

Бурганская Екатерина Игоревна

**АНОКСИГЕННЫЕ НИТЧАТЫЕ ФОТОТРОФНЫЕ БАКТЕРИИ  
В МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВАХ  
МИНЕРАЛИЗОВАННЫХ ВОДНЫХ ЭКОСИСТЕМ**

03.02.03 – Микробиология

**АВТОРЕФЕРАТ**

Диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва – 2020

Работа выполнена в лаборатории экологии и геохимической деятельности микроорганизмов и лаборатории молекулярной диагностики Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук».

**Научные руководители:** **Горленко Владимир Михайлович**  
доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»

**Официальные оппоненты:** **Щербакова Виктория Артуровна**  
доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник, Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина, ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»

**Намсараев Зоригто Баирович,**  
кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт».

**Ведущая организация:** **Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»,**  
Биологический факультет.

Защита состоится 26 ноября 2020 г. в 11-00 на заседании диссертационного совета Д002.247.02 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук, на соискание ученой степени кандидата наук на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского по адресу: 117312, Москва, проспект 60-летия Октября, д. 7, корп. 2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИНМИ РАН (117312, Москва, проспект 60-летия Октября, д. 7, корп. 2) и на сайте ФИЦ Биотехнологии РАН <http://www.fbras.ru/>.

Автореферат разослан « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2020 года

**Учёный секретарь  
диссертационного совета**

доктор биологических наук  
Хижняк Татьяна Владимировна

**Актуальность исследования.** Фотосинтез – один из самых значительных биогеохимических процессов на Земле. Первыми организмами, способными к фотосинтезу, были аноксигенные фототрофные бактерии (АФБ), развитие которых проходило в экстремальных условиях древней Земли.

На сегодня известно, что аноксигенный фотосинтез осуществляется представителями семи бактериальных филумов. Для реконструкции этапов эволюции фотосинтеза научный интерес представляют аноксигенные нитчатые фототрофные бактерии (АНФБ) филума *Chloroflexi*. В экстремальных экосистемах, например в термальных источниках, эти бактерии являются важным компонентом микробного сообщества.

Большая часть того, что мы знаем о биологии этих бактерий, получена на основании изучения пресноводных видов. Однако наши знания о солоноводных представителях весьма ограничены. На момент начала исследования было известно только две солоноводных АНФБ, каждая из которых значительно филогенетически удалена друг от друга, – ‘*Candidatus Chlorothrix halophila*’ и ‘*Candidatus Chloroploca asiatica*’ (штамм В7-9). Поэтому данное исследование посвящено увеличению знаний об АНФБ из солоноводных экосистем.

В природе АНФБ встречаются в составе микробного мата. Микробные маты – древнейшие высокопродуктивные фототрофные сообщества, о чем свидетельствуют находки литифицированных матов – строматолитов, в породах возрастом около 3.5 млрд лет. Исследования современных микробных матов важны для выяснения геохимической деятельности древних микробных экосистем, особенно их роли в оксигенации атмосферы Земли.

Состав микробных сообществ цианобактериальных матов зависит от солености водоема, типа минерализации, рН и температуры. Большинство опубликованных статей посвящено исследованию микробных матов, сформированных в мелководных участках морских и гиперсоленых континентальных водоемов южных и средних широт, а также сформированных в высокотемпературных пресноводных источниках. Еще меньше публикаций с использованием метода высокопроизводительного секвенирования, с целью корректного таксономического описания компонентов АНФБ-содержащих сообществ микробных матов соленых водоемов. Современные работы по исследованию структуры бентосных фототрофных сообществ соленых холодных и мезотермальных серных источников малочисленны. Исследование новых солоноводных местообитаний даст возможность выделить новые виды мезофильных АНФБ, исследовать их метаболизм на геномном уровне и выявить новые тренды эволюции фототрофных сообществ.

**Цель данного исследования:** изучение разнообразия аноксигенных нитчатых фототрофных бактерий в микробных сообществах минерализованных водных экосистем с применением комплекса микробиологических и молекулярно-генетических методов.

**В задачи исследования входило:**

1. Определить условия образования бентосных фототрофных сообществ в солоноводных водоемах разного типа: содового озера Киран, приполярных озерах лагунного типа Кандалакшского залива Белого моря, холодных и мезотермальных серных источников Крыма и Дагестана.

2. С использованием современных молекулярных методов диагностики описать состав и структуру фототрофных сообществ, а также определить степень распространенности АНФБ в микробных матах и биопленках, сформированных в исследуемых водоемах.

3. Провести сравнительное изучение особенностей состава и функционирования микробных матов и биопленок солоноводных местообитаний различного происхождения.

4. Выделить культуры АНФБ из солоноводных мест обитания, изучить их морфологические и физиологические свойства.

5. Выполнить полногеномное секвенирование ДНК новых изолятов АНФБ, проанализировать их филогенетическое положение и основные биохимические особенности.

**Научная новизна.** Впервые с применением комплексного подхода, включающего микробиологические и молекулярно-генетические методы, исследованы сообщества микробных матов содового озера Киран, солевых маршей и литоральных зон озер, имевших связь с Кандалакшским заливом Белого моря, а также сульфидных соленых холодных Чокракских источников и теплых источников Дагестана. Получены новые данные о филогенетическом разнообразии АНФБ и других фототрофных бактерий в солоноводных местообитаниях типа сульфурета различного происхождения. Выполнено полногеномное секвенирование и дано описание нового рода и новым мезофильным видам АНФБ: '*Candidatus Viridilinea mediisalina*' и '*Candidatus Viridilinea halotolerans*'.

**Практическая значимость.** Фототрофные бактерии в сульфидсодержащих экосистемах являются главным барьером на пути распространения сероводорода в атмосферу. Исследование условий формирования и структуры микробных матов солоноводных и содовых местообитаний имеет практическое значение в плане бальнеологии, региональной экологии и возможного применения в очистных сооружениях искусственных микробных матов.

**Апробация работы:** Материалы диссертации были доложены на XI, XII конференциях «Актуальные аспекты микробиологии» (Москва, 2016, 2017), «Автотрофные микроорганизмы» (Москва, 2015), The 17<sup>th</sup> International Congress on Photosynthesis Research (The Netherlands, 2016), 13<sup>th</sup> International Conference on Salt Lake Research (Ulan-Ude, Russia, 2017).

**Публикации:** По материалам диссертации было опубликовано 6 статей в рецензируемых журналах и 6 тезисов конференций:

**Объем и структура работы.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Текст работы изложен на 169 страницах, содержит 41 рисунок, 15 таблиц и 2 приложения. Список литературы содержит 342 наименования.

**Место выполнения работы и благодарности.** Работа была выполнена на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» в лаборатории экологии и геохимической деятельности микроорганизмов, в лаборатории молекулярной диагностики. Все оригинальные нуклеотидные

последовательности, опубликованные в ходе выполнения данной работы, были определены с помощью оборудования ЦКП «Биоинженерия» Института биоинженерии, ФИЦ Биотехнологии РАН. Автор выражает глубокую признательность И.А. Брянцевой, В.А. Гайсину, Д.С. Груздеву, а также Б.Б. Кузнецову за практическую помощь и ценные рекомендации. Автор также выражает искреннюю благодарность всем сотрудникам лаборатории экологии и геохимической деятельности микроорганизмов Института микробиологии им. С.Н. Виноградского и лаборатории молекулярной диагностики Института биоинженерии ФИЦ Биотехнологии РАН. Кроме того, автор благодарит коллектив лаборатории микробиологии Института общей и экспериментальной биологии СО РАН (Улан-Удэ) и в особенности Д.Д. Бархутову за организацию экспедиции на озеро Киран.

**Финансовая поддержка.** Работа выполнена при поддержке программы Президиума РАН «Эволюция органического мира и планетарных процессов», а также при поддержке грантов РФФИ № 15-04-07655, № 16-04-00830 и № 19-04-00423.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Материалы и методы

**Объектами исследования** были АФБ, обитающие в цианобактериальных матах содового озера Киран (республика Бурятия), солевых маршах и литорали озер, имевших связь с Кандалакшским заливом Белого моря, Чокракских соленых холодных источниках (республика Крым) и мезотермальных высокоминерализованных источниках Дагестана (Табл. 1). **ДНК бактерий** выделяли с помощью набора PowerMax Soil DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Inc., США) с модификациями. **Молекулярно-генетическую идентификацию** проводили с помощью ПЦР с использованием олигонуклеотидных праймеров разного уровня специфичности на гены *rufLM* и 16S рРНК, а также универсальных эубактериальных праймеров на гены 16S рРНК и анализа последовательностей клонированных ПЦР-фрагментов генов 16S рРНК. Филогенетический анализ проводили с помощью программы MEGA 6.0. **Поиск референсных последовательностей** в базе данных GenBank осуществляли с помощью программы BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Амплификацию и секвенирование переменного участка V3-V4 гена 16S рРНК проводили с помощью секвенатора Illumina MiSeq (парные чтения 2×250 bp). **Последовательность геномной ДНК** штаммов Kir15-3F и Chok-6 определяли с использованием секвенатора HiSeq 1500. **Культуры АНФБ** выделяли путем культивирования в условиях освещенности на агаризованной селективной среде при температурах 30-35°C. Состав среды: (г/л): NH<sub>4</sub>Cl – 0.2; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 0.2; CaCl<sub>2</sub>•2H<sub>2</sub>O – 0.2; KCl – 0.3; MgCl<sub>2</sub> – 0.2; NaCl – 5-10; NaHCO<sub>3</sub> – 0.6; Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> – 0.3; Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 0.3; дрожжевой экстракт – 0.05-0.2; ацетат натрия – 0.1-0.2; витамин B<sub>12</sub> – 0.02; Na<sub>2</sub>S•9H<sub>2</sub>O – 0.5-0.7; раствор витаминов – 1 мл/л; раствор микроэлементов (Pfennig and Lippert 1966) – 1 мл/л. Флуоресцентную гибридизацию *in situ* для штаммов Kir15-3F проводили на микроскопе Nikon Eclipse Ti (Nikon, Japan). **Таксономическое описание** штаммов Kir15-3F и Chok-6 проводили путем определения их морфологических, физиологических и генотипических свойств.

Таблица 1. Характеристика мест отбора образцов.

Образец	Соленость, г/л	pH	T, °C	Образец	Соленость, г/л	pH	T, °C
<b>Озеро Киран</b>				<b>Чокракские источники</b>			
<b>Кир1</b>	35	9.3	НО	<b>Чок1</b>	29	7.8	НО
<b>Кир2</b>	35	9.2	НО	<b>Чок2</b>	100	7.0	НО
<b>Кир3</b>	36	НО	НО	<b>Чок3</b>	89	7.3	НО
<b>Солевые марши и литорали озер, Кандалакшского залива Белого моря</b>				<b>Чок4</b>	54	6.5	НО
<b>Er1</b>	24	7.9	НО	<b>Чок5</b>	60	7.9	НО
<b>Er2</b>	27	7.91	НО	<b>Чок6</b>	22	7.0	НО
<b>Er5</b>	4	6.6	НО	<b>Берикейские источники</b>			
<b>Gub1</b>	15	7.1	НО	<b>7</b>	97	6.15	49
<b>Gub3</b>	26	6.97	НО	<b>8</b>	97	6.1	44.5
<b>KS4</b>	11	6.8	9	<b>9</b>	97	5.75	50
<b>KS5</b>	15	7.1	9	<b>11</b>	97	6.35	40.5
<b>Nil2</b>	26	7.9	15	<b>12</b>	57	7.05	40.5
<b>Nil3</b>	28	6.76	14	<b>13</b>	57	7.4	38.5
<b>Nil4</b>	20	6.77	14	<b>14</b>	68	6.7	51
<b>ZM2</b>	25	7.2	13	<b>15</b>	68	7.62	34
<b>ZM3</b>	15	6.6	12	<b>16</b>	78	6.7	44
<b>ZM4</b>	15	6.86	НО	<b>19</b>	48	6.2	28

НО – не определяли

## Результаты и обсуждение

### 1 Микробные маты содового озера Киран

Озеро Киран относится к типу непересыхающих содово-соленых озер и известно как рапное, карбонатное, с большой примесью хлоридов. Оно не имеет стока и водно-солевое питание получает за счет грунтовых вод (скважин) и временных дождевых потоков.

#### 1.2 Основные группы фототрофных бактерий, выявленные посредством микроскопии

Таксономическая принадлежность основных морфотипов цианобактерий в микропрепаратах бактерий из природных образцов была установлена с помощью определителя (Komárek and Anagnostidis 2005). Во всех образцах в большом количестве наблюдали присутствие цианобактерии *Arthrospira platensis* (рис. 1а), клетки которой оседали из водной толщи после массового цветения воды. Остальные цианобактерии входили в состав исследованных цианобактериальных матов: *Halomicronema metazoicum* (рис. 1а) и *Leptolyngbya fragilis* (рис. 1б) присутствовали в образце 1, *Geitlerinema sp.* (рис. 1в) – во всех трех образцах, *Spirulina major* (рис. 1г) – в образцах 1 и 2, *Phormidium etoshii* (рис. 1д) – в образце 3.

В микропрепаратах всех исследованных природных образцов присутствовали пурпурные серные бактерии семейств *Ectothiorhodospiraceae* и *Chromatiaceae*. В образце 1 наблюдали большое количество мелких спирилл с внутриклеточной серой,

морфологически сходных с *Thiorhodovibrio winogradskyi* (рис. 1е). В образце 3 присутствовал морфотип *Chromatium* sp. (рис. 1ж). В образцах 2 и 3 в значительном количестве присутствовали крупная пурпурная серобактерия, предположительно *Ectothiorhodospira magna* или *Thiorhodospira sibirica*, и мелкие клетки *Ectothiorhodospira* sp. (рис. 1ж).

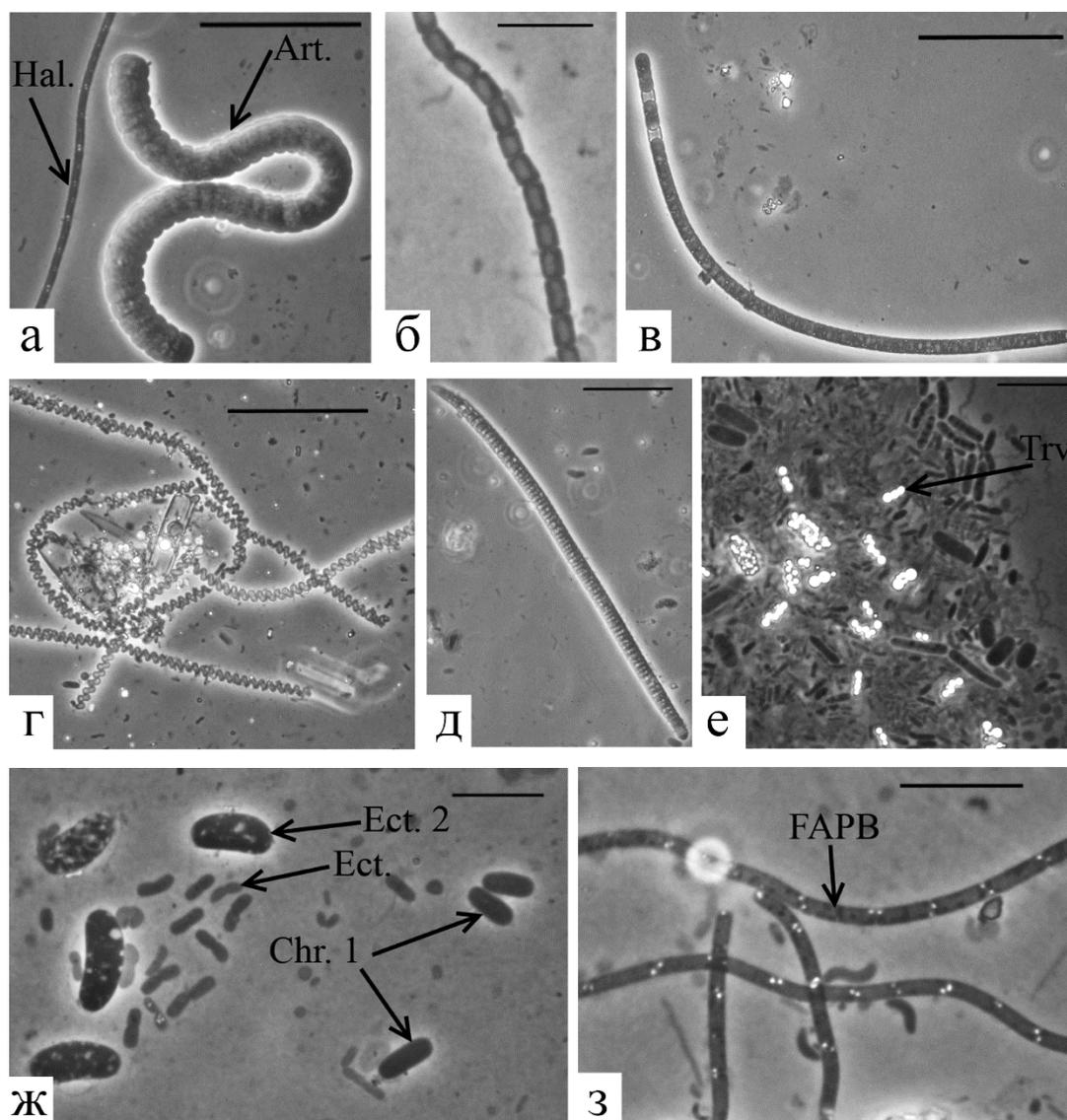


Рисунок 1. Морфотипы фототрофных бактерий в природных образцах: а – *Halomicronema metazoicum* Caroppo, Pagliara & Albertano (Hal.) и *Arthrospira platensis* Gomont 1892 (Art.); б – *Leptolyngbya fragilis* (Gomont) Anagnostidis & Komárek 1988; в – *Geitlerinema* sp.; г – *Spirulina major* Kutzing et. Gomont 1892; д – *Phormidium etoshii* Dadheech, Casamatta, Casper & Krienitz 2013; е – *Thiorhodovibrio winogradskyi* (Trv.); ж – *Chromatium* sp. 1 (Chr. 1), *Ectothiorhodospira* sp. (Ect.), *Ectothiorhodospira magna* или *Thiorhodospira sibirica* (Ect. 2); з – зеленая нитчатая бактерия (АНФБ); Масштаб: а-д – 50 мкм; е-з – 10 мкм.

В образце 2 и 3 в значительном количестве обнаружена нитчатая зеленая бактерия (рис. 1з), морфология которой была характерна для АНФБ филума Chloroflexi.

### 1.3 Состав микробных сообществ по данным высокопроизводительного секвенирования

В сообществе присутствовали представители филума Bacteroidetes, который являлся доминирующим в образцах 1 и 3 (43.53 и 35.21% от выявленных OTU, соответственно). Значительную часть OTU в образцах 1, 2 и 3 составляли представители филумов Proteobacteria (28.68; 31.27; 22.05%) и Cyanobacteria (9.07; 18.35; 28.64%). Среди Proteobacteria преобладали члены класса *γ-proteobacteria* (13.39; 15.84; 15.38%). Также в сообществах присутствовали микроорганизмы, принадлежащие филумам Firmicutes (1.81; 8.67; 5.24%), Spirochaetes (3.37; 4.37; 1.45%) и Verrucomicrobia (7.75; 4.20; 4.14%). Оставшиеся 3.05-5.15% от общего числа OTU сообществ были представлены другими малочисленными филумами.

Оксигенные прокариотные фототрофы микробного сообщества экосистемы озера, цианобактерии, были представлены 12 OTU, из которых наиболее преобладающими были 3 филотипа – это OTU1, имеющая 99% сходства последовательностей гена 16S рНК с *Arthrospira platensis*, OTU3 со сходством 99% с *Geitlerinema* sp. и OTU15 со сходством 98% с *Spirulina major*. Важно отметить, что *Arthrospira platensis* является основной планктонной цианобактерией, вызывающей обильное осеннее цветение озера Киран, что объясняет ее преобладание в обнаруженных филотипах.

Несерные пурпурные бактерии были представлены тремя филотипами OTU7, OTU150, OTU289, близкими к алкалофильным видам *Rhodobaca bogoriensis*, *Rhodobaculum claviforme* и *Rubribacterium polymorphum*, соответственно. НПБ составляли 34.30% от общего числа фототрофных бактерий в образце 1, и всего 5.58% в образце 2 и 3.55% в образце 3.

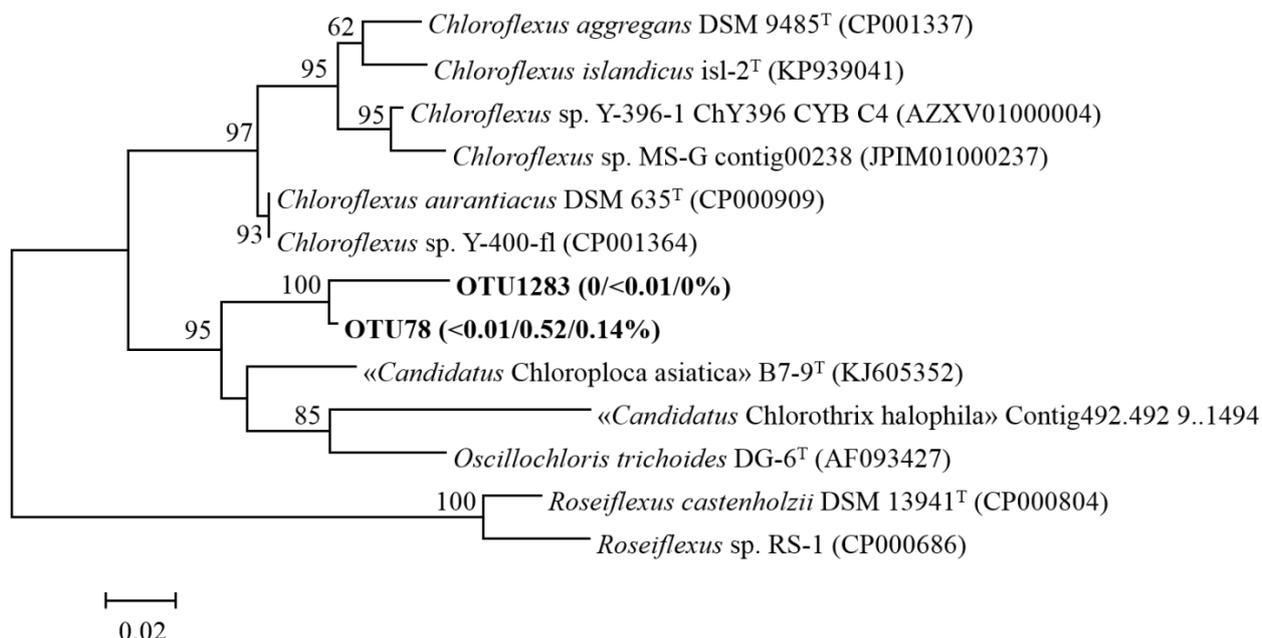


Рисунок 2. Филогенетическое дерево, показывающее филогенетическое разнообразие OTU, относящихся к фототрофным Chloroflexi (в) в природных образцах. Дендрограмма построена на основании анализа последовательностей длиной 440 нуклеотид с помощью метода Maximum Likelihood. Статистическая достоверность ветвления установлена на основании сравнения 500 альтернативных дендрограмм. На дендрограмме после номера OTU следуют цифры, отражающие процентное содержание OTU от общего числа всех бактерий в 1, 2 и 3 образцах соответственно (образец 1/образец 2/образец 3).

Пурпурные серные бактерии были представлены 10 OTU и составляли до 28.93% от общего числа фототрофных бактерий в сообществе. Большую часть последовательностей составляла OTU2, имеющая сходство 94% с *Thiorhodovibrio winogradskyi*. Фототрофные представители семейства *Ectothiorhodospiraceae* развивались в основном в точке 2.

Аэробные аноксигенные фототрофные бактерии в основном присутствовали в образце 1 и составляли 3.64% от общего числа фототрофных бактерий в сообществе. Больше всего в сообществе OTU103 и OTU365, близких к *Geminicoccus roseus*. Всего аэробные АФБ представлены 5 OTU.

Аноксигенные нитчатые фототрофные бактерии были представлены двумя филотипами: OTU78 и малочисленной OTU1283 (рис. 2). Наиболее близкой бактерией к филотипу OTU78 являлась бактерия '*Candidatus Chloroloca asiatica*', уровень сходства с которой по последовательности гена 16S рРНК составлял 94%.

Среди хемоавтотрофных бактерий в сообществе присутствовали микроорганизмы, участвующие в серном цикле: сульфатредукторы и сероредукторы. Сульфатредуцирующие бактерии относились к порядкам *Desulfabacterales* и *Desulfovibrionales*, а сероредуцирующие бактерии относились к порядку *Desulfuromonadales*.

#### 1.4 Выделенные культуры АФБ

Из природного мата (образец 2) были изолированы пять культур АФБ. В чистой культуре получены и идентифицированы пурпурные серобактерии *Ectothiorhodospira shaposhnikovii* Kir-2, *Thiorhodospira sibirica* Kir-3 и *Ectothiorhodospira variabilis* Kir-4. *Thiocapsa rosea* Kir-1 и культура Kir15-3F представляли собой так называемые монокультуры, в которых помимо одного вида АФБ присутствовали нефототрофные бактерии.

Все аноксигенные фототрофные бактерии приспособлены к жизни в присутствии сульфида. В микробных матах определены галоалкалофильные и галотолерантные виды цианобактерий, пурпурных серных и несерных бактерий и аэробных аноксигенных фототрофов. Зеленые серобактерии, как и в других содовых озерах, отсутствовали. Впервые в составе матов содового озера обнаружено массовое развитие алкалофильной АНФБ, определенной как новый род и новый вид '*Ca. Viridilinea mediisalina*' (описание и характеристика представлены ниже).

## 2 Микробные маты солевых маршей и литорали озер, имевших связь с Кандалакшским заливом Белого моря.

Белое море относится к типу приполярных внутренних морей с низкой среднегодовой температурой, низкой соленостью (23-26 г/л в поверхностных водах) по сравнению с водами мирового океана (средняя соленость 35 г/л). В солевых маршах и лагунных озерах Кандалакшского залива соленость еще ниже за счет береговых стоков. Температура воды в Кандалакшском заливе колеблется от – 1.5°C зимой до 8-17°C летом. При промерзании мелководья микробные маты также замерзают и видимо перестают функционировать. В донных осадках литорали присутствует сульфид.

В исследованных фототрофных сообществах преобладали однолетние пигментированные биопленки, инициированные сульфидогенезом. В редких случаях в

углублениях грунта в соленых маршах или в литорали озер обнаруживался многолетний мат толщиной около 1 см с четкими зелеными и пурпурными микронеонами.

## 2.2 Основные группы фототрофных бактерий

На рисунке 3 представлены микрофотографии фототрофных бактерий литорали приполярных районов Кандалакшского залива, солевых маршей и озер лагунного типа.

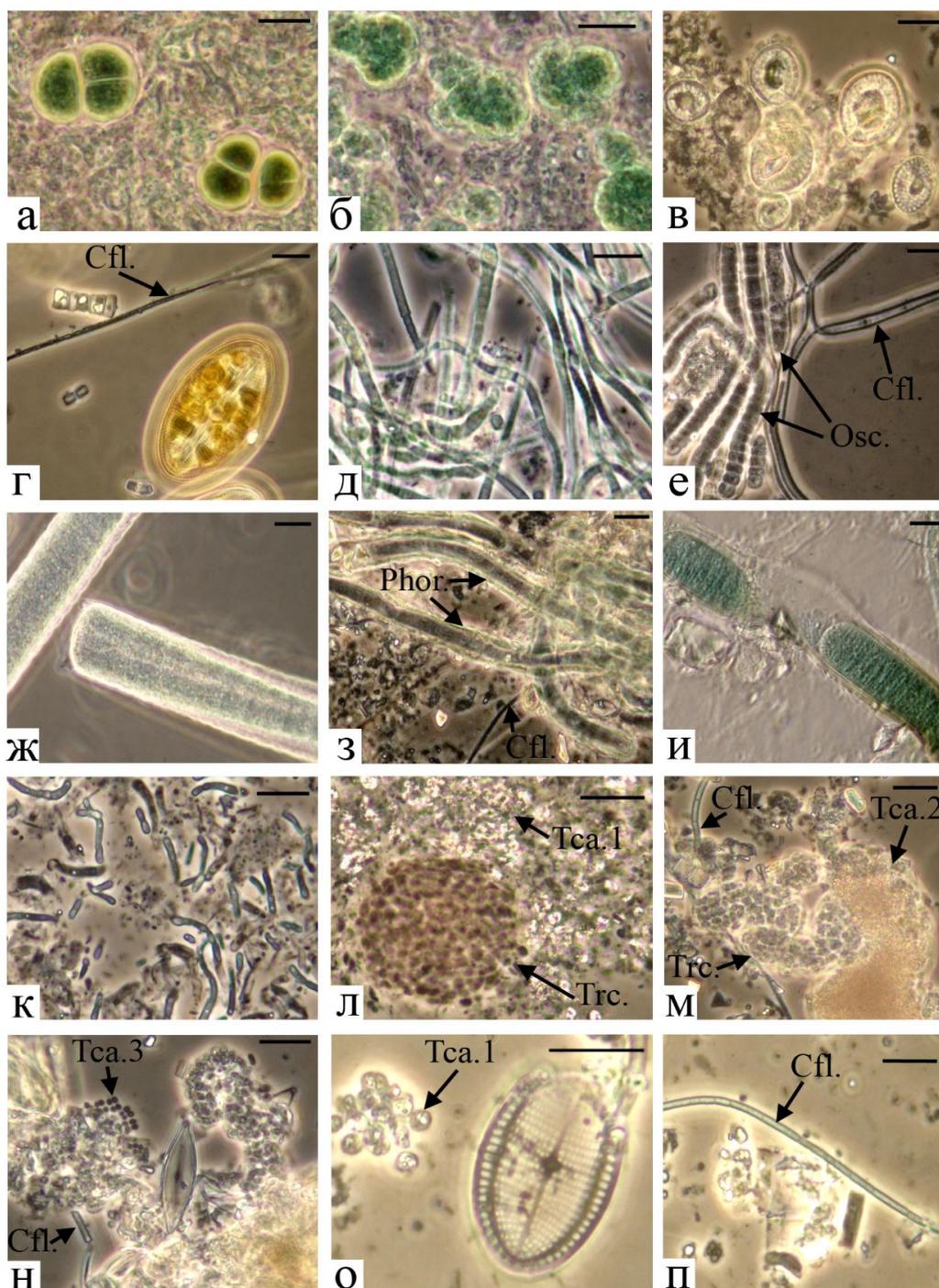


Рисунок 3. Морфотипы фототрофных бактерий в природных образцах: а – *Gloecapsa* sp.; б – *Synechocystis* sp.; в – диатомовые водоросли; г – диатомовая водоросль и АНФБ (Cfl.); д – *Phormidium* sp.; е – *Oscillatoria* sp. (Osc.) и АНФБ (Cfl.); ж – *Oscillatoria* sp.; з – *Phormidium* sp. и АНФБ (Cfl.); и – *Lyngbya* sp.; к – *Synechococcus* sp.; л – *Thiocapsa rosea* (Tca.1) и *Thiorhodococcus* sp. (Trc.); м – АНФБ (Cfl.), *Thiocapsa* sp. (Tca.2) и *Thiorhodococcus* sp. (Trc.); н – АНФБ (Cfl.) и *Thiocapsa litoralis* (Tca.3); о – *Thiocapsa rosea* (Tca.1); п – АНФБ (Cfl.). Масштаб: а-п – 10 мкм.

Основу матов и биопленок составляли нитчатые цианобактерии морфотипов *Oscillatoria*, *Phormidium*, *Lyngbya*, *Spirulina*, одноклеточные цианобактерии морфологически сходные с видами *Synechococcus* и *Synechocystis* (рис. 3). Среди АФБ преобладали пурпурные бактерии: рода *Thiocapsa*, и *Thiorhodococcus* spp., мелкие формы *Chromatium* – подобные бактерии и *Thiorhodovibrio* sp. Во всех матах и биопленках были обнаружены АНФБ.

### 2.3 Состав микробных сообществ по данным высокопроизводительного секвенирования

Состав микроорганизмов в биопленках и многолетних матах существенно не отличался. Одним из наиболее представленных во всех образцах филумов являлся филум *Proteobacteria*, который составлял от 24.21 до 59.45% от общего числа бактерий. Бактерии второго по представленности филума *Bacteroidetes* присутствовали в количестве от 15.92% до 39.61%.

Члены филума *Chlorobi* в значительном количестве присутствовали в двух образцах – Er1 и Gub3 (4.45 и 17.30%), тогда как практически отсутствовали в других образцах. В небольшом количестве присутствовали представители филумов *Fusobacteria*, *Parcubacteria*, *Spirochaetes*, *Verrucomicrobia*. *Firmicutes*. Бактерии филума *Chloroflexi* составляли от 0.32 до 1.93%. Количество *Cyanobacteria* варьировало в образцах от 0.98 до 12.47%. Самым представленным филотипом являлась OTU9, близкая к *Planktothricoides raciborskii*. Также в большом количестве присутствовали два филотипа OTU47 и OTU50, относящиеся к роду *Phormidium* и OTU9, близкая к *Coleofasciculus chthonoplastes* (ранее *Microcolius chthonoplastes*)

Среди зеленых серобактерий обнаружено два филотипа: OTU4, близкая к *Prosthecochloris phaeoasteroidea* ZM и *Prosthecochloris aestuaria*. Она составляла 95.2% от общего количества фототрофных бактерий (ОКФ) в образце Er1 и 89.56% - в образце Gub3. OTU6633, близкая к *Chlorobium phaeovibrioides* DSM 265, обнаружена только в сообществе KS5 в количестве менее, чем 0.01%. В образцах Nil2, Nil4, Zm2 и Zm3 ЗСБ не выявлены.

Пурпурные серобактерии представлены 7 филотипами. Наиболее представленным филотипом являлся OTU666, близкая к бактерии *Chromatium okenii*. В минорных количествах также из семейства *Chromatiaceae* в сообществах присутствовали филотип OTU9535, близкий к *Thiocystis gelatinosa*, OTU2028, близкий к бактерии *Lamprobacter modestohalophilus*, OTU2169, близкая к *Thiocapsa marina*, OTU4275, близкая к *Thiohalocapsa halophila*, OTU4836, близкая к *Thiorhodococcus mannitoliphagus*, и OTU368, близкая к *Thiorhodococcus kakinadensis*. Представители семейства *Ectothiorhodospiraceae* не были обнаружены ни в одном из образцов.

Несерные пурпурные бактерии были представлены 5 филотипами и больше всего их обнаружено в образце Er5 (67.59%), тогда как в остальных образцах их было не более 2%. Наиболее представленным филотипом была OTU190, близкая к *Rhodofera antarcticus*.

Аэробные аноксигенные фототрофные бактерии были представлены 16 филотипами.

Аноксигенные нитчатые фототрофные бактерии были представлены четырьмя филотипами: OTU79, OTU1395, OTU5457, OTU8094 (рис. 4). Все четыре АНФБ присутствовали в KS4 и составляли 3.24% от ОКФ в образце. Наиболее близким

организмом к филотипам OTU79 и OTU8094 была бактерия «*Candidatus Chlorothrix halophila*». OTU1395 образовывала одну кладу с бактерией *Oscillochloris trichoides* DG-6 с уровнем сходства 93%, в то время как OTU5457 формировала отдельную кладу среди мезофильных представителей порядка *Chloroflexales*, отличаясь от ближайшего родственного организма, «*Candidatus Chlorothrix halophila*», на 9%.

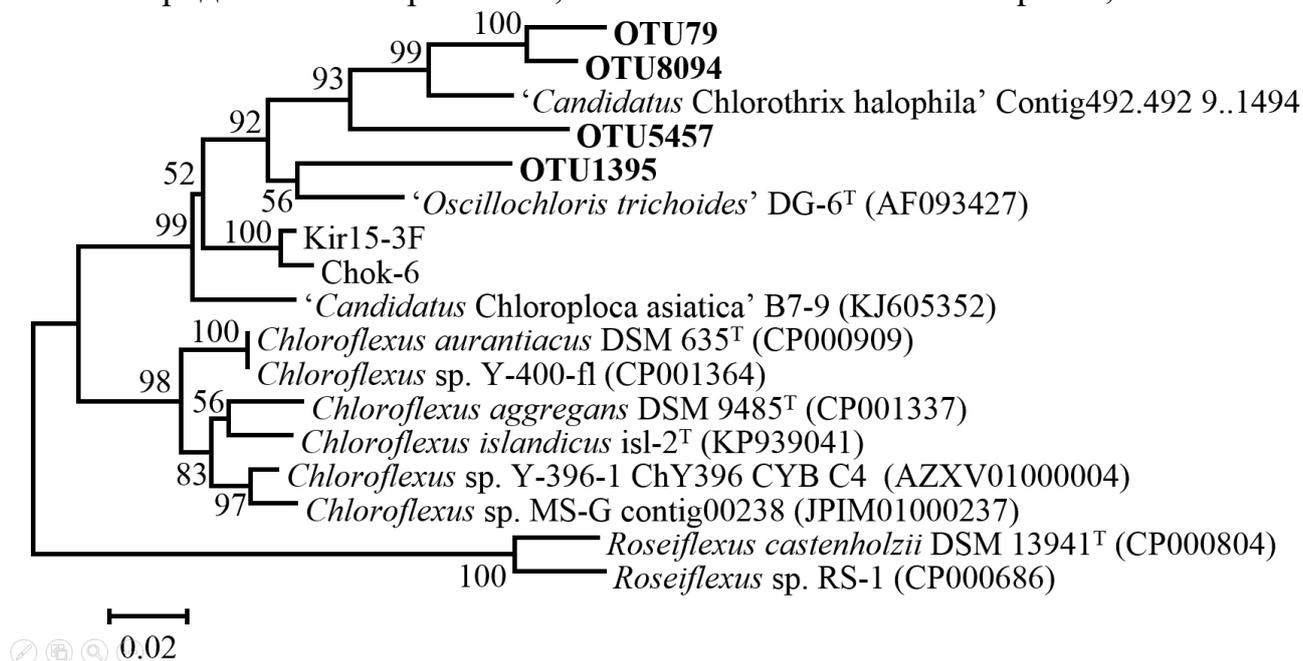


Рисунок 4. Филогенетическое дерево, показывающее филогенетическое разнообразие OTU, относящихся к фототрофным Chloroflexi в природных образцах. Дендрограмма построена на основании анализа последовательностей длиной 440 нуклеотид с помощью метода Maximum Likelihood. Статистическая достоверность ветвления установлена на основании сравнения 500 альтернативных дендрограмм.

Таким образом, в исследованных нами приполярных фототрофных сообществах преобладали однолетние пигментированные биопленки, инициированные сульфидогенезом. В редких случаях в углублениях грунта в соленых маршах или в литорали озер обнаруживался многолетний мат толщиной около 1 см, который был подвержен промерзанию в зимний период.

### 3 Микробные маты холодных соленых источников побережья озера Чокрак

Чокракские источники выклиниваются на северо-восточном побережье гиперсоленого озера Чокрак. Изливающаяся на поверхность вода Чокракских источников имеет разную минерализацию хлоридно-натриевого типа, с содержанием солей от 7 до 100 г/л. Источники характеризуются низкой температурой (~15°C), близким к нейтральным значениям pH 6.7-8.5, высоким содержанием H<sub>2</sub>S (60-220 мг/л). В местах разлива источников формируются микробные маты. Пробы матов были отобраны из 6 источников, характеристика которых приведена в таблице 1.

### 3.2 Основные группы фототрофных бактерий, выявленные посредством микроскопии

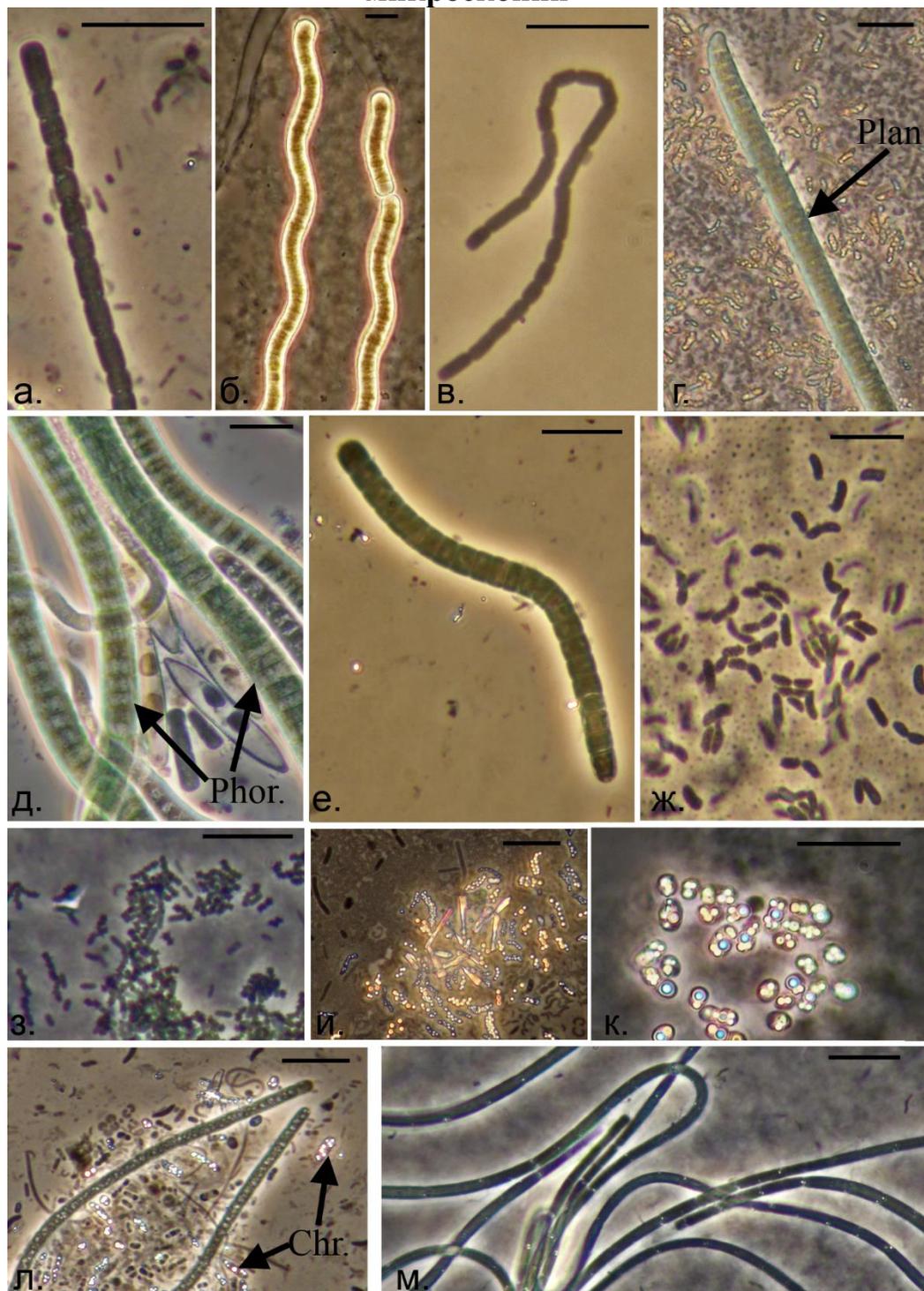


Рисунок 5. Морфотипы фототрофных бактерий в природных образцах: а – *Leptolyngbya fragilis* (Gomont) Anagnostidis & Komárek 1988; б – *Arthrospira* sp.; в – *Leptolyngbya* sp.; г – *Planktothricoides raciborskii* (Woloszynska) Suda & Watanabe 2002; д – *Phormidium* sp. (Phor.); е – *Geitlerinema* sp.; ж – *Ectothiorhodospira* sp., з – *Prosthecochloris* sp., и – *Thiorhodovibrio winogradskyi*, к – *Chromatium* sp. 1; л – *Chromatium* sp. 2 (Chr.), м – зеленая нитчатая бактерия (АНФБ); Масштаб: а-м – 10 мкм.

**Оксигенные фототрофы.** В образцах 1-6 присутствовали 2 разных морфотипа нитчатой цианобактерии рода *Leptolyngbya* (рис. 5а, в), одна из которых определена как *Leptolyngbya fragilis* (Gomont) Anagnostidis & Komárek 1988 (рис. 5а). Во всех

образцах в значительном количестве присутствовала нитчатая цианобактерия с волнистым трихомом – *Arthrospira* sp. (рис. 5б). В образцах 4-6 также в большом количестве встречались бактерии *Planktothricoides raciborskii* (Woloszynska) Suda & Watanabe 2002 (рис. 5г) и *Phormidium* sp. (рис. 5д). В образцах 4 и 6 доминировала тонкая нитчатая цианобактерия *Geitlerinema* sp. толщиной около 3 мкм (рис. 5е).

**Аноксигенные фототрофы.** Результаты микроскопирования природных образцов показали, что в образцах 1, 5 и 6 в значительном количестве встречались зеленые серобактерии *Prosthecochloris* sp. – овальные клетки с простеками – (рис. 5з).

Из пурпурных бактерий встречались представители семейств *Ectothiorhodospiraceae* и *Chromatiaceae*. В образце 5 наблюдали большое количество мелких спирилл с внутриклеточной серой, предположительно *Thiorhodovibrio winogradskyi* (рис. 5и).

В образце 5 и 6 была обнаружена нитчатая зеленая бактерия, имеющая морфологию, характерную для АНФБ филума *Chloroflexi* (рис. 5м).

### **3.3 Состав микробных сообществ по данным высокопроизводительного секвенирования (или клонирования)**

В образце 1 доминировали представители филума *Chlorobi*, которые составляли 64.75% от общего числа бактерий. В образцах 2, 3, 5 и 6 больше всего было представителей филума *Proteobacteria* (56.61, 38.78, 18.91, 48.50% соответственно). В образце 4 доминировали цианобактерии (62.86%), также они в большом количестве присутствовали в образцах 3 и 6 (13.85 и 10.76%), в то время как в образцах 1-2 и 5 их было менее 2%. Представителей филума *Bacteroidetes* было обнаружено больше всего в образце 5 (33.21%). Также в исследованных пробах присутствовали микроорганизмы, принадлежащие филумам *Firmicutes*, *Spirochaetes*. Бактерии филума *Verrucomicrobia* были обнаружены в образцах 5 и 6.

Цианобактерии в микробных матах экосистемы озера были представлены 12 OTU, из которых наиболее преобладающими были 2 филотипа – это OTU1, близкая к *Geitlerinema* sp. и OTU4, близкая к *Arthrospira* sp. Также бентосное сообщество содержало два филотипа *Leptolyngbya* sp. – это OTU381 и OTU2907, которые в разной степени представлены во всех образцах. Из нитчатых цианобактерий также присутствовали *Planktothricoides* (OTU35) и *Phormidium* sp. (OTU54) (образцы 4-6). В малых количествах обнаружены одноклеточные цианобактерии.

Среди зеленых серобактерий в сообществах микробных матов было зарегистрировано три филотипа – OTU2, OTU10, OTU172, которые в основном присутствовали в образцах 1 и 6, составляя 98.83 и 12.33% соответственно. OTU2, близкая к *Prosthecochloris vibrioformis*, составляла 97.62% от общего количества фототрофных бактерий (ОКФ) в сообществе в образце 1. В образце 6 преобладающим является OTU10, близкая к *Chlorobaculum parvum*. В гораздо меньшем количестве в сообществах образцов 1 и 6 присутствовала OTU172, близкая к *Prosthecochloris aestuarii*.

Пурпурные серные бактерии были немногочисленными. Большую часть последовательностей составляли OTU211, OTU290, OTU404, OTU476, имеющие сходство с *Halochromatium* sp., *Allochromatium vinosum*, *Ectothiorhodospira marina* и *Thioflavicoccus mobilis* соответственно.

Несерные пурпурные бактерии были представлены 18 филотипами.

Аэробные АФБ представлены 18 OTU, из которых наиболее многочисленные OTU5, близкая к *Roseovarius tolerans*, OTU33, близкая к *Roseovarius nubinhibens*, OTU36, близкая к *Erythromicrobium ramosum*, OTU118 и OTU126, близкие к *Chromatocurvus halotolerans*, и OTU140, близкая к *Roseicyclus mahoneynsis*.

Аноксигенные нитчатые фототрофные бактерии были представлены двумя флотипами: OTU426 и малочисленной OTU1921, присутствующими в образцах 5 и 6 (рис. 6) Наиболее близкой бактерией к флотипу OTU426 была бактерия ‘*Candidatus Chlorothrix halophila*’, уровень сходства с которой по последовательности гена 16S рРНК составлял 93%.

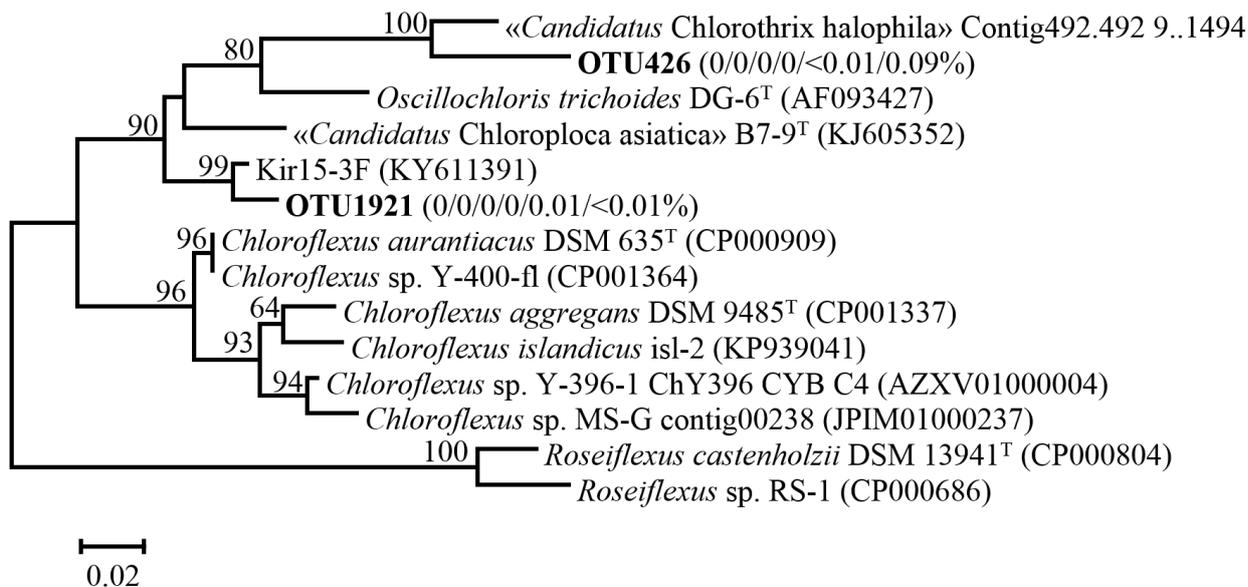


Рисунок 6. Филогенетическое дерево, показывающее филогенетическое разнообразие OTU, относящихся к фототрофным Chloroflexi (д) в природных образцах. Дендрограмма построена на основании анализа последовательностей длиной 440 нуклеотид с помощью метода Maximum Likelihood. Статистическая достоверность ветвления установлена на основании сравнения 500 альтернативных дендрограмм. На дендрограмме после номера OTU следуют цифры, отражающие процентное содержание OTU от общего числа всех бактерий в 1-6 образцах соответственно (образец 1/образец 2/3/4/5/6).

Среди хемоавтотрофных бактерий следует обратить внимание на микроорганизмы, участвующие в серном цикле: сульфатредукторов и сероредукторов и бактерий, обеспечивающих субстратами сульфидогенов. Сульфатредуцирующие бактерии относились к порядкам *Desulfarcules*, *Desulfabacterales* и *Desulfovibrionales*, а сероредуцирующие бактерии относились к порядку *Desulfuromonadales*.

Таким образом, можно заключить, что в микробных матах Чокракских источников присутствовали все компоненты «сульфурета», микробного сообщества, зависимого от круговорота серы. Преобладали морские и умеренно галофильные виды.

Из природного мата (образец 6) были изолированы шесть культур АФБ. Штаммы зеленых серобактерий *Prosthecochloris indica* Chok-1 и *Prosthecochloris vibrioformis* Chok-5, штаммы пурпурных бактерий *Ectothiorhodospira shaposhnikovii* Chok-2, *Thioflaviccoccus mobilis* Chok-3, *Rhodovulum tesquicola* Chok-4 и штамм АНФБ Chok-6. Бактерии изолятов Chok-1, Chok-5 и Chok-6 представляли собой монокультуры.

Наши исследования показали, что в Чокракских источниках стабильно присутствуют ЗСБ: по крайней мере два вида *Prosthecochloris* – *Prosthecochloris aestuarii* и *Prosthecochloris vibrioformis*, бактерии рода *Chlorobaculum* и пурпурные бактерии родов *Ectothiorhodospira* и *Allochromatium*.

Монокультура АНФБ Chok-6, филогенетически близкая, но не идентичная бактерии Kir-15-3F (озеро Киран (республика Бурятия)) была выделена из пробы мата, сформированного при солёности 22 г/л (точка б). Следует отметить, что опубликовано ограниченное количество работ, в которых приводится информация о культивируемых солёноводных *Chloroflexi*.

#### **4 Микробные маты теплых высокоминерализованных источников Дагестана**

##### **4.1 Основные группы фототрофных бактерий, выявленные посредством микроскопии**

Берикейские термальные источники (42.3338889 с.ш. 48.0961111 в.д.), существенно отличаются по ряду физико-химических параметров от других гидротерм Дагестана, прежде всего высоким содержанием солей в изливающейся воде.

Температура источников на выходе составляла 57-60°C, однако обрастания фототрофов наблюдались только при температурах ниже 54°C. Основными матобразующими микроорганизмами были нитчатые цианобактерии. Обнаружены два вида *Phormidium* и один вид морфологически сходных с *Synechosystis* одноклеточных сине-зелёных водорослей (рис. 7). При микроскопировании обнаружено 3 вида нитчатых цианобактерий родов *Phormidium*, *Oscillatoria* и *Spirulina*. Кроме того, в мате встречались отдельные нити бесцветных серобактерий *Beggiatoa* sp.

Посев на селективные среды показал, что мезотермальные условия, повышенная солёность, присутствие сульфида и нейтральный pH обуславливали развитие в матах Берикейских источников морских и умеренно галофильных АФБ, участвующих в окислении сульфида: зеленых серобактерий *Prosthecochloris* sp. и пурпурных серобактерий рода *Ectothiorhodospira* sp., *Chromatium*-подобных бактерий, а также несерных пурпурных бактерий *Rhodovulum* sp. Кроме того, в выросших культурах и при прямом микроскопировании природного материала обнаружены бактерии, морфологически сходные с зелёными АНФБ рода *Chloroflexus* (рис. 7г). Численность пурпурных и зеленых АФБ достигала около  $10^4$ - $10^5$  клеток на мл.

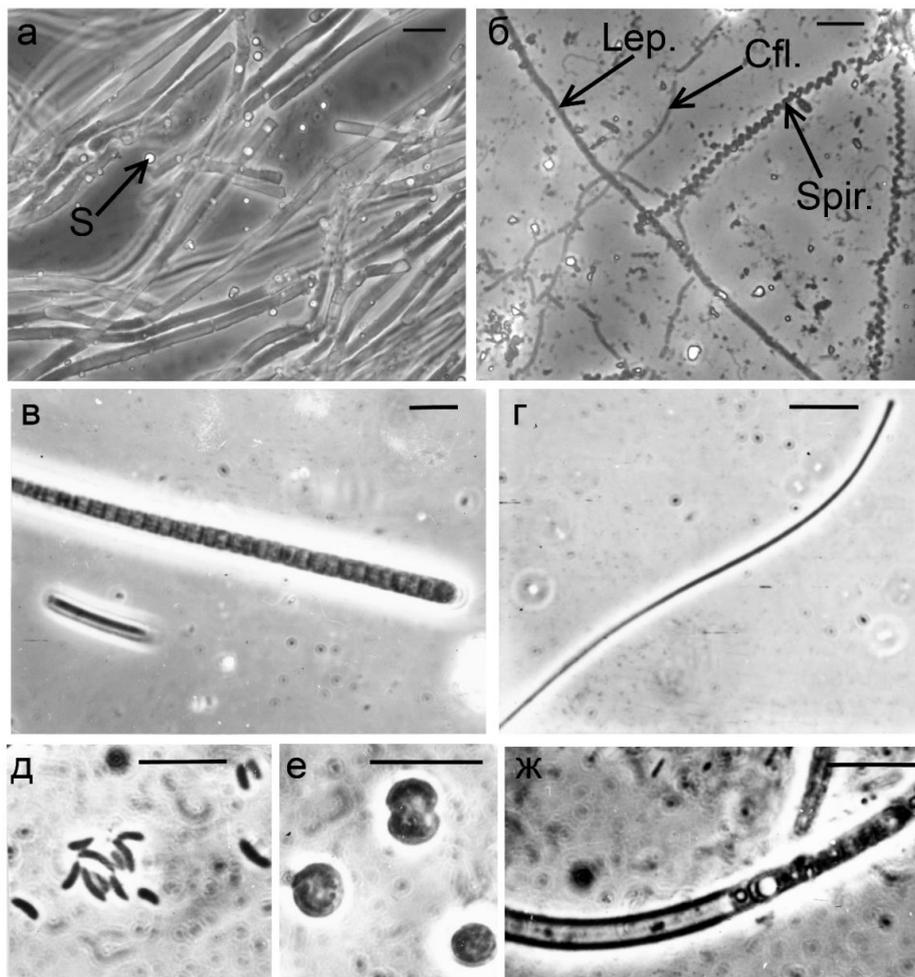


Рисунок 7. Морфотипы фототрофных бактерий в природных образцах: а – *Phormidium* sp., б – *Leptolyngbya* sp. (Lep.), *Chloroflexus*-подобные микроорганизмы (Cfl.), *Spirulina* sp. (Spir.), в – *Phormidium* sp., г – *Chloroflexus*-подобные микроорганизмы, д – *Ectothiorhodospira* sp., е – *Synechocystis* sp., ж – *Phormidium* sp. Масштаб 10 мкм.

## 4.2 Выделенные культуры АФБ

Из типичных для Берикейских источников микробных матов были выделены: зеленая серобактерия – штамм *Prosthecochloris indica* Dg19, пурпурные серобактерии – штаммы *Ectothiorhodospira mobilis* Dg9-1 и *Marichromatium gracile* Dg9-2, и несерная пурпурная бактерия – штамм *Rhodovulum* sp. Dg9-3. Обнаруженные мезофильные фототрофные Chloroflexi не удалось идентифицировать и длительно поддерживать в виде культур.

Исследованные галофильные штаммы ЗСБ и преобладающие виды ПСБ являлись галотолерантами и приспособлены к жизни в гиперсоленых Берикейских источниках в мезотермальных условиях с нейтральным значением pH. Примечательно, что эти мезофильные виды находились в функционально активном состоянии в микробном мате при повышенных температурах до 54°C.

## 5 Новые мезофильные бактерии в группе АНФБ

### 5.1 ‘*Candidatus Viridilinea mediisalina*’ Kir15-3F – новая аноксигенная нитчатая фототрофная бактерия из озера Киран

Культуру Kir15-3F выделили из образца мата, отобранного из содового озера

Киран. Культивирование проводили при 28-30°C на свету.

### 5.1.1 Пигменты клеток

Спектральный анализ мембранной фракции, ресуспендированной в трис-НСl-буфере, позволил получить спектр поглощения с пиками при 450, 615, 745 и 860 нм, а также с плечами при 515, 674 и 805 нм (рис. 8а). В смеси ацетон-метанол (7:2, об. / об.) спектр поглощения имел пики при 430, 615, 656 и 775 нм и плечи при 463 и 485 нм (рис. 8а). Мы обнаружили три формы бактериохлорофилла *d* и две формы бактериохлорофилла *c*, а также небольшие количества бактериохлорофилла *a*. На бактериохлорофиллы *d*, *c* и *a* приходится соответственно 51,8, 47,6 и 0,6% от общего клеточного бактериохлорофилла. Ранее значительное количество бактериохлорофилла *d* было обнаружено только у планктонных видов рода *Chloronema* из пресноводных озер.

Каротиноиды штамма Kir15-3F включали ликопин,  $\gamma$ -каротин и  $\beta$ -каротин (соотношение для последних трех 4.1:49.1:46.8%) (рис. 8б).

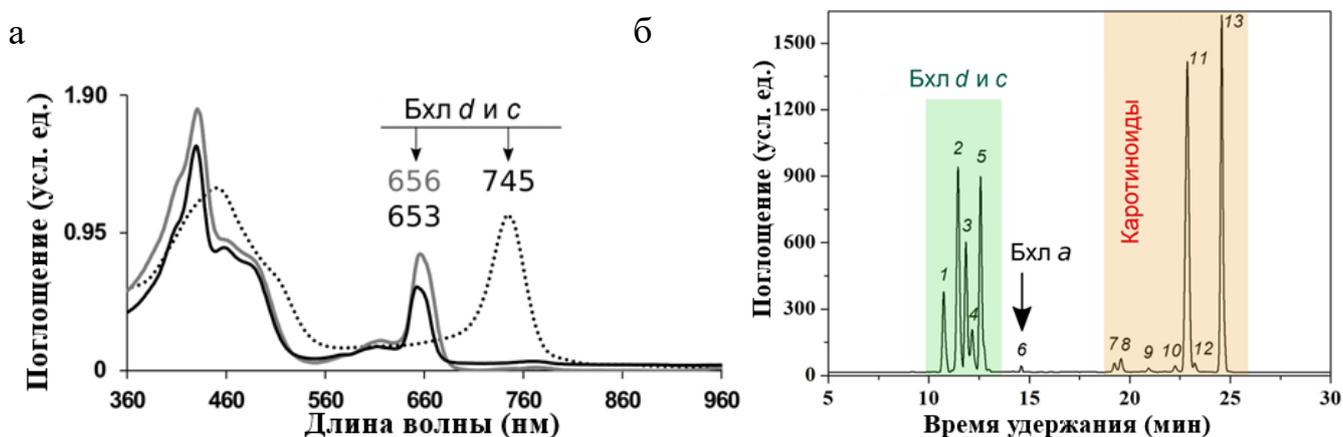


Рисунок 8. Пигментный состав клеток штамма Kir15-3F. (а) Спектр поглощения мембранного экстракта в Tris-НСl буфере (пунктирная линия), ацетон-метаноле (серая линия) и петролейном эфире (черная сплошная линия). (б) ВЭЖХ хроматограмма пигментов, экстрагированных в ацетон-метаноле (7:2, об./об.), детектированная при 360–800 нм. Идентификация пиков: 1, 2, 4 – бактериохлорофилл *d*; 3, 5 – бактериохлорофилл *c*; 6 – бактериохлорофилл *a*; 7-9 – производное ликопина; 10 – ликопин; 11 –  $\gamma$ -каротин; 12 – производное  $\gamma$ -каротина; 13 –  $\beta$ -каротин. Условные обозначения: бхл – бактериохлорофилл.

### 5.1.2 Морфологическая характеристика

Клетки бактерии Kir15-3F образовали многоклеточные филаменты различной длины и диаметром около 1.0 мкм. Подвижны. Многие клетки содержали газовые вакуоли, яркие внутриклеточные включения вблизи межклеточных перегородок (рис. 9в). Значительный объем клетки мог быть заполнен соединениями низкой плотности, возможно, полигидроксиалканоатами (вставка на рис. 9в). ПЭМ показала присутствие хлоросом и газовых вакуолей (рис. 9г, д). Кроме того, на фотографиях ПЭМ видны ребристые внешние слои оболочки клетки (рис. 9г).

### 5.1.3 Физиологические свойства

Бактерия Kir15-3F не росла в темноте ни в анаэробных, ни в аэробных условиях. Рост в аэробных условиях не наблюдался. На любой стадии культивирования образование серных глобул не происходило. Наилучший рост бактерии Kir15-3F в монокультуре был при 20–25 г/л NaCl, рН 8.0–9.0 и температуре 31-42°C. Однако из-

за отсутствия чистой культуры, мы не могли более точно проанализировать физиологию бактерии. В настоящее время можно только заключить, что бактерия Kir15-3F является алкалифильной, солеустойчивой, строго мезофильной, анаэробной, фототрофной бактерией. Эти физиологические особенности объединяют бактерию Kir15-3F и ‘*Ca. Chloroploca asiatica*’ в группу солеустойчивых, мезофильных, фототрофных Chloroflexi, которые отличаются от пресноводной бактерии *Oscillochloris trichoides*.

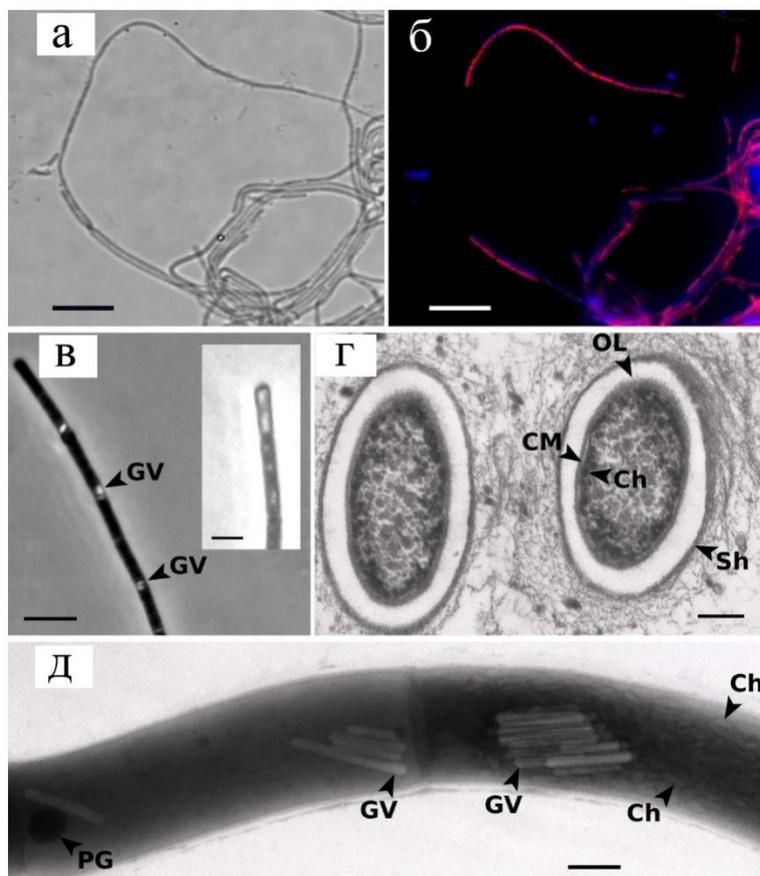


Рисунок 9. Флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH), морфология и ультраструктура ‘*Ca. Viridilinea mediisalina*’ Kir15-3F. Фазово-контрастное изображение (а) и наложение изображений пробы FISH (красный) и DAPI (синий) (б). Газовые вакуоли в клетках в фазово-контрастном изображении (в). Просвечивающие электронные микрофотографии клеток в ультратонком сечении (г) и в многоклеточном филamente (д). Масштаб: 20 мкм (а и б), 10 мкм (в), 190 нм (г), 250 нм (д). Условные обозначения: Ch – хлоросома, CM – цитоплазматическая мембрана, GV – газовая вакуоль; OL – внешний слой клеточной стенки, PG – полифосфатоподобная гранула.

#### 5.1.4 Генетические свойства

Была получена последовательность гена 16S рРНК штамма Kir15-3F длиной 1447 нуклеотидов. Филогенетический анализ на основании гена 16S рРНК показал, что Kir15-3F образует отдельную ветвь на дендрограмме с ближайшей к нему бактерией ‘*Candidatus Chloroploca asiatica* В7-9’ (рис. 12). Парное сравнение последовательностей гена 16S рРНК показало, что разница в составе последовательностей штаммов Kir15-3F и ‘*Candidatus Chloroploca asiatica* В7-9’ составляет 7.1%. Последнее позволяет говорить о принадлежности выделенного

штамма к новому кандидатному роду в порядке *Chloroflexales*.

### 5.1.5 Таксономическое описание ‘*Candidatus Viridilinea mediisalina*’

‘*Candidatus Viridilinea mediisalina*’ (*Viridilinea* [vi.ri.di.li.ne’a. L. adj. *viridis*, зеленый; L. fem. n. *linea*, нить; N.L. fem. n. *Viridilinea*, зеленая, в форме нити] *mediisalina* [me.di.i.sa.li’na. L. adj. *medius*, умеренный; L. fem. adj. *salina*, соленый; N.L. fem. adj. *mediisalina*, умеренно соленая]).

Клетки ‘*Ca. Viridilinea mediisalina*’ имеют диаметр около 1.5 мкм и длину 4.0–6.0 мкм. Они образуют неразветвленные многоклеточные нити различной длины. Нити подвижны. Газовые вакуоли цилиндрической формы располагаются вблизи межклеточных перегородок. Полигидроксиалканоатоподобные и полифосфатоподобные гранулы присутствуют. Хлоросомы присутствуют. Клетки образуют зеленые колонии в агаризованной среде и зеленые биопленки в жидкой среде. Спектр поглощения суспензии клеточных мембран имеет максимумы при 450, 745, 615 и 860 нм, с плечами при 515, 674 и 805 нм. Фотосинтетическими пигментами являются бактериохлорофиллы *c*, *d* и *a*, а также ликопин и  $\beta$ - и  $\gamma$ -каротины. В монокультуре лучший рост наблюдался при 20–25 г/л NaCl, pH 8.0–9.0 и температуре 31–42°C. Рост происходит в анаэробных условиях на свету в присутствии Na-сульфида, Na-бикарбоната и Na-ацетата. Рост отсутствовал в темноте как в аэробных, так и в анаэробных условиях. В геноме отсутствуют гены сульфид:хинон редуктазы и рибулоза-1,5-бифосфат карбоксилазы/оксигеназы. Содержание Г+Ц в ДНК составляет 58.01%. Последовательность генома доступна в Генбанке под номером NQWI00000000.

### 6.1 ‘*Candidatus Viridilinea halotolerans*’ Chok-6 – новая аноксигенная нитчатая фототрофная бактерия из Чокракского источника

Культуру Chok-6 выделили из образца мата, отобранного из соленого Чокракского источника. Культивирование проводили при 28–30°C на свету.

#### 6.1.1 Пигменты клеток

Пигментный спектр *in vivo* бактерии Chok-6 аналогичен спектру Kir15-3F (рис. 10а). На спектре присутствовали максимумы поглощения 457, (520) и 748 нм. Из спектра поглощения клеток видно, что, как и у других хлоросом-содержащих АНФБ, клетки штамма Chok-6 содержали бактериохлорофилл *c* (748 нм), находящийся в составе хлоросом. Бактериохлорофилл *a*, входящий в состав реакционного центра, находился в следовых количествах и не виден на спектре. Максимум поглощения 457 нм также соответствует бактериохлорофиллу *c*. В ацетон-метанольном экстракте выявлены пики 436, 502, 618, 667 нм.

Профиль элюирования ВЭЖХ пигментного экстракта имел 13 сигналов бактериохлорофилла *c* (рис. 10б), 3 сигнала бактериохлорофилла *d* и 1 сигнал бактериохлорофилла *a* (соотношение между которыми 95.2:4.6:0.2% от общего содержания бактериохлорофилла). Каротиноиды клетки включали  $\gamma$ -каротин (48.1%), производное ликопина (4.5%) и  $\beta$ -каротин (47.4%).

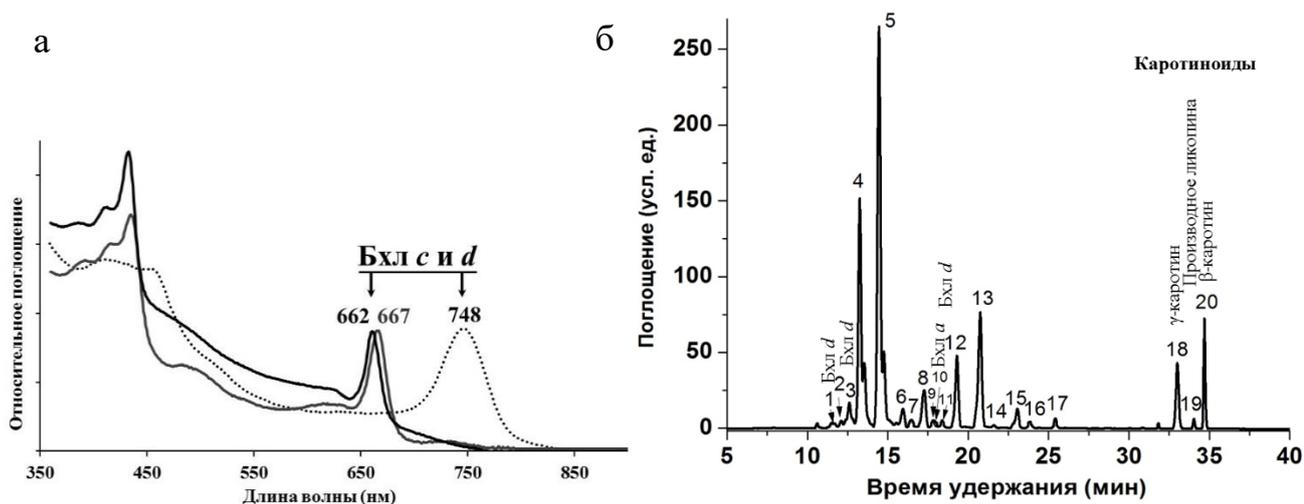


Рисунок 10. Пигментный спектр клеток штамма Chok-6. Спектр поглощения мембранного экстракта в 50% глицерине (пунктирная линия), ацетон-метаноле (серая линия) и петролейном эфире (черная сплошная линия) (а). ВЭЖХ хроматограмма пигментов, экстрагированных в ацетон-метаноле (7:2, об./об.), детектированная при 360–800 нм. Идентификация пиков: 1, 3, 11 – бактериохлорофилл *d*; 2, 4-8, 12-17 – бактериохлорофилл *c*; 10 – бактериохлорофилл *a*; 18 –  $\gamma$ -каротин; 19 – производное ликопина; 20 –  $\beta$ -каротин (б). Условные обозначения: Бхл – бактериохлорофилл.

### 6.1.2 Морфологическая характеристика

Выделенный штамм в агаризованной среде образовывал плотное желто-зеленое кольцо в верхней части пробирки. Клетки цилиндрической формы формировали гибкие, не ветвящиеся трихомы переменной длины (рис. 11).

Наблюдалась слабая подвижность трихомов. Диаметр клеток 1.2-1.8 мкм. На электронных микрофотографиях тотальных препаратов разрушенных клеток видны хлоросомы (рис. 11г). На ультратонких срезах видны поверхностные слои клеточной стенки (рис. 11г, д).

### 6.1.3 Физиологические свойства

Бактерия Chok-6 не росла в темноте ни в анаэробных, ни в аэробных условиях. Рост в аэробных условиях не наблюдался. Наилучший рост в монокультуре был при 5–10 г/л NaCl, pH 7.5–8.5 и температуре 31–42°C. Однако из-за отсутствия чистой культуры, мы не могли более точно проанализировать физиологию бактерии. В настоящее время можно только заключить, что штамм Chok-6 является алкалофильной, солеустойчивой, строго мезофильной, анаэробной, фототрофной бактерией.

### 6.1.4 Генетические свойства

Была получена последовательность гена 16S рНК штамма Chok-6 длиной 1461 нуклеотид. Филогенетический анализ на основании гена 16S рНК показал, что Chok-6 образует отдельную кладу на дендрограмме с ближайшей к нему бактерией Kir15-3F (рис. 12). Парное сравнение последовательностей гена 16S рНК показало, что разница в составе последовательностей штаммов Chok-6 и Kir15-3F составляет 2.3%. Средняя нуклеотидная идентичность (ANI) и ДНК-ДНК гибридизация *in silico* (dDDH) по отношению к геному близкородственного штамма ‘*Ca. Viridilinea mediisalina*’

Kir15-3F составляют 81.3% и 27.6%, соответственно, что ниже критериев отнесения к отдельному виду. Это позволяет говорить о принадлежности выделенного штамма к новому кандидатному виду в роде *Viridilinea*.

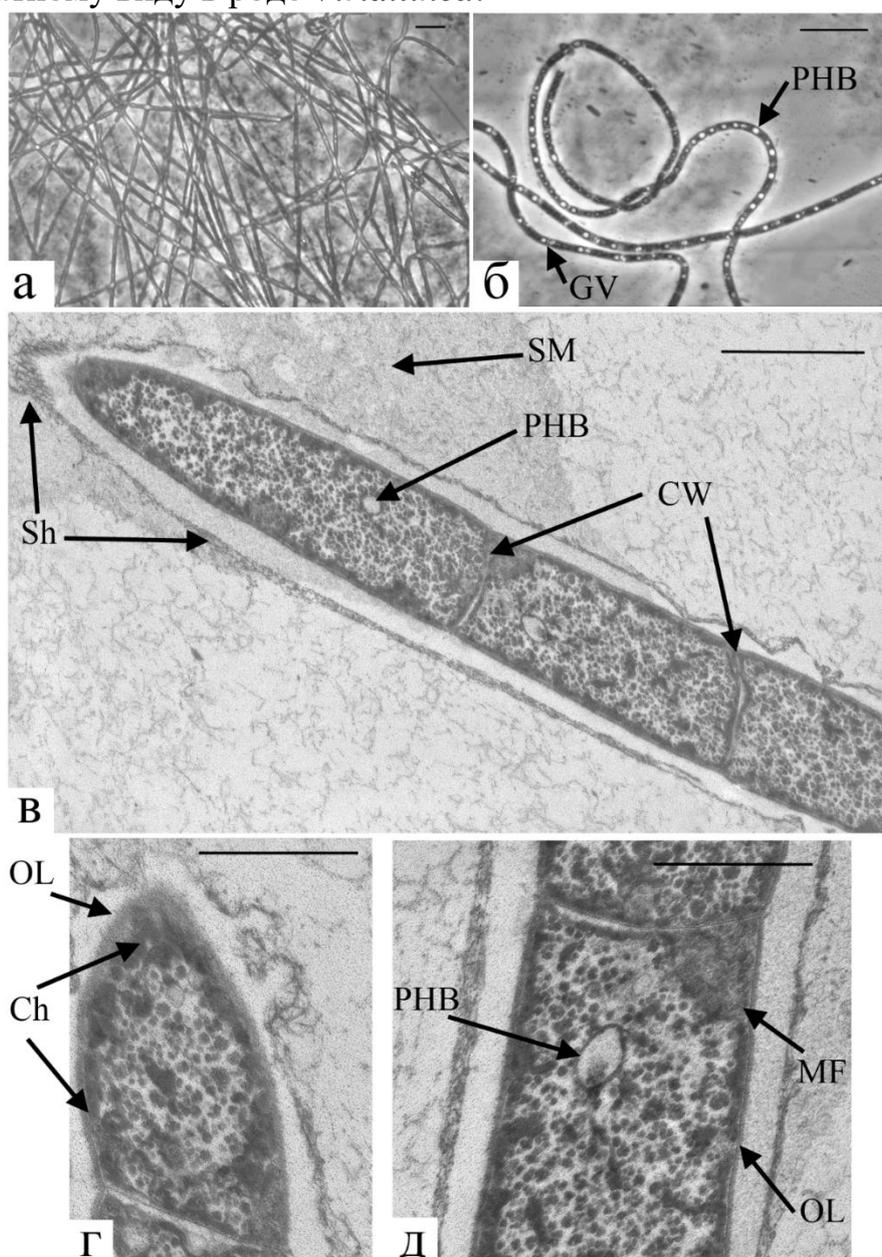


Рисунок 11. Морфология клеток штамма Chok-6. Фазово-контрастная микроскопия препаратов полужидкой культуры: бактериальные нити (а) и газовые везикулы и гранулы PHB в клетках (б). Трансмиссионная электронная микроскопия (в-д). Масштаб: 10 (а-б), 1 (с), 0.5  $\mu\text{m}$  (д-е). Условные обозначения: GV – газовые вакуоли; PHB – поли- $\beta$ -гидроксибутират; Sh – чехол; CW – клеточная перегородка; SM – слизистый материал; Ch – хлоросомы; OL – внешний слой клеточной стенки; MF – формирование мезосомы.

Последовательность генома штамма Chok-6 содержит все необходимые гены для биосинтеза бактериохлорофилла *a*, *d* и *c*, в том числе отсутствующие у *Oscillochloris trichoides* *acsF* и отсутствующие у представителей рода *Chloroflexus* *bchQ* и *bchR*. Гены фиксации азота *NifHBDK* присутствуют, но *nifEN* и *nifV* отсутствуют. Среди АНФБ, кроме представителей *Viridilinea*, подобный кластер генов присутствует у представителей родов *Roseiflexus* и *Oscillochloris*.

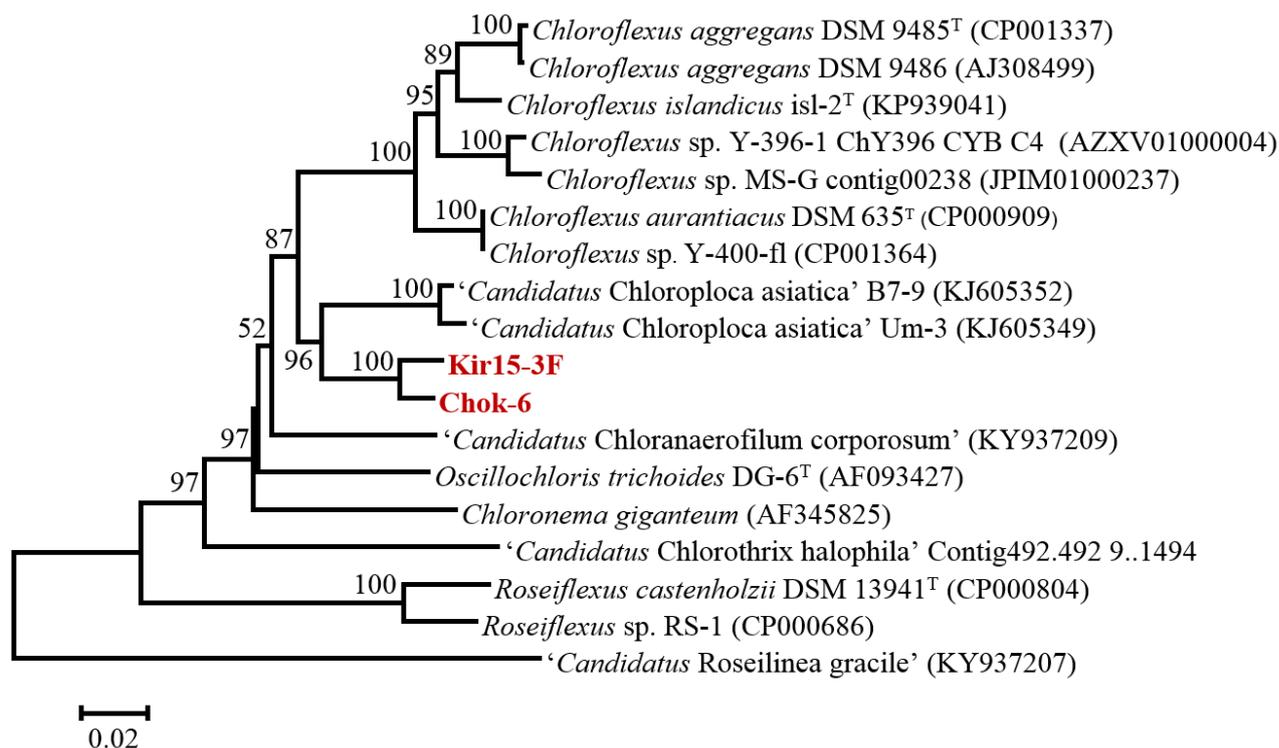


Рисунок 12. Филогенетическое положение штаммов Chok-6 и Kir15-3F. Дендрограмма построена на основании анализа 1231 позиций в нуклеотидных последовательностях гена 16S рРНК. Статистическая достоверность ветвления установлена на основании построения 500 альтернативных дендрограмм с помощью метода Maximum Likelihood.

### 6.1.5 Таксономическое описание 'Candidatus Viridilinea halotolerans'

'Candidatus Viridilinea halotolerans' (ha.lo.to'le.rans. Gr. n. *hals*, соль; L part. *tolerans*, толерантный; N.L. part. adj. *halotolerans*, толерантный к высоким концентрациям соли).

Клетки 'Candidatus Viridilinea halotolerans' имеют диаметр около 1.2-1.8 мкм. Они образуют неразветвленные многоклеточные нити различной длины. Нити подвижны. Газовые вакуоли располагаются вблизи межклеточных перегородок. Гранулы поли-β-гидроксibuтирата присутствуют. Хлоросомы присутствуют. Клетки образуют зеленое кольцо в пробирке в агаризованной среде и зеленые биопленки в жидкой среде. Спектр поглощения суспензии клеточных мембран имеет максимумы при 457, (520) и 748 нм. Фотосинтетическими пигментами являются бактериохлорофиллы *c*, *d* и *a*, а также β- и γ-каротины и производное ликопина. В монокультуре лучший рост наблюдался при 5–10 г/л NaCl, pH 7.5–8.5 и температуре 31–42°C. Рост происходит в анаэробных условиях на свету в присутствии Na-сульфида, Na-бикарбоната и Na-ацетата. Рост отсутствовал в темноте как в аэробных, так и в анаэробных условиях. В геноме отсутствуют гены *sox*-системы для окисления тиосульфата, но присутствует ген сульфид:хинон редуктазы для окисления сульфида и присутствуют гены 3-гидроксипропионатного цикла ассимиляции CO<sub>2</sub>. Содержание Г+Ц в ДНК составляет 60.4%. Последовательность генома доступна в Генбанке под номером RSAS00000000.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В процессе выполнения диссертационной работы были исследованы условия формирования микробных матов и биопленок в мелководных соленоводных водоемах различного происхождения: в содовом озере Киран, приполярных озерах лагунного типа Кандалакшского залива Белого моря, в холодных и мезотермальных серных источниках Крыма и Дагестана.

В сапропелевом содовом озере Киран (минерализация 35 г/л, рН 9.2-9.3) ключевую экологическую роль играл стабильный щелочной рН. Сформированные на поверхности оседающего планктона микробные маты в озере Киран играли заметную роль в образовании сапропеля. Преобладающие в озере виды фототрофных бактерий встречаются только в содовых озерах. Зеленые серобактерии, как и в других содовых озерах, отсутствовали. Впервые в составе матов содового озера обнаружено массовое развитие алкалофильной АНФБ, определенной как новый род и новый вид '*Ca. Viridilinea mediisalina*'. По представлениям Г.А. Заварзина эпиконтинентальные содовые озера, подобные озеру Киран, являлись особыми центрами формирования микробного разнообразия.

Микробные маты и биопленки солевых маршей и литоральных зон озер, имевших связь с Кандалакшским заливом Белого моря, содержали умеренно галофильные и галотолерантные виды АФБ. Это можно объяснить относительно невысокой минерализацией вод Кандалакшского залива и отшнурованных лагун и озер. Приполярные бентосные сообщества имеют короткий период вегетации и подвержены стрессовым воздействиям низких температур и замораживанию. Между тем, обнаруженные виды АФБ в своем большинстве являются мезофилами. Комплекс условий в литорали Кандалакшского залива и связанных с ним озер и солевых маршей приближается к состоянию океана среднего Протерозоя в постледниковый период 2.4 млрд. лет назад. Следует отметить полное отсутствие пурпурных серобактерий семейства *Ectothiorhodospiraceae*, часто встречающихся в южных и средних широтах. В результате анализа полученных нами и литературных данных, были отмечены космополитные для данного региона виды пурпурных серобактерий. Нами установлено, АНФБ являлись постоянным компонентом беломорских бентосных сообществ. По данным высокопроизводительного секвенирования обнаруженные АНФБ принадлежат к новому роду и новым видам. Работа с выделенными беломорскими культурами АНФБ продолжается.

В литературе имеется мало сведений о видовом составе микробных матов соленых сульфидных источников. Нами установлено, что микробные маты соленых источников побережья озера Чокрак и Берикейских источников по составу идентичны микробным матам лагун морского происхождения. В них обнаружены галофильные виды пурпурных бактерий, в том числе экстремально галофильные виды. Как в холодных, так и теплых источниках в значительном количестве присутствовали ЗСБ рода *Prosthecochloris*, который широко распространен в водоемах морского происхождения. В природных образцах (при температуре 44-50°C) из Берикейских источников с соленостью 78-97 г/л обнаружено присутствие галофильных АНФБ.

Данные высокопроизводительного секвенирования определили присутствие в Чокракских источниках двух АНФБ, одна из которых находилась в кластере с экстремально галофильной нитчатой зеленой бактерией '*Ca. Chlorothrix halophila*'.

Выделенная культура АНФБ из Чокракского холодного источника с умеренной соленостью идентифицирована нами как новый вид рода *Viridilinea* – ‘*Ca. Viridilinea halotolerans*’. На основании этого можно сделать вывод об эволюционной неоднородности представителей рода *Viridilinea*. В него входят алкалофильные бактерии, обитающие в содовых озерах, и талассофильные, живущие в хлоридно-натриевых водоемах с рН близким к нейтральному значению.

Таким образом, наши исследования расширили представления о биоразнообразии не только АНФБ, но и определили особенности микробных сообществ соленых водоемов разного типа.

## ВЫВОДЫ

1. Впервые, с использованием молекулярных методов идентификации, исследован таксономический состав бентосных фототрофных сообществ содового озера Киран (Восточная Сибирь), солевых маршей и отшнурованных от Белого моря озер и двух типов мезотермальных соленых источников. Установлено, что аноксигенные нитчатые фототрофные бактерии (АНФБ) являются типичным компонентом бентосных фототрофных сообществ соленоводных водоемов с признаками «сульфурета» и занимают экологическую нишу строго анаэробных сульфидофильных фототрофов, конкурируя с пурпурными и зелеными серобактериями.

2. АФБ адаптированы к комплексу условий в конкретных экосистемах: в содовом озере Киран в микробных матах преобладают алкалогалофильные виды, в солевых маршах и литорали озер Кандалакшского залива Белого моря доминируют нейтрофильные АФБ. А микробные маты холодных и мезотермальных соленых серных источников по видовому составу АФБ близки к фототрофным сообществам, существующим в морских или гиперсоленых лагунах.

3. Исследование новых местообитаний привело к обнаружению новых АНФБ. Из микробных матов содового озера Киран и соленого Чокракского источника выделены и описаны два новых вида нитчатых бактерий филума *Chloroflexi*: ‘*Candidatus Viridilinea mediisalina*’ и ‘*Candidatus Viridilinea halotolerans*’. АНФБ нового рода ‘*Viridilinea*’ являются облигатными фототрофами, анаэробами, сульфидофилами, имеют бактериохлорофиллы *a*, *c*, *d* и каротиноидные пигменты. В него входят как алкалофильные виды, обитающие в содовых озерах, так и талассофильные, живущие в хлоридно-натриевых водоемах с рН близким к нейтральному значению.

4. На основании результатов полногеномного секвенирования выделенных АНФБ у новых видов обнаружены ферменты 3-гидроксипропионатного цикла автотрофной фиксации углекислоты и *nifH* ген, участвующий в фиксации азота. При этом у алкалофильного вида ‘*Candidatus Viridilinea mediisalina*’, в отличие от ‘*Candidatus Viridilinea halotolerans*’, не обнаружен фермент сульфид-хинон-оксидоредуктаза, осуществляющий окисление сульфида.

5. Проведенные исследования природных образцов и выделенных культур филума *Chloroflexi* расширили представления об экологии и биоразнообразии АНФБ в микробных матах и биопленках соленых водоемов разного типа.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### *Экспериментальные статьи:*

1. **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. – № 2. – P. 211-220. DOI: 10.1007/s00792-017-0989-0
2. **Burganskaya E.I.**, Bryantseva I.A., Krutkina M.S., Grouzdev D.S., Gorlenko V.M. Bacterial communities of the microbial mats of Chokrak sulfide springs // *Archives of Microbiology*. – 2019. – V. 201. – №6. – P. 795-805. DOI: 10.1007/s00203-019-01648-6
3. Grouzdev D.S., **Burganskaya E.I.**, Krutkina M.S., Sukhacheva M.V., Gorlenko V.M. Genome sequence of “*Candidatus Viridilinea halotolerans*” Chok-6, isolated from a saline sulfide-rich spring // *Microbiol. Resour. Announc.* – 2019. – V. 8. – № 4. – e01614-18. DOI: 10.1128/MRA.01614-18
4. Gaisin V.A., **Burganskaya E.I.**, Grouzdev D.S., Ashikhmin A.A., Kostrikina N.A., Bryantseva I.A., Kozaeva V.V., Gorlenko V.M. ‘*Candidatus Viridilinea mediisalina*’, a novel phototrophic Chloroflexi bacterium from a Siberian soda lake // *FEMS Microbiology Letters*. – 2019. – V. 366. – № 5. – fnz043. DOI: 10.1093/femsle/fnz043
5. Горленко В.М., **Бурганская Е.И.**, Брянцева И.А. Фототрофные сообщества высокоминерализованных мезотермальных сульфидных Берикейских источников (Дагестан) // *Микробиология*. – 2019. – Т. 88. – № 2. – С. 154-164. DOI: 10.1134/S0026365619020046
6. **Бурганская Е.И.**, Груздев Д.С., Круткина М.С., Горленко В.М. Бактериальные сообщества микробных матов супралиторали Белого моря и литорали отделившихся от моря озер // *Микробиология*. – 2019. – Т. 88. – № 5. – С. 568-582. DOI: 10.1134/S0026365619050033

### *Тезисы конференций:*

1. **Бурганская Е.И.** Фототрофные бактерии высокоминерализованного озера Киран (оз. Солёное) // *Автотрофные микроорганизмы: 5-й Всероссийский симпозиум с международным участием. 21–24 декабря 2015 г. Москва, МГУ имени М.В. Ломоносова. Биологический факультет. М.: МАКС Пресс, 2015. – с. 192.*
2. Gaisin V.A., Bryantseva I.A., **Burganskaya E.I.**, Ashikhmin A.A., Makhneva Z.L., Kuznetsov B.B., Gorlenko V.M. Photosynthetic pigments of new halotolerant green filamentous anoxygenic phototrophic bacterium // *The 17th International Congress on Photosynthesis Research, 7-12 August, 2016, Maastricht, The Netherlands. Abstract book – p. 191-192.*
3. **Бурганская Е.И.**, Гайсин В.А., Брянцева И.А. Новая аноксигенная нитчатая фототрофная бактерия из высокоминерализованного озера Киран // *XI Молодежная школа–конференция с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии», Москва, 1-2 ноября 2016 г. М.: МАКС Пресс, 2016. – с. 37-39.*
4. Гайсин В.А., Брянцева И.А., Калашников А.М., Груздев Д.С., **Бурганская Е.И.**, Сухачева М.В., Волынчикова Е.А., Кузнецов Б.Б. и Горленко В.М. Новые мезофильные аноксигенные нитчатые фототрофные бактерии // *XI Молодежная школа–конференция с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии», Москва, 1-2 ноября 2016 г. М.: МАКС Пресс, 2016. – с. 42-43.*
5. **Burganskaya E.I.**, Gaisin V.A., Barkhutova D.D., Bryantseva I.A., Grouzdev D.S., Gorlenko V.M., Kuznetsov B.B. Phototrophic bacteria in microbial mats of mineralized Kiran Lake (Siberia) // *13th International Conference on Salt Lake Research, 21-25 August, 2017, Ulan-Ude, Russia. – p. 76.*
6. **Бурганская Е.И.**, Гайсин В.А., Брянцева И.А., Груздев Д.С., Горленко В.М. Фототрофное сообщество холодных сульфидсодержащих Чокракских источников // *XII Молодежная школа–конференция с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии», Москва, 9-10 ноября 2017 г. М.: МАКС Пресс, 2017. – с. 22-23.*