

на правах рукописи

КОРНЕЕВА
ВАЛЕРИЯ АЛЕКСЕЕВНА

Биоразнообразие сульфатредуцирующих бактерий в кислород-содержащих водах Черного и Балтийского морей

03.02.03 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2015

Работа выполнена на кафедре микробиологии биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»

Научный руководитель:

кандидат биологических наук, доцент
Брюханов Андрей Леонидович

Научный консультант:

доктор биологических наук
Пименов Николай Викторович

Официальные оппоненты:

Вайнштейн Михаил Борисович
доктор биологических наук, профессор
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им.
Г.К. Скрябина Российской академии наук»,
заместитель директора по научной работе

Николаев Юрий Александрович
доктор биологических наук
Отдел очистки сточных вод Инженерно-технологического
центра Управления новой техники и технологий,
АО «Мосводоканал»,
главный специалист

Ведущая организация:

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет, биологический институт»

Защита состоится 22 сентября 2015 г. в 15:30 на заседании диссертационного совета Д.501.001.21 при Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова по адресу: 119234, г. Москва, Ленинские горы, дом 1, МГУ, корп. 12, Биологический факультет, ауд. М-1. Тел.: 8(495)939-54-83, эл. почта: npiskunkova@rambler.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке МГУ и на сайте биологического факультета МГУ <http://www.bio.msu.ru/>.

Автореферат разослан _____ 2015 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета, к.б.н.

Пискункова Нина Федоровна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы.

К сульфатредуцирующим бактериям (СРБ) относят анаэробные микроорганизмы, использующие сульфат в качестве конечного акцептора электронов при окислении органических соединений (преимущественно низкомолекулярных) или молекулярного водорода. В анаэробных местообитаниях СРБ, наряду с метаногенными археями, осуществляют терминальную деструкцию органических соединений, продуцируя при этом сероводород. СРБ традиционно считаются строго анаэробными микроорганизмами, однако в последнее время показано, что многие из них обладают эффективными ферментативными системами антиокислительной защиты [Dolla et al., 2006; Brioukhanov et al., 2010], позволяющими им не только выживать, но и оставаться метаболически активными в окисленных слоях осадочных отложений, в циано-бактериальных матах, биопленках, активных илах сточных вод и других местообитаниях, подвергающихся периодическому воздействию кислорода [Canfield a. Des Marais, 1991; Krekeler et al., 1997; Jonkers et al., 2005].

Черное море – крупнейший в мире меромиктический водоем, где наблюдается существование несмешиваемых слоев воды (аэробные воды, зона хемоклина и анаэробные воды, содержащие значительные количества растворенного сероводорода). Хорошо известно, что сероводород в Черном море образуется, в основном, за счет деятельности сульфатредуцирующих бактерий в анаэробной водной толще и донных осадках [Сорокин, 1970; Леин и др., 1990; Гулин, 1991; Иванов и др., 1992]. В литературных источниках разными исследователями приводятся количественные оценки масштабов бактериальной сульфатредукции в анаэробных водах Черного моря [Sorokin, 1971; Леин и др., 1990; Albert, 1995]. С использованием молекулярно-биологических методов было подтверждено присутствие СРБ [Vetriani, 2003; Durisch-Kaiser et al., 2005; Lin et al., 2006; Neretin et al., 2007] в анаэробной водной толще и зоне хемоклина Черного моря, но филогенетический состав сообществ черноморских СРБ оставался до конца не выясненным, кроме того, полностью отсутствовали данные о выделении, идентификации и описании чистых культур этих бактерий. Нет информации и о возможности протекания процесса сульфатредукции в аэробной водной толще, несмотря на то, что сотрудники Института океанологии им. П.П. Ширшова РАН более 20 лет назад обнаружили в аэробных водах Черного моря присутствие аналитически определяемых количеств восстановленных соединений серы [Волков и др., 1992], появление которых можно объяснить только протеканием биологических процессов восстановления сульфатов.

Балтийское море представляет собой мелководный мезотрофный морской бассейн со специфическими особенностями гидрологического режима, присущими внутренним водоемам с затрудненным водообменом. Его поверхностные, сильно распресненные и более глубинные, соленые воды имеют разное происхождение: первые поступают со стоком рек, вторые – из Северного моря. Затрудненный водообмен в сочетании с достаточно высокой продуктивностью

приводит к тому, что во впадинах Балтийского моря за счет деятельности микроорганизмов происходит быстрое исчезновение кислорода и формируется обширная зона сероводородного заражения водной толщи, обусловленная жизнедеятельностью СРБ [Fonselius, 1986; Андерсен и Паулак, 2007; Carstensen et al., 2014]. В анаэробной водной толще Готландской впадины Балтийского моря немецкими исследователями выявлены процессы сульфатредукции и молекулярными методами идентифицированы некоторые представители СРБ [Brettar et al., 2012], но данных о присутствии активных форм этих микроорганизмов в подповерхностных аэробных водах в литературе нет. В российском секторе Балтийского моря анаэробные придонные слои водной толщи практически постоянно наблюдаются в Гданьской впадине на глубинах свыше 80-85 м [Нефть и окружающая среда Калининградской области, 2012].

Высокая антропогенная нагрузка, которой подвержены внутриконтинентальные моря, окруженные промышленно развитыми регионами, способствует значительному расширению площади постоянного или периодического заражения придонной водной толщи сероводородом, как это наблюдается в водной толще северо-западного шельфа Черного [Кондратьев и Внуков, 1999] и во впадинах Балтийского и Каспийского морей [Бруевич, 1937; Сапожников и Мордасова, 2007; Carstensen et al., 2014].

Большинство исследователей склоняются к гипотезе, что основным источником сероводорода во впадинах мелководных бассейнов являются донные осадки, где в условиях увеличения потока органического вещества резко усиливается интенсивность процесса сульфатредукции. Однако с учетом новых данных о СРБ, обладающих эффективными биохимическими и физиологическими способами защиты от окислительных стрессов и способных в водной толще морей сохранять физиологическую активность в микроаэробных микронишах взвешенных частиц [Shanks & Reeder, 1993], можно предположить, что СРБ аэробной водной толщи оказывают существенное воздействие на кислородный режим вод мезотрофных и эвтрофных морских водоемов.

Таким образом, изучение филогенетического и функционального разнообразия сообществ сульфатредуцирующих бактерий в кислород-содержащей (подповерхностные воды и зона хемоклина) водной толще Черного и Балтийского морей с использованием комплекса молекулярно-биологических, биохимических и традиционных микробиологических методов является весьма актуальной и интересной научной задачей

Цель и задачи исследования. Целью работы было изучение филогенетического разнообразия сообществ сульфатредуцирующих бактерий в кислород-содержащей (подповерхностные воды и зона хемоклина) водной толще Черного и Балтийского морей с использованием комплекса молекулярно-биологических, биогеохимических и традиционных микробиологических методов.

Для достижения поставленной цели решали следующие задачи:

1. Оценить с помощью стандартной и вложенной ПЦР с праймерами, специфичными на гены 16S рРНК, распространение ассоциированных с взвесью и свободноживущих сульфатредуцирующих бактерий (СРБ) шести основных филогенетических подгрупп в гидрохимически различающихся слоях кислород-содержащей водной толщи Черного и Балтийского морей.
2. Определить численность СРБ на различных горизонтах кислород-содержащей водной толщи Черного моря методами флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) и количественной ПЦР.
3. Получить с использованием денатурирующего градиентного гель-электрофореза (ДГГЭ) профили сообществ СРБ (по гену *dsrB*, кодирующему β -субъединицу диссимиляционной сульфитредуктазы) на различных глубинах кислород-содержащей водной толщи Черного и Балтийского морей, отсекав участки гена *dsrB*, выделенные и реамплифицированные из отдельных ДГГЭ-полос, и провести полный филогенетический анализ сообществ СРБ по гену *dsrB*.
4. Получить накопительные культуры СРБ из кислород-содержащей водной толщи Черного и Балтийского морей.
5. Дать полное описание чистой культуры СРБ, выделенной из фотической зоны Черного моря, и дать оценку её способности к росту и осуществлению процесса сульфатредукции в условиях кислородных стрессов.

Научная новизна работы. Впервые с помощью комплекса современных молекулярно-биологических методов детально изучен филогенетический состав сообществ СРБ в подповерхностной кислород-содержащей водной толще Черного и Балтийского морей. Обнаружены физиологически активные клетки СРБ в аэробных морских водах, а также подтверждено их присутствие в зоне хемоклина Черного моря. Получены накопительные и чистая культуры СРБ из аэробной водной толщи Черного моря. Впервые выделенная из аэробной водной толщи (глубина – 30 м) Черного моря чистая культура психрофильной сульфатредуцирующей бактерии полностью охарактеризована и описана как новый вид *Desulfofrigus euxinos*. Показано, что данная бактерия обладает относительной аэротолерантностью, сохраняя жизнеспособность при начальных концентрациях кислорода до 5,2% в газовой фазе над средой культивирования.

Практическая и теоретическая значимость работы. Теоретическая значимость работы заключается в получении уникальных данных о филогенетическом составе сообществ СРБ в кислород-содержащей водной толще Черного и Балтийского морей, а также о свойствах выделенной в чистую культуру черноморской СРБ. Полученные результаты дополняют накопленные к настоящему моменту знания о распространении сульфатредуцирующих бактерий в местообитаниях, подверженных воздействию кислорода, а также о составе микробных сообществ водной толщи исследуемых морей.

С практической точки зрения, полученные данные о биоразнообразии сульфатредуцирующих бактерий в морских аэробных водах могут служить основой для разработки новых способов борьбы с биокоррозией металлических конструкций в морских водоемах, а также учитываться при заводнении нефтяных пластов морской кислород-содержащей водой. Выделенная с глубины 70 м Черного моря накопительная культура, содержащая СРБ рода *Desulfosporosinus* и нуждающаяся для роста в присутствии бихромата калия в среде, потенциально может являться объектом для использования в биоремедиации различных соленых водных экосистем от загрязнений токсичными солями хрома.

Апробация работы. Результаты исследований были представлены на V, VI и VII молодежных школах-конференциях с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии» (Москва, 2009, 2010 и 2011 гг.), Всероссийском симпозиуме с международным участием «Автотрофные микроорганизмы» (Москва, 2010 г.), XVII, XVIII, XIX и XXI международных научных конференциях студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, 2010, 2011, 2012 и 2014 гг.), 3-м Байкальском микробиологическом симпозиуме с международным участием «Микроорганизмы и вирусы в водных экосистемах» (Иркутск, 2011 г.), 4-м и 6-м конгрессах европейских микробиологов FEMS (Швейцария, Нидерланды, 2011 и 2015 гг.), 16-й и 18-й международных Пущинских школах-конференциях молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2012 и 2014 гг.), Всероссийском симпозиуме «Современные проблемы физиологии, экологии и биотехнологии микроорганизмов» (Москва, 2014 г.), а также на заседании кафедры микробиологии биологического факультета МГУ (2015 г.)

Публикации. По теме диссертации опубликовано 17 работ, 3 из которых в журналах, рекомендованных ВАК. Кроме того, 2 работы находятся в печати.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения полученных результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитированной литературы, содержащего 231 литературный источник, из которых 207 англоязычных. Работа изложена на 178 страницах, содержит 24 рисунка и 17 таблиц.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследования были сообщества сульфатредуцирующих бактерий кислород-содержащих вод Черного и Балтийского морей.

Пробы воды с глубин от 30 до 200 м Черного моря отбирали в июле 2010 г. с борта НИС «Ашамба» на станции с глубиной 1300 м (N44°27'48", W37°52'92") с помощью батометров зондирующего комплекса типа «Rosette», оснащенного гидрофизическим зондом фирмы «Sea-Bird Electronics, Inc.» (США) с дополнительными датчиками содержания O₂, мутности и E_h. Пробы

воды с глубин от 0 до 110 м Гданьской впадины Балтийского моря в точке с координатами N54°51'36", W19°19'58,8" (станция № 22) отбирали аналогичным образом в июле 2011 г. с борта малого рыболовного траулера МРТК-1073.

При проведении метода FISH за основу брали стандартный протокол [Amann et al., 1992; Glockner et al., 1996; Pernthaler et al., 2002]. Применяли меченные цианином 3 зонды для идентификации представителей *Bacteria* [Amann et al., 1990], *Archaea* [Stahl et al., 1995] и более специфичные – для выявления подгрупп сульфатредуцирующих бактерий [Devereux et al., 1992; Manz et al., 1998; Hristova et al., 2000; Lückner et al., 2007]. Для поиска нужных зондов использовали также базу данных probeBase (<http://www.microbial-ecology.net/probebase>). Микроскопический анализ для подсчета клеток, гибридизовавшихся со специфическими зондами, проводили при увеличении $\times 1000$ на эпифлуоресцентном микроскопе Axio Imager.D1 («Carl Zeiss», Германия) с цифровой камерой Axio Cam HRC, светофильтром Zeiss 20 и компьютерным программным обеспечением Axio Vision.

Для выделения ДНК пробы воды (по 5 л) были последовательно профильтрованы через стекловолоконные крупнопористые (GF/C) и мембранные (диаметр пор 0,22 мкм, «Millipore», США) фильтры. Фильтры хранили в смеси буферный раствор TE (pH 8,0) : этанол (1 : 1) при 4 °С. ДНК с разрушенных в жидком азоте фильтров выделяли с использованием коммерческого набора Genomic DNA Purification Kit («Fermentas», Литва) в соответствии с протоколом производителя. ПЦР с праймерами рА-рН' на ген 16S рРНК *Bacteria*, а также с праймерами, специфичными к участку гена *dsrB* и участкам гена 16S рРНК шести основных филогенетических подгрупп СРБ, проводили по стандартным протоколам [Edwards et al., 1989; Daly et al., 2000; Geets et al., 2006].

Подсчет количества копий участка гена *dsrB* проводился методом количественной ПЦР с использованием красителя SYBR Green [Wittwer et al., 1997] на ДНК-амплификаторе Mini Opticon («Bio-Rad», США) с использованием пары праймеров DSRp2060F и DSR4R. Для построения калибровочной кривой использовали ДНК, выделенную из чистой культуры *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough ATCC 29579.

Денатурирующий градиентный гель-электрофорез (ДГГЭ) для разделения смеси продуктов ПЦР-амплификации с праймерами DSRp2060F (с прикрепленным к 5'-концу ГЦ-богатый участком) и DSR4R проводили по стандартному протоколу [Geets et al., 2006].

Секвенирование участков гена *dsrB*, выделенных и реамплифицированных из отдельных ДГГЭ-полос, с прямым (DSRp2060F) и обратным (DSR4R) праймерами к участку гена *dsrB* проводили на автоматическом четырехкапиллярном генетическом анализаторе ABI Prism 3130 («Applied Biosystems», США) по протоколу для полимера 3130 POP-6 («Applied Biosystems», США) на кафедре микробиологии биологического факультета МГУ и в Центре «Биоинженерия» РАН. Первичный анализ сходства полученных аминокислотных последовательностей, кодируемых геном *dsrB*, с известными последовательностями из базы данных GenBank проводили

с помощью программного пакета BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Филогенетические дендрограммы строили по методу ближайших соседей (neighbour-joining), реализованному в пакете программ TREECONW, используя референтные последовательности из GenBank.

Для культивирования СРБ использовали жидкую питательную среду Видделя для морских форм сульфатредуцирующих бактерий [Widdel et al., 1992] с добавлением микроэлементов [Pfennig, Lippert, 1966], витаминов [Widdel et al., 1981] и других растворов, состав которых приведен в полном тексте кандидатской диссертации. Для приготовления сред использовали модифицированную анаэробную технику Хангейта [Hungate, 1969]. Пробирки с накопительными культурами инкубировали при 22-23 °С в течение 7-21 сут. Для выделения чистых культур СРБ из накопительных использовали метод предельных разведений в полужидкой агаризованной питательной среде.

Микроскопию препаратов культуры *Desulfofrigus* sp. осуществляли на фазово-контрастном микроскопе Olympus BX41 («Olympus», Япония) при увеличении $\times 1000$ с цифровой камерой Olympus C-7070 («Olympus», Япония) и компьютерным программным обеспечением Imagescope Lite («Системы для микроскопии и анализа», Россия). Исследование тонких структур клеток *Desulfofrigus* sp. проводили с помощью трансмиссионного электронного микроскопа JEM-100CX («Jeol», Япония).

Сероводород в растущих культурах сульфатредуцирующих бактерий определяли колориметрическим методом путем специального окрашивания проб из культур N,N-диметил-*n*-фенилендиамином и железоаммонийными квасцами с последующим определением интенсивности окраски растворов на спектрофотометре [Trüper et al., 1964]. Измерение скоростей процесса сульфатредукции в пробах морской воды и культурах *Desulfofrigus* sp. проводили радиоизотопным методом с использованием $^{35}\text{S-SO}_4^{2-}$ по методике, подробно описанной ранее [Пименов и др., 2000].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сообщества сульфатредуцирующих бактерий в подповерхностных кислородсодержащих водах Черного моря.

1. Содержание кислорода, сероводорода и интенсивность сульфатредукции в верхней водной толще Черного моря. Максимальная концентрация O_2 на станции с координатами 44°.458N, 37°.882E (максимальная глубина 1300 м) наблюдалась на глубине около 30 м и составляла 300 мкМ. Ниже этой глубины содержание кислорода в воде постепенно снижалось до 200 мкМ (на глубине 80 м), а затем происходило резкое уменьшение его концентрации до 70 мкМ на глубине 100 м, что характерно для верхней части зоны хемоклина (рис. 1а). С дальнейшим увеличением глубины концентрация кислорода продолжала снижаться, и ниже 160 м он уже не обнаруживался методом Винклера.

Первые следы присутствия сероводорода появлялись на глубине 153 м (1,2 мкМ), соответствующей нижней границе хемоклина. С увеличением глубины наблюдалось увеличение содержания сероводорода, и на глубине 191 м его концентрация равнялась 11,82 мкМ (рис. 1а).

Аналогично предыдущим исследованиям [Пименов и др., 2000] в анаэробных водах на глубинах 190-400 м мы наблюдали повышенные скорости сульфатредукции – около 0,8 мкмоль/(л × сутки). Однако отдельные максимумы скоростей сульфатредукции были обнаружены не только в верхней части хемоклина на глубине 150 м (1,06 мкмоль/(л × сутки)), где концентрация растворенного O₂ низка, но также и в аэробной зоне на глубине 100-110 м (0,76-1,01 мкмоль/(л × сутки)) и даже в подповерхностном слое воды (рис. 1б).

В связи с обнаружением процесса сульфидогенеза в аэробных водах и зоне хемоклина нами было сделано предположение о присутствии на данных горизонтах метаболически активных сульфатредуцирующих бактерий.

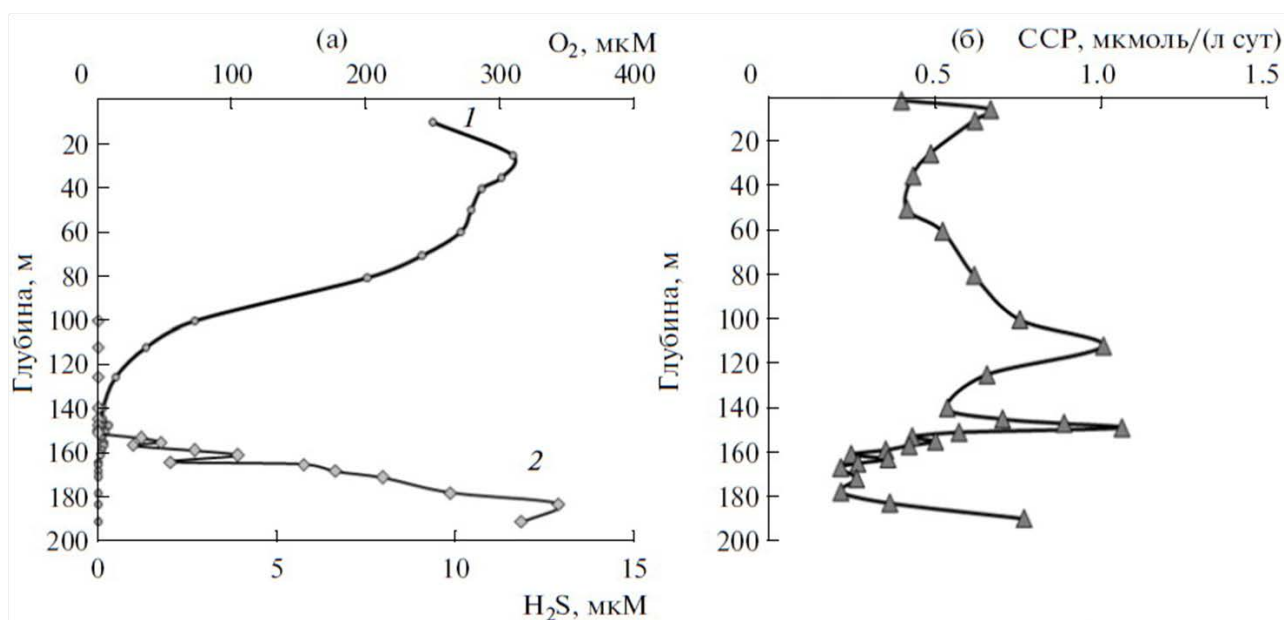


Рис. 1. Содержание O₂, H₂S и скорость сульфатредукции в водной толще глубоководной зоны Черного моря в районе г. Геленджик (44°.458N, 37°.882E, глубина 1300 м): **а** – содержание кислорода (1) и сероводорода (2) в подповерхностной водной толще; **б** – профиль скорости сульфатредукции (ССР) в подповерхностной водной толще (0-200 м) [Брюханов и др., 2011].

2. Исследование сообществ СРБ в верхних водных горизонтах Черного моря методом флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH). Общая численность клеток микроорганизмов, определенная окрашиванием с флуоресцентным ДНК-специфичным красителем 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (ДАФИ), в водной толще Черного моря постепенно увеличивалась от подповерхностных аэробных вод к зоне хемоклина, достигая наибольших значений в верхних горизонтах анаэробных вод (глубина 210 м; $1,60 \times 10^6$ кл./мл). Доля бактерий постепенно снижалась от 75% от общего числа микробных клеток в аэробных водах до 40% в зоне хемоклина (рис. 2). Доля архей при этом возрастала от 11,6 до 47% от всех клеток. На глубине 600 м

(бескислородная водная толща) наблюдалось снижение общей численности микроорганизмов по сравнению с зоной хемоклина ($2,58 \times 10^5$ кл./мл). При этом большую часть всех метаболически активных прокариотических клеток составляли бактерии (34%), а доля архей была незначительна (1,5%).

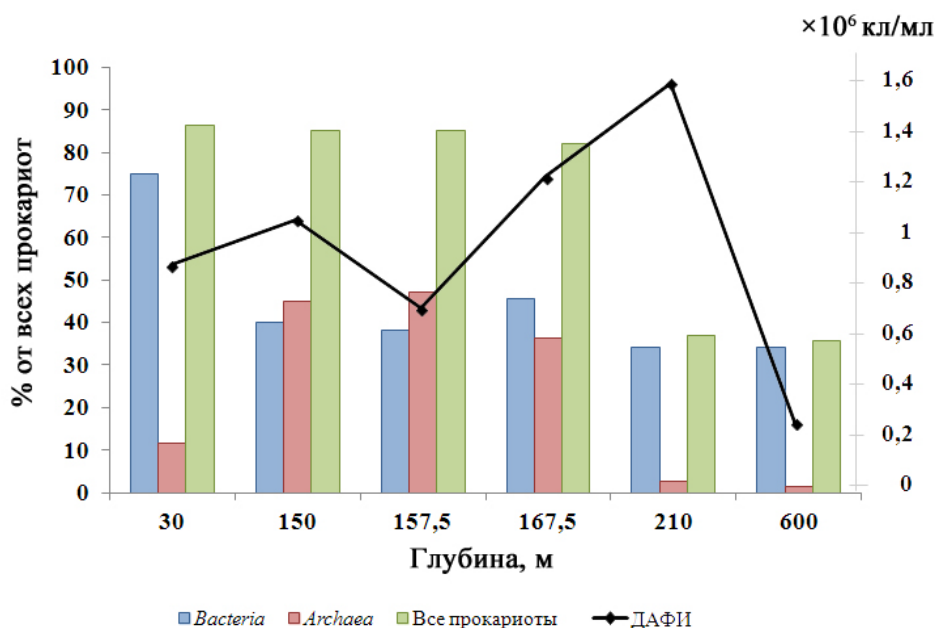


Рис. 2. Распределение прокариот в водной толще континентального склона Черного моря, определенное с помощью FISH

Методом FISH на глубине 30 м в аэробной зоне континентального склона Черного моря (содержание O_2 – 300 мкМ) было обнаружено большое количество клеток СРБ родов *Desulfotomaculum* (22,8% от общей численности микроорганизмов) и *Desulfovibrio* (36%), а также около 5% *Desulfobacter* spp. (табл. 1).

В зоне хемоклина доминирующей филогенетической подгруппой СРБ, выявляемой с помощью FISH-зондов, являлись представители рода *Desulfomicrobium*, доля которых составляла от 9,3 до 13,4% от общей численности микроорганизмов (табл. 1). В кислород-содержащих подповерхностных водах, а также в бескислородных глубинных водах, клетки *Desulfomicrobium* spp. практически не обнаруживались. Также в зоне хемоклина были детектированы представители рода *Desulfovibrio* в количестве от 2,7% до 3,9% от общей численности микроорганизмов (табл. 1).

На глубине 600 м наблюдались только сигналы для зондов, специфичных к 16S рРНК СРБ родов *Desulfomicrobium* и *Desulfovibrio*.

3. Численность СРБ в подповерхностной водной толще Черного моря. По результатам анализа сообществ микроорганизмов Черного моря методом количественной ПЦР доля СРБ от всех микроорганизмов составляла от 0,065% в аэробной водной толще до 9% в верхней части анаэробных вод (табл. 2). Доля СРБ постепенно увеличивалась с глубиной с локальным пиком (0,78%) в зоне хемоклина на глубине 150 м. Абсолютная численность СРБ составляла $0,17-15,66 \times$

10^3 кл./мл, постепенно увеличиваясь от поверхности к анаэробным водам. Однако на глубине 110 м численность СРБ была практически равна таковой в подповерхностных водах ($0,18 \times 10^3$ кл./мл). Это объясняется тем, что на глубине 110 м находится холодный промежуточный слой (ХПС), характеризующийся понижением общего числа клеток.

Таблица 1.

Распределение сульфатредуцирующих бактерий в водной толще континентального склона Черного моря, определенное с помощью FISH

Зонд	Количество клеток в 1 мл пробы					
	30 м, аэробная зона	150 м, зона хемоклина	157,5 м, зона хемоклина	167,5 м, анаэробная зона	210 м, анаэробная зона	600 м, анаэробная зона
ДАФИ	$8,82 \times 10^5$	$1,06 \times 10^6$	$7,11 \times 10^5$	$1,23 \times 10^6$	$1,60 \times 10^6$	$2,58 \times 10^5$
<i>Bacteria</i>	$6,60 \times 10^5$ (74,8%)	$4,24 \times 10^5$ (40,0%)	$2,72 \times 10^5$ (38,2%)	$5,62 \times 10^5$ (45,7%)	$5,49 \times 10^5$ (34,3%)	$8,80 \times 10^4$ (34,1%)
<i>Archaea</i>	$1,02 \times 10^5$ (11,6%)	$4,77 \times 10^5$ (45,0%)	$3,35 \times 10^5$ (47,1%)	$4,47 \times 10^5$ (36,3%)	$4,43 \times 10^4$ (2,8%)	$3,87 \times 10^3$ (1,5%)
Большинство <i>Desulfobacter</i>	$4,40 \times 10^4$ (5%)	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
Большинство <i>Desulfomicrobium</i>	н.о.	$1,42 \times 10^5$ (13,4%)	$6,60 \times 10^4$ (9,3%)	н.о.	$4,04 \times 10^3$ (0,25%)	$2,40 \times 10^3$ (0,9%)
Некоторые <i>Desulfovibrio</i>	$1,95 \times 10^5$ (22,1%)	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
Некоторые <i>Desulfovibrio</i>	$1,23 \times 10^5$ (13,9%)	$4,10 \times 10^4$ (3,9%)	$1,91 \times 10^4$ (2,7%)	$2,58 \times 10^4$ (2,1%)	$4,01 \times 10^3$ (0,25%)	$3,3 \times 10^3$ (1,3%)
<i>Desulfotomaculum</i> (кластер I)	$2,01 \times 10^5$ (22,8%)	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.

Примечания: 1) н.о. – практически не обнаружены или единичные клетки; 2) процентное соотношение для всех групп микроорганизмов приводится относительно общего количества клеток микроорганизмов, окрашенных ДАФИ.

Таблица 2.

Численность сульфатредуцирующих бактерий в верхней водной толще Черного моря, определенная методом количественной ПЦР.

Глубина, м	Численность СРБ, кл./мл	% СРБ от всех микроорганизмов
30	$0,17 \times 10^3$	0,065
50	$0,413 \times 10^3$	0,125
110	$0,182 \times 10^3$	0,13
150	$0,585 \times 10^3$	0,78
170	1×10^3	0,48
200	$15,66 \times 10^3$	9

Как видно из таблиц 1 и 2, для аэробных вод и зоны хемоклина метод FISH дает значительно более высокие численности СРБ, чем метод количественной ПЦР в реальном времени. Вероятно, это связано с использованием нескольких родоспецифичных зондов и ошибками, возникающими, во-первых, из-за частичного перекрытия специфичности некоторых

зондов между собой, а во-вторых, из-за возможной неспецифической адсорбции их на поверхности клеток нецелевых микроорганизмов. Кроме того, существуют определенные ограничения по использованию метода FISH для обнаружения морских прокариот в зависимости от их метаболической активности. Аналогичная картина наблюдалась и в других работах при сравнении численностей СРБ, определенных методами FISH и количественной ПЦР [Durisch-Kaiser et al., 2005; Lin et al., 2006; Neretin et al., 2007]. Таким образом, метод FISH больше подходит для определения качественного, а не количественного состава нативных сообществ микроорганизмов.

4. Обнаружение СРБ в пробах воды из подповерхностной водной толщи Черного моря с помощью ПЦР-анализа генов 16S рРНК и *dsrB*. Для подтверждения результатов, полученных методом FISH, нами было проведено исследование филогенетического состава сообществ СРБ на разных глубинах подповерхностных кислород-содержащих вод Черного моря с помощью более чувствительного и достоверного метода полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Для отделения клеток СРБ, обитающих в крупных взвешенных частицах, от клеток свободноживущих СРБ, а также живущих в мелких взвешенных частицах и слизи, мы применяли последовательную двухстадийную фильтрацию отобранных водных проб (через крупнопористые стекловолоконные фильтры GF/C, задерживающие частицы размером $\geq 1,2$ мкм, и мембранные фильтры с размером пор 0,22 мкм).

ПЦР-анализ тотальной ДНК с праймерами, специфичными к гену *dsrB* (кодирующему β -субъединицу диссимиляционной сульфитредуктазы – ключевого фермента метаболизма сульфатредуцирующих микроорганизмов), показал присутствие генетического материала СРБ на всех исследованных глубинах – от 30 до 200 м.

Таблица 3.

Результаты анализа филогенетического разнообразия сульфатредуцирующих бактерий в водной толще Черного моря из отфильтрованных через мембранные фильтры проб с использованием вложенной ПЦР (для гена 16S рРНК основных подгрупп СРБ).

Специфичность ПЦР-праймеров	Глубина, м					
	30	100	145	165	180	200
Ген <i>dsrB</i>	+	+	+	+	+	+
Ген 16S рРНК <i>Desulfotomaculum</i>	+	+	+	-	+	+
Ген 16S рРНК <i>Desulfobulbus</i>	-	-	-	-	-	-
Ген 16S рРНК <i>Desulfobacterium</i>	-	-	-	-	-	-
Ген 16S рРНК <i>Desulfobacter</i>	+	-	-	-	-	+
Ген 16S рРНК <i>Desulfococcus-Desulfonema-Desulfosarcina</i>	+	+	+	+	+	+
Ген 16S рРНК <i>Desulfovibrio-Desulfomicrobium</i>	+	+	+	+	+	+

В нашей работе было подтверждено, что для изучения сообществ морских СРБ метод вложенной ПЦР (nested PCR) является более чувствительным, чем метод прямой ПЦР [Daly et al., 2000]. С использованием вложенной ПЦР было показано присутствие участков гена 16S рРНК

представителей подгрупп *Desulfococcus-Desulfonema-Desulfosarcina* и *Desulfovibrio-Desulfomicrobium* на всех исследованных глубинах верхней водной толщи Черного моря, а также присутствие генетического материала *Desulfotomaculum* spp. на всех глубинах (за исключением 165 м – верхней анаэробной зоны), и *Desulfobacter* spp. в подповерхностных аэробных (глубина 30 м) и анаэробных водах (глубина 200 м). Гены 16S рРНК представителей родов *Desulfobulbus* и *Desulfobacterium* не были обнаружены ни на одном из исследованных горизонтов верхней водной толщи Черного моря.

Результаты ПЦР-анализа сообществ СРБ кислород-содержащей водной толщи Черного моря достаточно хорошо коррелируют с данными по филогенетическому разнообразию, полученными нами при применении метода FISH. С помощью последнего было показано присутствие в подповерхностных водах (глубина 30 м) представителей родов *Desulfotomaculum* и *Desulfobacter*, участки генов 16S рРНК этих подгрупп СРБ были также детектированы на данной глубине с помощью метода ПЦР. Кроме того, суммарно клетки *Desulfomicrobium* spp. и *Desulfovibrio* spp. были представлены на всех горизонтах кислород-содержащей водной толщи Черного моря, и при ПЦР-анализе участки гена 16S рРНК 6-й подгруппы СРБ (*Desulfovibrio-Desulfomicrobium*) были обнаружены также на всех этих исследуемых глубинах.

В свою очередь, с помощью вложенной ПЦР было показано присутствие генетического материала СРБ, принадлежащих к роду *Desulfotomaculum*, не только в аэробной зоне (на глубине 30 м), но и практически по всей исследованной верхней водной толще Черного моря (за исключением глубины 165 м). Участки гена 16S рРНК бактерий, принадлежащих к роду *Desulfobacter*, также, согласно данным ПЦР-анализа, встречались не только в аэробных, но и в верхних анаэробных водах (200 м). Эти данные не противоречат друг другу, так как FISH позволяет обнаружить только физиологически активные клетки, в то время как ПЦР выявляет просто целевые участки ДНК, которые могли принадлежать покоящимся или неактивным в неблагоприятных условиях клеткам.

5. Получение ДГГЭ-профилей участков гена *dsrB*, амплифицированных с использованием в качестве ПЦР-матрицы тотальной ДНК из водных проб Черного моря. Секвенирование и филогенетический анализ последовательностей участков гена *dsrB*, выделенных и реамплифицированных из отдельных ДГГЭ-полос. По гену *dsrB* были получены ДГГЭ-профили сообществ СРБ верхней водной толщи Черного моря с шести исследуемых глубин (30, 100, 145, 165, 180 и 200 м). Всего были определены 32 нуклеотидные последовательности участков гена *dsrB*, депонированные в GenBank под номерами JX181944-JX181975.

Согласно сравнению транслированных аминокислотных последовательностей, кодируемых геном *dsrB*, СРБ из верхней водной толщи Черного моря были представлены 5 отдельными кластерами (рис. 3).

Большая часть кодируемых геном *dsrB* аминокислотных последовательностей со всех глубин подповерхностной водной толщи Черного моря формировала отдельный кластер на филогенетической дендрограмме, для которого в базе данных GenBank не было обнаружено аналогичных последовательностей (с гомологией 87% и выше) ни среди описанных видов СРБ, ни среди некультивируемых СРБ из разных местообитаний. Наиболее близкой к этому кластеру (с гомологией 85%) оказалась некультивируемая СРБ из покмарка Норвежского моря [Lazar et al., 2011].

Два кластера по гену *dsrB*, не содержащих культивируемых СРБ, включали в себя черноморских СРБ из кислород-содержащих подповерхностных вод (30 м), холодного промежуточного слоя (100 м), верхней зоны хемоклина (145 м) и верхней анаэробной водной толщи (200 м). Наиболее близкой по гомологии к этому кластеру оказалась некультивируемая СРБ из глубоководных осадков Нанкайского желоба [Kaneko et al., 2007].

Некультивируемые представители рода *Desulfobulbus*, участки гена *dsrB* которых были обнаружены только в холодном промежуточном слое (100 м) и зоне хемоклина (145-185 м), могут участвовать в процессе анаэробного окисления метана в бескислородной водной толще [Lösekann et al., 2007].

Кластер из двух аминокислотных последовательностей (с глубин 30 и 200 м) имел наибольшую гомологию с некультивируемыми СРБ, обнаруженными при изучении процесса биокоррозии стальных конструкций на Атлантическом побережье Франции (неопубликованные данные) и, предположительно, принадлежащими к семейству *Desulfobacteraceae*, в частности, филогенетически близких к *Desulfobacula toluolica*.

Анализ транслированных аминокислотных последовательностей, кодируемых геном *dsrB*, показал присутствие в аэробных водах и в зоне хемоклина Черного моря сульфатредуцирующих бактерий, наиболее близких к некультивируемым представителям рода *Desulfobulbus*, которые не были обнаружены методом ПЦР с праймерами на 16S рРНК *Desulfobulbus* spp. Однако необходимо также учитывать и определенные ограничения по достаточно широкому применению гена *dsrB* для построения филогенетических дендрограмм из-за его возможного латерального переноса [Dar et al., 2007].

6. Накопительная культура СРБ, выделенная с глубины 70 м аэробной зоны водной толщи Черного моря. С помощью метода молекулярного клонирования участков гена 16S рРНК с последующим их секвенированием было показано, что в накопительной культуре СРБ, выделенной из Черного моря с глубины 70 м, присутствовали сульфатредуцирующие бактерии рода *Desulfosporosinus* (93-97% гомологии с *Desulfosporosinus lacus*), а также облигатно анаэробные бактерии родов *Anaerobranca* (91,5-91,8% гомологии с *Anaerobranca gottschalkii*) и *Natronincola* (91-93% гомологии). Представители рода *Desulfosporosinus* известны как строго

анаэробные спорообразующие СРБ, выделенные к настоящему времени, в основном, из пресноводных анаэробных осадков, почв и осадков кислых сточных водоемов [Spring et al., 2006].

Данная накопительная культура представляет интерес тем, что растет на питательной среде, содержащей бихромат калия, что свидетельствует о ее потенциальной возможности быть хорошим

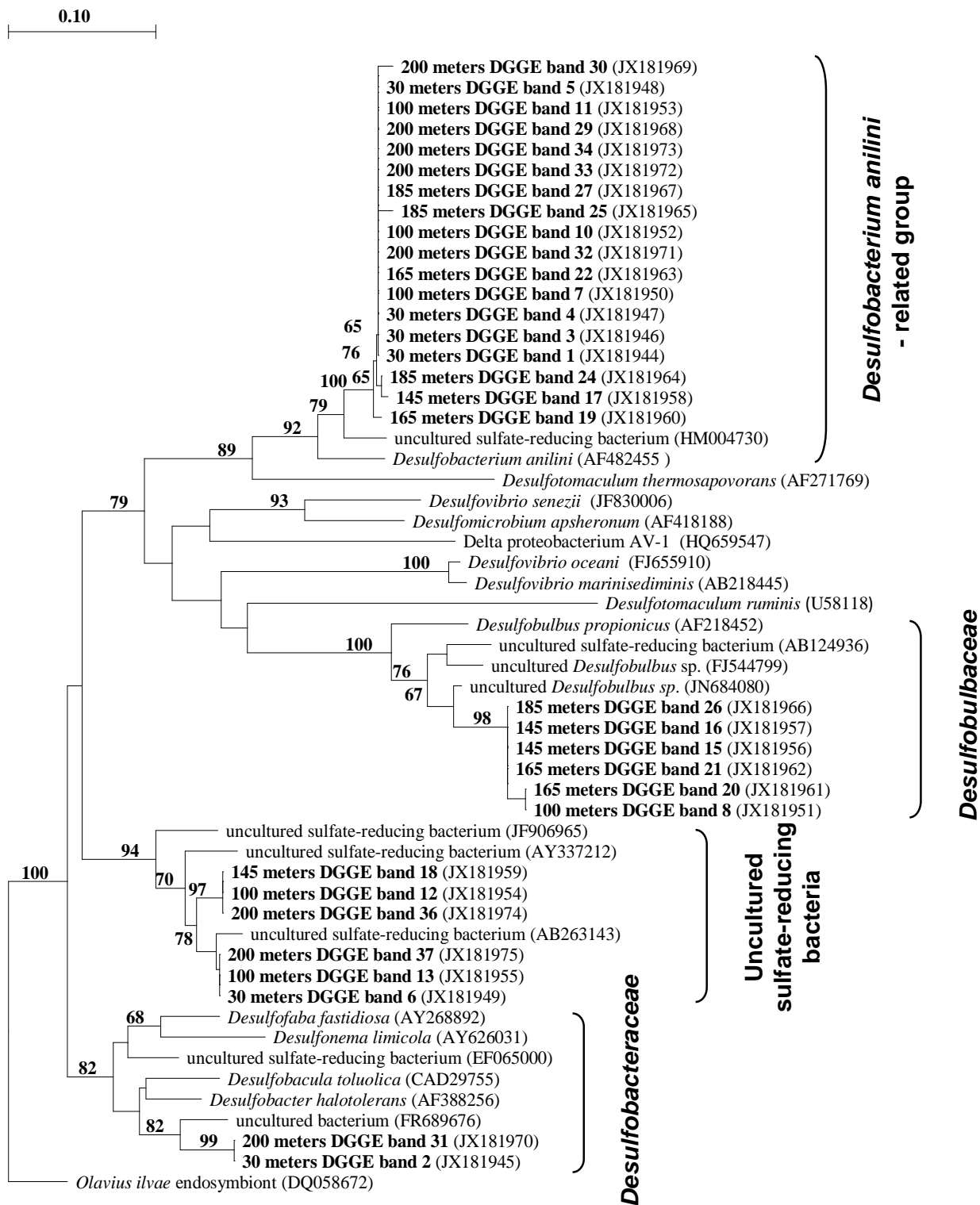


Рис. 3. Филогенетическая дендрограмма СРБ из подповерхностной водной толщи континентального склона Черного моря, построенная на основе сравнительного анализа аминокислотных последовательностей, кодируемых геном *dsrB*. Масштабная метка соответствует 10% расчетной дивергенции последовательностей.

микробиологическим объектом для биоремедиации сточных вод и почв от загрязнений токсичными солями хрома и других тяжелых металлов.

7. *Desulfofrigus euxinos* штамм SrB-30 – новый вид СРБ, выделенный из аэробных вод Черного моря. Из накопительной культуры, полученной с глубины 30 м континентального склона Черного моря, нами была выделена чистая культура СРБ, принадлежащая к роду *Desulfofrigus*. Наиболее близкой (гомология 99%) к отсекувенированному гену 16SpPHK (номер KP455293 в GenBank) оказалась последовательность гена 16S pPHK типового представителя данного рода – *Desulfofrigus fragile* штамм LSv21^T [Knoblauch et al., 1999], выделенного из морских арктических осадков вблизи архипелага Шпицберген. При этом уровень гомологии при проведении ДНК-ДНК гибридизации исследуемого штамма SrB-30 и типового штамма *D. fragile* LSv21^T составил всего 56%, что свидетельствует о принадлежности данных СРБ к разным видам [Wayne et al., 1987].

Электронно-микроскопические исследования показали, что штамм SrB-30 представлен граммотрицательными палочками с закругленными концами (размер 0,5-0,8 × 3,7-4,2 мкм). Спор обнаружено не было. Нуклеоид большого размера, занимает почти всё внутреннее пространство клетки. Вокруг клеток были видны остатки защитных капсул.

По морфологическим признакам, молярному содержанию ГЦ-пар в ДНК (52%), а также по отношению к температуре и рН, выделенная нами чистая культура была во многом схожа с типовым штаммом *D. fragile* LSv21^T [Knoblauch et al., 1999] (табл. 4). Однако штамм SrB-30 обладал значительно более широким спектром используемых доноров и акцепторов электронов, чем типовой штамм LSv21^T (табл. 5).

Различался также и состав жирных кислот в клетках выделенного нами в чистую культуру *Desulfofrigus* sp. штамм SrB-30 и типового штамма *D. fragile* LSv21^T. Две жирные кислоты – C_{16:0} и C_{16:1} w9c преобладали в составе клеток как *D. fragile* LSv21^T (21,7 и 30,6% соответственно), так и *Desulfofrigus* sp. SrB-30 (17,73 и 35,96% соответственно). Жирная кислота C_{18:1} w11c, обнаруживаемая в значительном количестве в клетках типового штамма LSv21^T (18,5%), у штамма SrB-30, выделенного нами из Черного моря, отсутствовала. В свою очередь, содержание жирной кислоты C_{14:0} (11,46%) в клетках штамма SrB-30 было в 2,3 раза больше, чем у типового штамма, а также в относительно большом количестве (8,82%) у SrB-30 была обнаружена жирная кислота C_{18:1} w7c, отсутствующая в клетках *D. fragile* LSv21^T.

На основании обнаруженных генетических и физиолого-биохимических отличий от типового штамма *D. fragile* LSv21^T впервые выделенный нами из кислород-содержащих вод

Черного моря штамм сульфатредуцирующей бактерии SrB-30 был отнесен к новому виду рода *Desulfofrigus* и депонирован под видовым названием *Desulfofrigus euxinos* штамм SrB-30 (от древнегреческого названия Черного моря *Eúxeinos Póntos*) в две международные коллекции микроорганизмов: DSMZ (Германия) и JCM (Япония).

Таблица 4.

Сравнение выделенной чистой культуры *Desulfofrigus* sp. штамм SrB-30 и типового штамма *Desulfofrigus fragile* LSv21^T по морфологическим признакам и отношению к физико-химическим параметрам культивирования.

Параметр	<i>Desulfofrigus</i> sp. штамм SrB-30	<i>D. fragile</i> штамм LSv21 ^T [Knoblauch et al., 1999]
Форма клеток	Палочки	Палочки
Размер клеток, мкм	0,5-0,8 × 3,7-4,2	0,8 × 3,2-4,2
Оптимум pH	7,2	7,0-7,4
Диапазон pH	6,6-7,8	-//-
Оптимум температур, °C	15-18	18
Диапазон температур, °C	4-26	-1,8-27

Таблица 5.

Рост *Desulfofrigus* sp. штамм SrB-30 при использовании различных доноров и акцепторов электронов, а также сбраживаемых субстратов, в сравнении с типовым штаммом рода *Desulfofrigus*.

Субстрат	<i>Desulfofrigus fragile</i> штамм LSv21 ^T [Knoblauch et al., 1999]	<i>Desulfofrigus</i> sp. штамм SrB-30	Субстрат	<i>Desulfofrigus fragile</i> штамм LSv21 ^T [Knoblauch et al., 1999]	<i>Desulfofrigus</i> sp. штамм SrB-30
Доноры электронов (мМ)			Доноры электронов (мМ)		
Формиат (20)	+	++	Глутарат (10)	-	-
Ацетат (10)	-	++	Бетаин (10)	-	±
Пропионат (15)	-	±	Хлорид холина (10)	-	+
Бутират (5)	+	+	L-пролин (10)	-	±
Валерат (5)	-	++	D-сорбитол (5)	-	±
Капроат (3)	++	++	D-маннитол (5)	-	+
Капрат (2)	++	+	Бензоат (1)	-	+
Пальмитат (2)	±	++	Глюкоза (5)	-	++
Лактат (10)	++	++	Фруктоза (5)	-	++
Пируват (10)	++	+	Акцепторы электронов (мМ)		
Малат (10)	++	+	Сульфат (28)	+	+
Сукцинат (10)	-	++	Тиосульфат (10)	-	±
Фумарат (10)	+	+	Сульфит (2)	-	++
Этанол (10)	++	++	Сера (3)	-	±
Пропанол (10)	++	++	Цитрат железа III (30)	+	-
Бутанол (10)	++	+	Оксигидроксид железа III (4)	-	-
Глицерол (10)	++	++	Нитрат (5)	-	+
Глицин (10)	-	±	Сбраживаемые субстраты (мМ)		
Аланин (10)	+	±	Пируват (10)	+	+
Серин (10)	+	+	Малат (10)	+	+

H ₂ /CO ₂ + ацетат (2)	–	+	Лактат (10)	–	+
Изовалерат (5)	–	–	Фумарат (10)	–	+
Метанол (10)	–	+			

Примечание: ++ очень хороший рост, + хороший рост, ± слабый рост, – отсутствие роста.
Серым цветом отмечены различия между штаммами в потребляемых субстратах.

8. Рост выделенной в чистую культуру СРБ *Desulfofrigus euxinos* штамм SrB-30 в присутствии различных концентраций кислорода.

Поскольку штамм SrB-30 был выделен с глубины 30 м континентального склона Черного моря, где концентрация растворенного кислорода достигает 300 мкМ, мы предположили, что данный штамм должен обладать определенной аэротолерантностью, а также, возможно, иметь эффективные системы защиты от окислительных стрессов. Воздействие кислорода на рост культуры *D. euxinos* штамм SrB-30 оценивали по влиянию различных начальных концентраций кислорода в газовой фазе на три показателя: число клеток в жидкой культуре, количество продуцируемого культурой сероводорода и скорость сульфатредукции.

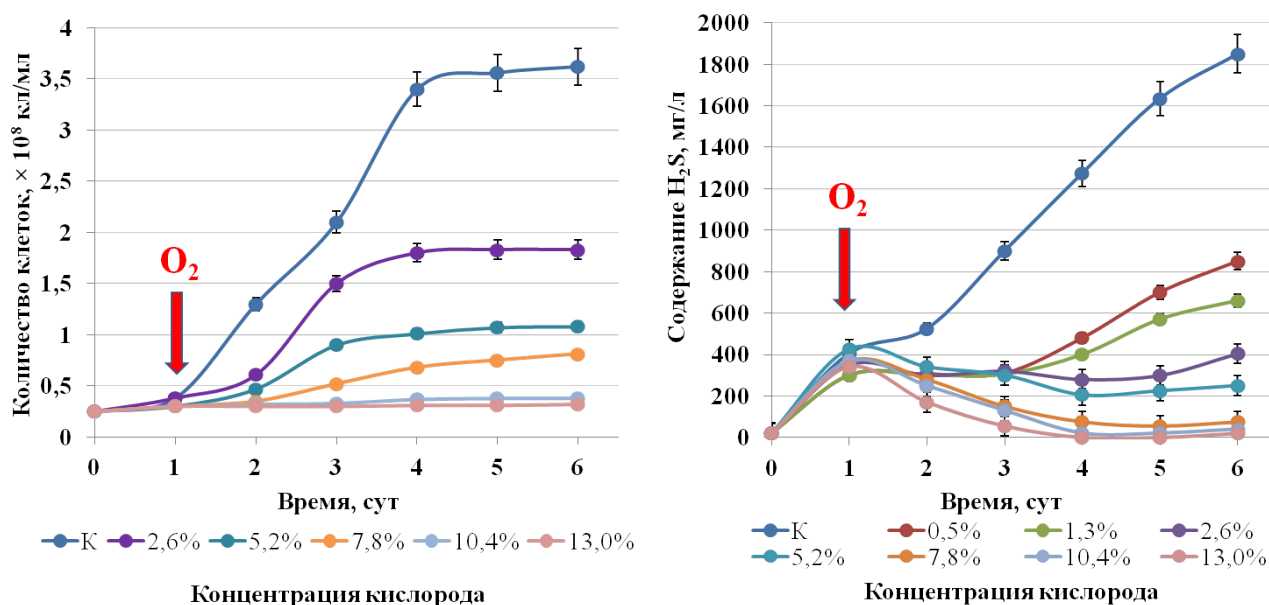


Рис. 4. Численность клеток и образование сероводорода в культурах *Desulfofrigus euxinos* штамм SrB-30 при росте в присутствии различных начальных концентраций кислорода в газовой фазе.

Внесение 0,5% и 1,3% кислорода в газовую фазу приводило к удлинению лаг-периода роста культуры до 3 сут и резкому, по сравнению с контролем (анаэробные условия культивирования), снижению образования сероводорода (более чем в 2 раза). Увеличение начальной концентрации кислорода в газовой фазе до 2,6% и 5,2% приводило к резкому снижению образования сероводорода более чем в 4 раза по сравнению с контролем, а количество клеток к концу экспоненциальной фазы роста (на 4-е сут) было в 2 и 3,4 раза ниже, чем в контроле, соответственно (рис. 4). При начальном содержании кислорода в газовой фазе 7,8% образование

культурой сероводорода полностью подавлялось, а количество клеток к концу экспоненциальной фазы роста (на 4-е сут) снижалось в 5 раз по сравнению с контролем. При более высоких начальных концентрациях кислорода в газовой фазе образование сероводорода и рост культуры отсутствовали. Также было показано, что при культивировании штамма SrB-30 с начальной концентрацией кислорода в газовой фазе 2,6% скорость сульфатредукции (ССР), измеренная радиоизотопным методом, практически не отличалась от таковой в контроле. Увеличение начальной концентрации кислорода в газовой фазе до 5,2% приводило к резкому снижению ССР – более чем в 4 раза по сравнению с контролем.

Сообщества сульфатредуцирующих бактерий в кислород-содержащих водах Гданьской впадины Балтийского моря.

9. Гидрохимические параметры вод Гданьской впадины Балтийского моря.

Анализ данных, полученных с помощью гидрофизического зонда, позволил выявить значительную неоднородность вод Гданьской впадины в период наших исследований (рис. 5). Содержание кислорода в интервале глубин 0-75 м составляло от 10,61 до 13,69 мл/л, а на глубине 80-90 м наблюдался хорошо выраженный оксиклин. На глубинах 97-100 м содержание кислорода снижалось до 0,05-0,22 мл/л, и появлялся свободный сероводород (0,79 мл/л на глубине 102 м).

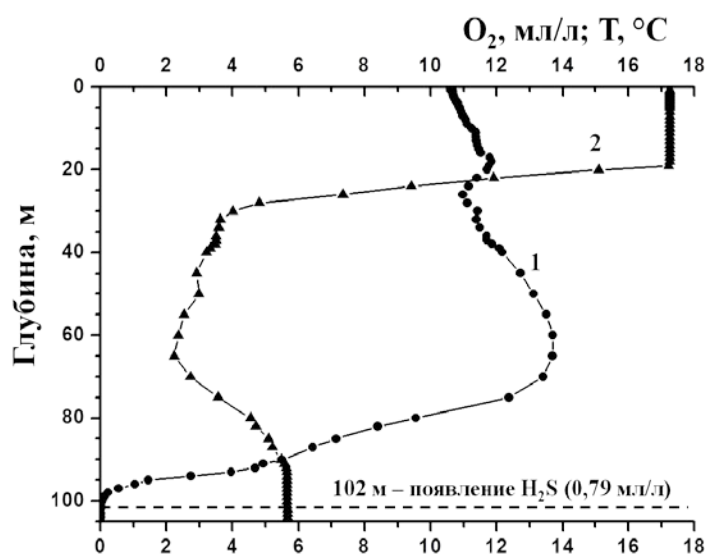


Рис. 5. Гидрохимические параметры водной толщи глубоководной зоны Гданьского залива Балтийского моря (станция № 22): содержание кислорода (1), температура (2).

10. Обнаружение СРБ в пробах воды из Гданьской впадины Балтийского моря с помощью ПЦР-анализа генов 16S рРНК и *dsrB*. По аналогии с исследованиями кислород-содержащих вод Черного моря вначале мы осуществляли двухстадийную фильтрацию проб

морской воды через крупнопористые фильтры GF/C, задерживающие частицы размером более 1,2 мкм, и мембранные фильтры с размером пор 0,22 мкм.

С помощью ПЦР было детектировано наличие гена *dsrB* в образцах ДНК, выделенных из водных проб со всех исследуемых глубин водной толщи Гданьской впадины Балтийского моря (табл. 6). Вложенной ПЦР было показано присутствие участков гена 16S рРНК, специфических для представителей подгрупп *Desulfococcus-Desulfonema-Desulfosarcina* и *Desulfovibrio-Desulfomicrobium*, на всех исследованных глубинах верхней водной толщи Гданьской впадины Балтийского моря, а также присутствие генетического материала *Desulfotomaculum* spp. на всех глубинах, за исключением придонного слоя (107 м). Генетический материал *Desulfobacter* spp. был обнаружен только в верхних аэробных водах (0-30 м). Гены 16S рРНК представителей родов *Desulfobulbus* и *Desulfobacterium* не были обнаружены ни на одном из исследованных горизонтов водной толщи Гданьской впадины Балтийского моря.

Таблица 6.

Результаты анализа филогенетического разнообразия сульфатредуцирующих бактерий в водной толще Гданьской впадины Балтийского моря из отфильтрованных через мембранные фильтры проб с использованием вложенной ПЦР (для гена 16S рРНК основных подгрупп СРБ).

Специфичность ПЦР-праймеров	Глубина, м						
	0	10	30	50	80	102	107
Ген <i>dsrB</i>	+	+	+	+	+	+	+
Ген 16S рРНК <i>Desulfotomaculum</i>	+	+	+	+	+	+	-
Ген 16S рРНК <i>Desulfobulbus</i>	-	-	-	-	-	-	-
Ген 16S рРНК <i>Desulfobacterium</i>	-	-	-	-	-	-	-
Ген 16S рРНК <i>Desulfobacter</i>	+	+	+	-	-	-	-
Ген 16S рРНК <i>Desulfococcus-Desulfonema-Desulfosarcina</i>	+	+	+	+	+	+	+
Ген 16S рРНК <i>Desulfovibrio-Desulfomicrobium</i>	+	+	+	+	+	+	+

11. Получение ДГГЭ-профилей участков гена *dsrB*, амплифицированных с использованием в качестве ПЦР-матрицы тотальной ДНК из водных проб Гданьской впадины. Секвенирование и филогенетический анализ последовательностей участков гена *dsrB*, выделенных и реамплифицированных из отдельных ДГГЭ-полос.

По гену *dsrB* были получены ДГГЭ-профили сообществ СРБ Гданьской впадины Балтийского моря с пяти исследуемых глубин (0, 10, 30, 70 и 110 м). Всего была определена 21 нуклеотидная последовательность участков гена *dsrB*, которые были депонированы в GenBank под номерами KJ796659-KJ796679.

Анализ транслированных аминокислотных последовательностей участков гена *dsrB* из водных проб с различных глубин Гданьской впадины Балтийского моря показал, что на всех исследуемых горизонтах (кислород-содержащие подповерхностные воды, зона хемоклина и придонные воды, содержащие H₂S) присутствовали участки гена *dsrB*, наиболее сходные (87-95%

гомологии) с последовательностями участков гена *dsrB* некультивируемых СРБ из Арктических морских осадков в районе Шпицбергена, несультридогенных тропических подвижных грязей, осадков в устье р. Янцзы и биопленок холодных сипов центральной части Красного моря. Также для некоторых последовательностей отмечался аналогичный уровень гомологии с транслированными участками гена *dsrB* морских коррозионно-активных некультивируемых СРБ (сиквенсы с глубин 0, 10 и 70 м), некультивируемых СРБ из морских осадков моря Яцусиро (сиквенсы с глубин 10, 30, 70 и 110 м), глубоководных осадков Нанкайского желоба (сиквенсы с глубин 30 и 70 м), из зоны кислородного минимума осадков Аравийского моря (сиквенсы с глубин 30, 70 и 110 м) и водной толщи Черного моря вблизи г. Геленджик (сиквенсы с глубин 70 и 110 м). В то же время, на всех исследованных глубинах были обнаружены составляющие отдельную ветвь на филогенетической дендрограмме аминокислотные последовательности, кодируемые геном *dsrB*, для которых в базе данных GenBank не было обнаружено аналогичных последовательностей (с гомологией не ниже 87%) ни среди описанных видов СРБ, ни среди некультивируемых СРБ из разных местообитаний.

12. Получение накопительных культур СРБ из водной толщи Гданьской впадины Балтийского моря. Помимо изучения нативного состава сообществ СРБ в Гданьской впадине Балтийского моря молекулярно-биологическими методами, нами также были проведены эксперименты по получению накопительных культур СРБ из водной толщи Гданьской впадины. Были получены накопительные культуры с глубин 30 (кислород-содержащие воды), 102 и 107 м (бескислородные воды), сохраняющие активность в течение нескольких пересевов, что свидетельствует о том, что в водной толще Гданьской впадины Балтийского моря присутствует не только генетический материал, но и живые клетки сульфатредуцирующих бактерий.

По результатам ПЦР-анализа сообщества СРБ кислород-содержащей водной толщи обоих морских водоемов с меромиктическими условиями оказались достаточно схожи. Участки генов, кодирующих β -субъединицу диссимиляционной сульфитредуктазы и 16S рРНК *Desulfococcus-Desulfonema-Desulfosarcina* и *Desulfovibrio-Desulfomicrobium*, были обнаружены в Черном и Балтийском морях на всех исследованных глубинах. Участки гена 16S рРНК представителей рода *Desulfotomaculum* присутствовали во всех гидрохимически различающихся слоях как Черного, так и Балтийского морей, однако в Черном море они не были обнаружены в середине зоны хемоклина (глубина – 165 м), а в Гданьской впадине Балтийского моря – в придонном слое (глубина – 107 м). Генетический материал СРБ рода *Desulfobacter* в обеих экосистемах был детектирован в подповерхностных кислород-содержащих горизонтах, а в зоне хемоклина отсутствовал. При этом в Черном море, в отличие от Балтийского, последовательности гена 16S рРНК, специфичные для *Desulfobacter* spp., также были обнаружены и в верхних горизонтах анаэробных вод (на глубине 200 м).

Анализ транслированных аминокислотных последовательностей участков гена *dsrB* показал, что в обоих исследованных морях с меромиктическими условиями обитают СРБ, сходные с СРБ из различных морских экосистем, зачастую значительно удаленных как от Черного, так и от Балтийского морей, а также уникальные СРБ, для которых на данный момент не удается обнаружить сходных последовательностей гена *dsrB* в базе данных GenBank. Кроме того, несколько транслированных аминокислотных последовательностей из обоих морей имели высокий уровень гомологии между собой, что может означать, что там обитают филогенетически близкие друг другу СРБ.

Заключение.

В настоящей работе впервые было детально изучено филогенетическое разнообразие сульфатредуцирующих бактерий в подповерхностной кислород-содержащей водной толще Черного и Балтийского морей. В исследованиях были использованы как традиционные микробиологические методы, основанные на выделении микроорганизмов, их культивировании в различных условиях и описании морфологии клеток, так и современные молекулярно-биологические методы анализа микробных сообществ (флуоресцентная *in situ* гибридизация, вложенная и количественная ПЦР, денатурирующий градиентный гель-электрофорез с последующим секвенированием выделенных и реамплифицированных участков ДНК), что позволило получить всестороннюю характеристику сообществ СРБ в гидрохимически различающихся слоях меромиктических зон обоих морей.

Методом ПЦР было показано присутствие генетического материала СРБ четырех основных филогенетических подгрупп (*Desulfotomaculum*, *Desulfobacter*, *Desulfococcus-Desulfonema-Desulfosarcina* и *Desulfovibrio-Desulfomicrobium*) на различных глубинах кислород-содержащей подповерхностной водной толщи Черного моря и Гданьской впадины Балтийского моря. Результаты анализа транслированных аминокислотных последовательностей гена *dsrB*, кодирующего ключевой фермент сульфатредуцирующих микроорганизмов – диссимиляционную сульфитредуктазу, свидетельствуют о том, что большинство СРБ в исследуемых меромиктических экосистемах наиболее сходны с некультивируемыми и неописанными к настоящему времени микроорганизмами, что представляет большой потенциал в плане выделения новых чистых культур аэротолерантных сульфатредуцирующих бактерий из обоих морей.

Получение активных накопительных культур СРБ из кислород-содержащих вод Черного и Балтийского морей свидетельствует о присутствии там не только генетического материала, но и потенциально метаболически активных клеток СРБ, осуществляющих процесс сульфатредукции. А способность впервые выделенной нами из аэробных вод Черного моря чистой культуры СРБ, описанной и депонированной как новый вид рода *Desulfofrigus* (*Desulfofrigus euxinos* штамм SrB-30), выдерживать кислородные стрессы свидетельствует о её приспособленности к обитаниям в условиях, подвергающихся воздействию кислорода.

Учитывая, что в обеих меромиктических экосистемах вертикальная циркуляция вод затруднена вследствие существования постоянных гало- и пикноклинов, суммируя полученные в данной работе результаты, можно заключить, что в кислород-содержащей водной толще и зоне хемоклина Черного моря и Гданьской впадины Балтийского моря существуют сложившиеся сообщества СРБ, приспособленные к существованию в микроаэробных условиях.

Выводы.

1. Методом прямой и вложенной ПЦР в подповерхностных кислород-содержащих водах и в зоне хемоклина Черного и Балтийского морей (Гданьская впадина) обнаружены участки генов 16S рРНК сульфатредуцирующих бактерий, принадлежащих к филогенетическим подгруппам *Desulfotomaculum*, *Desulfococcus-Desulfonema-Desulfosarcina*, *Desulfovibrio-Desulfomicrobium* и *Desulfobacter*.

2. Доля СРБ в подповерхностной водной толще Черного моря составляет от 0,065 до 9% от числа клеток всех микроорганизмов.

3. По транслированным аминокислотным последовательностям гена *dsrB* сульфатредуцирующие бактерии, обитающие в подповерхностных водах и в зоне хемоклина Черного и Балтийского морей, имеют наибольшую гомологию с некультивируемыми СРБ из различных морских местообитаний. Кроме того, на каждой исследованной глубине в обеих меромиктических экосистемах были также обнаружены последовательности гена *dsrB*, не имевшие высокой гомологии с известными последовательностями гена *dsrB* из GenBank.

4. Из подповерхностной аэробной водной толщи и зоны хемоклина Черного моря, а также из кислород-содержащих вод Гданьской впадины Балтийского моря, были выделены активные накопительные культуры СРБ, что свидетельствует о присутствии на исследованных водных горизонтах обоих морей жизнеспособных клеток сульфатредуцирующих бактерий.

5. Впервые выделенная из кислород-содержащих подповерхностных вод Черного моря чистая культура СРБ была полностью охарактеризована и описана как новый вид *Desulfofrigus euxinos* штамм SrB-30. Клетки *D. euxinos* SrB-30 обладают относительной аэротолерантностью и способны расти и осуществлять процесс сульфатредукции при начальных концентрациях кислорода в газовой фазе до 8%.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК:

1. Корнеева В.А., Пименов Н.В., Крек А.В., Турова Т.П., Брюханов А.Л. Сообщества сульфатредуцирующих бактерий в водной толще Гданьской впадины Балтийского моря. // Микробиология. – 2015. – Т.84(2). – С.250-260.
2. Захарова Е.Е., Корнеева В.А., Брюханов А.Л., Пименов Н.В.. Психрофильная сульфатредуцирующая бактерия из аэробных вод Черного моря. // Микробиология. – 2012. – Т.81(6). – С.812-814.
3. Брюханов А.Л., Корнеева В.А., Канапацкий Т.А., Захарова Е.Е., Менько Е.В., Русанов И.И., Пименов Н.В.. Изучение состава сообществ сульфатредуцирующих бактерий в аэробных водах

- и зоне хемоклина Черного моря с использованием метода FISH. // Микробиология. – 2011. – Т.80(1). – С.112-120.
4. Брюханов А.Л., Корнеева В.А., Пименов Н.В. Детекция анаэробных сульфатредуцирующих бактерий в кислородсодержащих верхних водных горизонтах Черного и Балтийского морей. // Вестник Московского Университета. Серия 16. Биология. – 2015. – № 4. (в печати).
 5. Brioukhanov A.L., Korneeva V.A., Kizilova A.K., Merkel A.Yu., Sigalevich P.A., Pimenov N.V. Sulfate-reducing bacterial communities in the Black Sea oxic and suboxic water column. // Aquatic Microbial Ecology. – 2015. (in press).

Статья в сборнике:

1. Pimenov N.V., Bryukhanov A.L., Korneeva V.A., Zakharova E.E., Sigalevich P.A., Rusanov I.I., Yakushev E.V., Chasovnikov V.K. Anaerobic microbial community in the aerobic water and at the oxic/anoxic interface in the Black Sea. // In Chemical Structure of Pelagic Redox Interfaces: Observation and Modelling. The Handbook of Environmental Chemistry. Heidelberg, Germany. – 2013. – V.22. – P.27-46,

Тезисы докладов:

1. Brioukhanov A., Korneeva V., Zakharova E., Dolla A., Brasseur G., Ollivier B., Pieulle L., Fardeau M.L., Valette O., Kizilova A., Joseph M., Netrusov A., Pimenov N. Anaerobic sulfate-reducing bacteria in the oxic water column of the Black Sea. // FEMS 2015: 6th Congress of European Microbiologists, Maastricht, Netherlands. Published on CD.
2. Брюханов А.Л., Брассё Г., Пиэль Л., Пименов Н.В., Корнеева В.А., Налдина Е.П., Нетрусов А.И., Долла А. Системы антиокислительной защиты в клетках нового вида сульфатредуцирующей бактерии рода *Desulfofrigus*, выделенной из кислородсодержащих поверхностных вод Черного моря. // Материалы Всероссийского симпозиума с международным участием «Современные проблемы физиологии, экологии и биотехнологии микроорганизмов». МАКС Пресс, Москва. – 2014. – С.39.
3. Корнеева В.А., Захарова Е.Е., Брюханов А.Л., Налдина Е.П., Пименов Н.В. *Desulfofrigus* sp. штамм SrB-30 – новая психрофильная сульфатредуцирующая бактерия, выделенная из аэробной водной толщи Черного моря. // Материалы Всероссийского симпозиума с международным участием «Современные проблемы физиологии, экологии и биотехнологии микроорганизмов». МАКС Пресс, Москва. – 2014. – С.127.
4. Корнеева В.А., Брюханов А.Л., Пименов Н.В. Изучение биоразнообразия сульфатредуцирующих бактерий в водной толще Балтийского моря. // Сборник тезисов 18-й Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века». Пущино. – 2014. – С.214.
5. Налдина Е.П., Корнеева В.А. Анаэробная сульфатредуцирующая бактерия *Desulfofrigus* sp., выделенная из поверхностных окисленных вод Черного моря. // Материалы Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2014». Москва. – 2014. – С.191-192.
6. Корнеева В.А., Брюханов А.Л., Пименов Н.В. Детекция анаэробных микроорганизмов в поверхностных водах Черного моря с использованием молекулярно-биологических методов. // Сборник тезисов 16-й Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века». Пущино. – 2012. – С.24.
7. Korneeva V., Brioukhanov A., Zakharova E., Pimenov N. Analysis of sulfate-reducing bacterial communities in enrichment cultures from the upper water column of the Black Sea. FEMS 2011: 4th Congress of European Microbiologists, Geneva, Switzerland. Published on CD.
8. Корнеева В.А., Брюханов А.Л., Захарова Е.Е., Пименов Н.В. Получение и идентификация накопительных культур сульфатредуцирующих бактерий из поверхностных вод Черного моря. // Материалы 3-го Байкальского микробиологического симпозиума с международным участием «Микроорганизмы и вирусы в водных экосистемах (BSM-2011)». Изд-во Института географии им. В.Б. Сочавы СО РАН, Иркутск. – 2011. – С.66-68.

9. Брюханов А.Л., Корнеева В.А., Часовников В.К., Пименов Н.В. Сообщества сульфатредуцирующих бактерий в аэробных водах Черного моря. // Материалы 3-го Байкальского микробиологического симпозиума с международным участием «Микроорганизмы и вирусы в водных экосистемах (BSM-2011)». Изд-во Института географии им. В.Б. Сочавы СО РАН, Иркутск. – 2011. – С.22-24.
10. Корнеева В.А., Брюханов А.Л., Пименов Н.В. Изучение биоразнообразия сульфатредуцирующих бактерий в водах Черного и Балтийского морей. // Тезисы VII молодежной школы-конференции с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии». МАКС Пресс, Москва. – 2011. – С.78-81.
11. Корнеева В.А., Брюханов А.Л., Захарова Е.Е., Кравченко И.К., Кизилова А.К., Пименов Н.В. Получение и идентификация накопительных культур сульфатредуцирующих бактерий из аэробных вод и зоны хемоклина Черного моря. // Тезисы VI молодежной школы-конференции с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии». МАКС Пресс, Москва. – 2010. – С.33-35.
12. Корнеева В.А., Брюханов А.Л., Пименов Н.В. Применение метода флуоресцентной *in situ* гибридизации для исследования биоразнообразия сульфатредуцирующих бактерий в водах Черного моря. // Материалы Всероссийского симпозиума с международным участием «Автотрофные микроорганизмы». МАКС Пресс, Москва. – 2010. – С.52.
13. Брюханов А.Л., Корнеева В.А., Канапацкий Т.А., Захарова Е.Е., Менько Е.В., Пименов Н.В. Биоразнообразие сульфатредуцирующих бактерий в водах Черного моря. // Тезисы V молодежной школы-конференции с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии». МАКС Пресс, Москва. – 2009. – С.13-14.