляла 4.5 мг С/(дм³ сут), тогда как через терминальные процессы расходовалось 12 мг С/(дм³ сут), что свидетельствует о доминировании деструкционных процессов в период между дождями.

Максимальные значения фотосинтетической продукции в озере Хилганта во влажный период (386 мг С/(дм³ сут) или 3.86 г С/(м² сут)) в 2–3 раза ниже, чем в соленых и содовых озерах тропических регионов, таких как Солар Лейк в Египте (5–12 г С/(м² сут)) или содовых озер Восточно-Африканской рифтовой зоны (до 11 г С/(м² сут)) (Melack, Kilham, 1974; Krumbein

et al., 1977; Namsaraev et al., 2015). Тем не менее, скорость светозависимой ассимиляции углекислоты в матах и корках озера Хилганта сравнима со скоростями, зарегистрированными в цианобактериальных и лишайниковых корках, развивающихся на поверхности почвы в пустыне Намиб – 0.15–0.29 г С/(м² сут) или в степной зоне Центральной Европы – до 1 г С/(м² сут) (Lange et al., 1994; Evans, Lange, 2001).

Скорость сульфатредукции в озере Хилганта (0.4–48.05 мг S/(дм³ сут)) сравнима со скоростями, зарегистрированными в донных осадках гиперсоленых щелочных озер Кулунды (0.128–13.5 мг S/(дм³ сут), и значительно выше максимальной скорости сульфатредукции, обнаруженной в водной толще гиперсоленого щелочного озера Моно-Лейк (0.073 мг S/(дм³ сут)) (Oremland et al., 2004; Foti et al., 2007). Скорость литотрофного метаногенеза в пробах воды и донных осадков озера Хилганта (0.37–576 мкл СН₄/(дм³ сут)) также сравнима с скоростью этого процесса в других соленых и содовых озерах Монголии и Забайкалья (0.3–75.6 мкл СН₄/(дм³ сут)) (Namsaraev et al., 2015).

Статья посвящена памяти проф. Б.Б. Намсараева, инициировавшего исследование микробных сообществ соленых и содовых озер Забайкалья, под

руководством которого были проведены исследования микробных процессов в озере Хилганта.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (соглашение о предоставлении субсидии № 14.574.21.0137, уникальный идентификатор проекта RFMEFI57417X0137). Исследования фотосинтетических пигментов в образцах были проведены с привлечением оборудования Центра коллективного пользования научным оборудованием “Исследование каталитических и биокаталитических процессов” РГУ нефти и газа (НИУ) имени И.М. Губкина.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Беляев С.С., Леин А.Ю., Иванов М.В. Роль метанообразующих и сульфатредуцирующих бактерий в процессах деструкции органического вещества // Геохимия. 1981. № 3. С. 437–445.
- Герасименко Л.М., Митюшина Л.Л., Намсараев Б.Б. Маты *Microcoleus* из алкалофильных и галофильных сообществ // Микробиология. 2003. Т. 72. № 1. С. 84–92.
- Gerasimenko L.M., Mityushina L.L., Namsaraev B.B. *Microcoleus* mats from alkaliphilic and halophilic communities // Microbiology (Moscow). 2003. V. 72. P. 71–79.
- ГОСТ 28268–89. Почвы. Методы определения влажности, максимальной гигроскопической влажности и влажности устойчивого завядания растений. М.: Стандартинформ, 2006.
- Горленко В.М., Намсараев Б.Б., Кулырова А.В., Заварзина Д.Г., Жилина Т.Н. Активность сульфатредуцирующих бактерий в донных осадках содовых озер Юго-Восточного Забайкалья // Микробиология. 1999. Т. 68. № 5. С. 664–670.
- Gorlenko V.M., Zhilina T.N., Namsaraev B.B., Kulyrova A.V., Zavarzina D.G. The activity of sulfate-reducing bacteria in bottom sediments of soda lakes of the Southeastern Transbaikalian region // Microbiology (Moscow). 1999. V. 68. P. 580–585.
- Дедусенко-Щеголева Н.Т., Матвиенко А.М., Шкорбаков Л.А. Определитель пресноводных водорослей СССР. Вып. 8. Зеленые водоросли. Класс вольвоксовые. М.-Л.: Изд-во АН СССР, 1959. 223 с.
- Заварзин Г.А. Эпиконтинентальные содовые водоемы как предполагаемые реликтовые биотопы формирования наземной биоты // Микробиология. 1993. Т. 62. С. 789–800.
- Заварзин Г.А. Бытие и развитие: эволюция, сукцессия, хаэссеитас // Вестник Российской академии наук. 2007. Т. 77. № 4. С. 334–340.
- Компанцева Е.И., Сорокин Д.Ю., Горленко В.М., Намсараев Б.Б. Фототрофное сообщество соленого щелочного озера Хилганта (Юго-Восточное Забайкалье) // Микробиология. 2005. Т. 74. № 3. С. 410–419.
- Kompantseva E.I., Sorokin D.Yu., Gorlenko V.M., Namsaraev B.B. The phototrophic community found in Lake Khilganta (an alkaline saline lake located in the Southeastern Transbaikalian Region) // Microbiology (Moscow). 2005. V. 74. P. 352–361.
- Кузнецов С.И., Дубинина Г.А. Методы изучения водных микроорганизмов. М.: Наука, 1989. 286 с.
- Намсараев З.Б. Использование коэффициентов поглощения для расчета концентрации хлорофиллов и бактериохлорофиллов // Микробиология. 2009. Т. 78. № 6. С. 836–839.
- Namsaraev Z.B. Application of extinction coefficients for quantification of chlorophylls and bacteriochlorophylls // Microbiology (Moscow). 2009. V. 78. P. 794–797.
- Намсараев З.Б., Горленко В.М., Бурюхаев С.П., Бархутова Д.Д., Дамбаев В.Б., Дулов Л.Е., Сорокин Д.Ю., Намсараев Б.Б. Водный режим и изменения гидрохимических показателей щелочного соленого озера Хилганта (Юго-Восточное Забайкалье) // Водные ресурсы. 2010. Т. 37. № 4. С. 477–483.
- Namsaraev Z.B., Gorlenko V.M., Dulov L.E., Sorokin V.V., Buryukhaev S.P., Barkhutova D.D., Dambaev V.B., Namsaraev B.B. Water regime and variations in hydrochemical characteristics of the soda salt Lake Khilganta (Southeastern Transbaikalia) // Water Resources. 2010. V. 37. P. 513–519.
- Намсараев Б.Б., Жилина Т.Н., Кулырова А.В., Горленко В.М. Бактериальное образование метана в содовых озерах Юго-Восточного Забайкалья // Микробиология. 1999. Т. 68. № 5. С. 671–676.
- Namsaraev B.B., Zhilina T.N., Gorlenko V.M., Kulyrova A.V. Bacterial methanogenesis in soda lakes of the Southeastern Transbaikalian Region // Microbiology (Moscow). 1999. V. 68. P. 586–591.
- Намсараев Б.Б., Намсараев З.Б. Микробные процессы круговорота углерода и условия среды обитания в щелочных озерах Забайкалья и Монголии // Труды Института микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН. Вып. 14. М.: Наука, 2007. С. 299–322.
- Цыренова Д.Д., Брянская А.В., Козырева Л.П., Намсараев З.Б., Намсараев Б.Б. Структура и особенности формирования галоалкалофильного сообщества озера Хилганта // Микробиология. 2011. Т. 80. № 2. С. 251–257.
- Tsyrenova D.D., Kozyreva L.P., Namsaraev B.B., Bryanskaya A.V., Namsaraev Z.B. Structure and formation properties of the haloalkaliphilic community of Lake Khilganta // Microbiology (Moscow). 2011. V. 80. P. 237–243.
- Цыренова Д.Д., Брянская А.В., Намсараев З.Б., Акимов В.Н. Таксономическая и экологическая характеристика цианобактерий некоторых солоноватых и соленых озер Южного Забайкалья // Микробиология. 2011. Т. 80. № 2. С. 230–240.
- Tsyrenova D.D., Bryanskaya A.V., Namsaraev Z.B., Akimov V.N. Taxonomic and ecological characterization of cyanobacteria from some brackish and saline lakes of Southern Transbaikalian Region // Microbiology (Moscow). 2011. V. 80. P. 216–227.
- Dupraz C., Visscher P.T. Microbial lithification in marine stromatolites and hypersaline mats // Trends Microbiol. 2005. V. 13. P. 429–438.
- Evans R.D., Lange O.L. Biological soil crusts and ecosystem nitrogen and carbon dynamics // Biological Soil Crusts: Structure, Function, and Management / Eds. Belnap J., Lange O.L. Berlin, Heidelberg; Springer, 2001. P. 263–279.
- Foti M., Sorokin D.Y., Lomans B., Mussman M., Zacharova E.E., Pimenov N.V., Kuenen J.G., Muyzer G. Diversity, activity, and abundance of sulfate-reducing bacteria in sa-

line and hypersaline soda lakes // *Appl. Environ. Microbiol.* 2007. V. 73. P. 2093–2100.

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. V. 2: The Proteobacteria. Ed. George M.G. Berlin: Springer-Verlag, 2005. 2816 p.

Komárek J., Anagnostidis K. Cyanoprokariota 2. Teil: *Oscillatoriales* // *Süßwasserflora von Mitteleuropa* / Hrsg. Büdel B., Gärtner G., Krienitz L., Schagerl M. 2007. Bd. 19/2. 759 p.

Krumbein W.E., Cohen Y., Shilo M. Solar Lake (Sinai). 4. Stromatolitic cyanobacterial mats // *Limnol. Oceanogr.* 1977. V. 22. P. 635–656.

Lange O.L., Meyer A., Zellner H., Heber U. Photosynthesis and water relations of lichen soil crusts: field measurements in the coastal fog zone of the Namib Desert // *Functional Ecol.* 1994. V. 8. P. 253–264.

Melack J.M., Kilham P. Photosynthetic rates of phytoplankton in East African alkaline, saline Lakes // *Limnol. Oceanogr.* 1974. V. 19. P. 743–755.

Namsaraev Z.B., Zaitseva S.V., Gorlenko V.M., Kozyreva L.P., Namsaraev B.B. Microbial processes and factors controlling their activities in alkaline lakes of the Mongolian plateau // *Chinese J. Oceanol. Limnol.* 2015. V. 33. P. 1391–1401.

Navarro J.B., Moser D.P., Flores A., Ross C., Rosen M.R., Dong H., Zhang G., Hedlund B.P. Bacterial succession within an ephemeral hypereutrophic Mojave Desert playa Lake // *Microbial Ecol.* 2009. V. 57. P. 307–320.

Podell S., Emerson J.B., Jones C.M., Ugalde J.A., Welch S., Heidelberg K.B., Banfield J.F., Allen E.E. Seasonal fluctuations in ionic concentrations drive microbial succession in a hypersaline lake community // *ISME J.* 2014. V. 8. P. 979–990.

Oremland R.S., Stolz J.F., Hollibaugh J.T. Microbial arsenic cycle in Mono Lake, California // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2004. V. 48. P. 15–27.

Successional Changes in the Microbial Community of the Alkaline Lake Khilganta during the Dry Season

Z. B. Namsaraev^{1,*}, V. M. Gorlenko², and S. P. Buryukhaev³

¹*NRC Kurchatov Institute, Moscow, Russia*

²*Winogradsky Institute of Microbiology, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

³*Institute of General and Experimental Biology, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Ulan-Ude, Russia*

*e-mail: zorigto@gmail.com

Received December 11, 2017

Abstract—Microbial processes in a shallow, saline, alkaline Lake Khilganta (Southern Siberia) were studied during the dry season. During the drought, a crust was formed on the lake surface, where low rates of production processes were observed, with predominance of anoxygenic photosynthesis (2.3 mg C/(dm³ day)). The rates of microbial processes increased after short-term rains. During this period, a thin cyanobacterial mat was formed on the bottom, in which filamentous cyanobacteria *Geitlerinema* spp. predominated and the rate of oxygenic photosynthesis was up to 18 mg C/(dm³ day). Subsequent water evaporation and salinity increase resulted in altered community types and their activity. Red spots emerged on the mat surface, where anoxygenic phototrophic members of the genus *Ectothiorhodospira* predominated. Anoxygenic photosynthesis became the main production process in microbial mats, with the rate of 60 mg C/(dm³ day). At salinity increase to 200 g/L, the water remained in small depressions on the bottom, where extremophilic green algae *Dunaliella* sp. predominated, and the rate of oxygenic photosynthesis was 0.877 mg C/(dm³ day). These changes in the type and activity of microbial communities is an example of succession of microbial communities in Southern Siberia saline lakes during drought.

Keywords: saline lakes, dry period, community succession, rates of microbial processes, photosynthesis, sulfate reduction, methanogenesis