УДК 579.266.4, 579.2.08

СУЛЬФАТРЕДУЦИРУЮЩИЕ БАКТЕРИИ ЧЕРНОГО МОРЯ – ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СООБЩЕСТВ ВОДНОЙ ТОЛЩИ И ДОННЫХ ОСАДКОВ

А. Л. Брюханов[1,2], В. А. Корнеева[1], Е. Е. Захарова[2], Н. В. Пименов[2]

[1]Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва, РФ, brjuchanov@mail.ru

[2]Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Институт микробиологии им. С. Н. Виноградского, Москва, РФ

С использованием молекулярно-биологических, биохимических и микробиологических методов детально изучен филогенетический состав сообществ сульфатредуцирующих бактерий в водной толще (континентальный склон в районе г. Геленджика) и донных осадках (Голубая бухта г. Севастополя) Черного моря. Из кислородсодержащих подповерхностных вод Черного моря впервые выделена чистая культура сульфатредуцирующей бактерии, описанной как новый вид *Desulfofrigus euxinos*.

Ключевые слова: молекулярная экология, Черное море, хемоклин, микробные маты, сульфатредуцирующие бактерии, ген *dsrB*.

К сульфатредуцирующим бактериям (СРБ) относят строго анаэробные микроорганизмы, получающие энергию при окислении различных, преимущественно низкомолекулярных, органических соединений или молекулярного водорода, что сопряжено с восстановлением сульфатов до сероводорода. Исследования последних лет показали, что многие виды СРБ способны выдерживать длительное воздействие кислорода. Их аэротолерантность обусловлена наличием поведенческих и ферментативных механизмов противостояния окислительным стрессам. К первым относят формирование скоплений клеток, симбиозы с гетеротрофными аэробными бактериями и отрицательный аэротаксис. Ферментативное восстановление кислорода происходит при помощи различных электрон-транспортных цепей (ЭТЦ). Помимо классических ферментов антиокислительной защиты, свойственных аэробным организмам (супероксиддисмутазы, каталазы и пероксидаз), СРБ обладают также уникальными ферментами, функционирующими как супероксидредуктазы и НАДН-зависимые пероксидазы [1], что позволяет им занимать различные экологические ниши, периодически подвергающиеся воздействию кислорода (прибрежные донные осадки, циано-бактериальные маты, биоплёнки и т.д.).

Черное море – крупнейший в мире меромиктический водоем, где аэробные воды доходят до глубин 90-160 м. Ниже кислородсодержащей зоны водная толща содержит сероводород, концентрация которого на глубинах 1500-2000 м достигает 370 мкМ. Сероводородное заражение черноморских вод происходит, главным образом, за счет бактериальной сульфатредукции в водной толще; получены также количественные оценки масштабов этого процесса в анаэробных водах моря [2]. С использованием методов молекулярной экологии подтверждено присутствие СРБ в анаэробной водной толще, а также в зоне хемоклина [3, 4], но филогенетический состав сообществ черноморских СРБ оставался не выясненным. До недавнего времени не было информации и о возможности протекания сульфатредукции в подповерхностной водной толще, несмотря на то, что в аэробных водах моря обнаружены восстановленные серные соединения [5].

Исследования струйных газовыделений в акватории г. Севастополь дали первые количественные оценки интенсивностей микробных процессов образования и окисле-

ния метана, а также сульфатредукции, обогащенных в верхних слоях органическим веществом осадочных отложений [6]. По всей видимости, в центре площадок газовыделений создаются сильно восстановленные условия, способствующие активным процессам сульфатредукции и метаногенеза (при исчерпании сульфатов) и формированию газонасыщенных илов с устойчивым потоком H_2S и CH_4 в водную толщу. Обводнённость и мелкодисперсность таких илов способствуют удержанию газов в осадочных слоях.

Целью нашей работы было детальное изучение филогенетического разнообразия сообществ СРБ в верхней водной толще и прибрежных донных осадках Черного моря с использованием комплекса молекулярно-биологических, биохимических и традиционных микробиологических методов.

Материал и методы. Пробы воды отбирали на станции с глубиной 1300 м на континентальном склоне в 9 милях от Голубой бухты г. Геленджика (44^o.458N, 37^o.882E), а пробы донных осадков – на станции с глубиной 5 м в Голубой бухте г. Севастополя. Измерение скоростей сульфатредукции проводили радиоизотопным методом с использованием $^{35}S\text{-}SO_4^{2-}$. Первичный филогенетический анализ осуществляли с помощью флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) с 16SpРНК-специфичными зондами на эпифлуоресцентном микроскопе Axio Imager.D1 («Carl Zeiss»). Для отделения клеток СРБ, обитающих в крупных взвешенных частицах, от клеток свободноживущих СРБ пробы воды (по 5 л) последовательно фильтровали через стекловолоконные (GF/C, диаметр пор ≥1,2 мкм) и мембранные (диаметр пор 0,22 мкм, «Millipore») фильтры. ДНК с разрушенных в жидком азоте фильтров выделяли с использованием набора Genomic DNA Purification Kit («Fermentas»). Осуществляли прямые и вложенные ПЦР с праймерами, специфичными к участку гена *dsrB* (кодирующего β-субъединицу диссимиляционной сульфитредуктазы – ключевого фермента метаболизма всех СРБ) и участкам гена 16SpРНК шести основных филогенетических подгрупп СРБ. Анализ количества копий гена *dsrB* проводили методом количественной ПЦР в реальном времени. Смесь продуктов ПЦР-амплификации участка гена *dsrB* разделяли с помощью денатурирующего градиентного гель-электрофореза (ДГГЭ). Секвенирование фрагментов ДНК, выделенных и реамплифицированных с праймеров DSRp2060F и DSR4R из отдельных ДГГЭ-полос, проводили на автоматическом генетическом анализаторе ABI Prism 3130 («Applied Biosystems»). Филогенетические дендрограммыпо гену *dsrB*строили с использованием пакета программ TREECONW и референтных последовательностей из GenBank. Для культивирования СРБ использовали жидкую питательную среду Видделя для морских форм СРБ.

Результаты и обсуждение. В анаэробных водах Черного моря на глубинах 190–400 м наблюдали высокие скорости сульфатредукции, до 0,8 мкмоль/(л × сутки). Однако максимумы этого процесса обнаружены не только в верней части хемоклина на глубине 150 м (1,06 мкмоль/(л × сутки)), но также и в аэробной зоне на глубине 100–110 м (0,76–1,01 мкмоль/(л × сутки)) и даже в подповерхностном слое воды.

Методом FISH на глубине 30 м в аэробной зоне (содержание O_2 – 300 мкМ) были обнаружены клетки СРБ родов *Desulfotomaculum*, *Desulfovibrio* и *Desulfobacter*. В зоне хемоклина доминирующей филогенетической подгруппой СРБ, выявленной с помощью FISH, оказались представители рода *Desulfomicrobium* [7]. 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. Абсолютная численность СРБ была в диапазоне 0,17–15,66 × 10^3кл./мл, постепенно увеличиваясь от поверхности к анаэробным водам.

Для подтверждения результатов, полученных методом FISH, выявляющим только метаболически активные клетки, нами исследован филогенетический состав сообществ СРБ с помощью более чувствительного метода ПЦР. С использованием вложенной ПЦР показано присутствие участков гена 16SpРНК представителей подгрупп *Desulfococcus-Desulfonema-Desulfosarcina* и *Desulfovibrio-Desulfomicrobium* на всех исследованных глубинах – от 30 до 200 м, 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) Черного моря.

По гену *dsrB* получены ДГГЭ-профили сообществ СРБ верхней водной толщи Черного моря с различных глубин. Большая часть кодируемых геном *dsrB* аминокислотных последовательностей из проб подповерхностной водной толщи формировала отдельный кластер на филогенетической дендрограмме, для которого в базе данных GenBank не обнаружено аналогичных последовательностей (с гомологией выше 87%) ни среди описанных видов СРБ, ни среди некультивируемых СРБ из разных местообитаний. Наиболее близким к этому кластеру (с гомологией 85%) оказался ген *dsrB* некультивируемой СРБ из покмарка Норвежского моря. Два образовавшихся кластера по гену *dsrB* включали в себя черноморских СРБ из кислородсодержащих подповерхностных вод (30 м), холодного промежуточного слоя (100 м), хемоклина (145 м) и верхних анаэробных вод (200 м). Наиболее близкой по гомологии к этим кластерам оказалась некультивируемая СРБ из глубоководных осадков Нанкайского желоба (Японское море). Еще один кластер из двух аминокислотных последовательностей (пробы с глубин 30 и 200 м) имел наибольшую гомологию с геном *dsrB* некультивируемых СРБ, обнаруженных в местах коррозии портовых сооружений на атлантическом побережье Франции и принадлежащих к семейству Desulfobacteraceae [8].

В восстановленных донных осадках из Голубой бухты г. Севастополя, где процесс сульфатредукции может быть сопряжен с анаэробным окислением метана, обнаружено, что ген *dsrB* присутствует в пробах ДНК, выделенных как из опытных (бактериальные маты сульфурет), так и из контрольных (близлежащие донные осадки) образцов. По данным ДГГЭ, разнообразие СРБ в зонах высачивания метана заметно выше, чем в осадках, расположенных за пределами газонасыщенных илов. Анализ транслированных аминокислотных последовательностей показал, что в бактериальных матах присутствовали последовательности гена *dsrB*, наиболее сходные (90-99% гомологии) с геном *dsrB* представителей родов *Desulfovibrio* и *Desulfobacter*, а также некультивируемых СРБ из месткоррозии портовых сооружений на атлантическом побережье Франции и морских осадков у побережья Дании.

Из водных проб, отобранных с глубины 30 м континентального склона, нами впервые выделена в чистую культуру черноморская СРБ [9], охарактеризованная на основании генетического и физиолого-биохимического анализа как новый вид рода *Desulfofrigus – D. euxinos* SrB-30 (от древнегреческого названия Черного моря *Eúxeinos Póntos*). Данная грамотрицательная неспорообразующая бактерия обладает ключевыми ферментами антиокислительной защиты, включая компоненты ЭТЦ восстановления кислорода, характерными для аэротолерантных СРБ.

Выводы. В подповерхностных аэробных водах Черного моря обнаружены СРБ, принадлежащие к филогенетическим подгруппам *Desulfotomaculum*, *Desulfococcus-Desulfonema-Desulfosarcina*, *Desulfovibrio-Desulfomicrobium* и *Desulfobacter*. Доля СРБ в верхней водной толще моря составляла от 0,065 до 9% от числа клеток всех микроорга-

низмов. По транслированным аминокислотным последовательностям гена *dsrB* СРБ из водной толщи и донных осадков Черного моря имели наибольшую гомологию с некультивируемыми СРБ из различных морских местообитаний. Впервые выделенная из кислородсодержащих вод Черного моря чистая культура СРБ была полностью охарактеризована и описана как новый аэротолерантный вид *Desulfofrigus euxinos* SrB-30.

Благодарности. Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ № 10-04-00220-а, 12-04-91052-НЦНИ_а (PICS #6041), 14-04-90400-Укр_а и гранта CarlZeiss.

1. Brioukhanov A.L., Pieulle L., Dolla A. Antioxidative defense systems of anaerobic sulfate-reducing microorganisms // *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology. Microbiology Book Series* / ed. A. Mendez-Vilas; Formatex Research Center. Badajoz, 2010. V. 1. P. 148–159.
2. Леин А.Ю., Иванов М.В., Вайнштейн М.Б. Баланс сероводорода в глубоководной зоне Черного моря // *Микробиология*. 1990. Т. 59, вып. 4. С. 656–665.
3. Vetriani C., Tran H.V., Kerkhof L.J. Fingerprinting microbial assemblages from the oxic/anoxic chemocline of the Black Sea // *Appl. Environ. Microbiol.*2003. V.69, no. 11.P.6481–6488.
4. Neretin L.N., Abed R.M., Schippers A., Schubert C.J., Kohls K., Kuypers M.M. Inorganiccarbon fixation by sulfate-reducing bacteria in the Black Sea water column// *Environ. Microbiol.*2007. V. 9, no. 12. P. 3019–3024.
5. Волков И.И., Розанов А.Г., Демидова Т.П. Зимнее состояние экосистемы открытой части Черного моря // *Соединения неорганической восстановленной серы и растворенный марганец в воде Черного моря* / ред. М.Е. Виноградов; ИО РАН. Москва, 1992. С.38–50.
6. Пименов Н.В., Егоров В.Н., Канапацкий Т.А., Малахова Т.В., Артемов Ю.Г., Сигалевич П.А., Малахова Л.В. Микробные процессы круговорота метана и сульфатредукция в осадках акватории Севастопольских бухт // *Микробиология*. 2013. Т. 82, вып. 5. С. 1–11.
7. 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, вып. 1. С. 112–120.
8. 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 // *Aquat. Microb.Ecol*. 2016 (in press).
9. Захарова Е.Е., Корнеева В.А., Брюханов А.Л., Пименов Н.В. Психрофильная сульфатредуцирующая бактерия из аэробных вод Черного моря // *Микробиология.* 2012. Т. 81, вып. 6. С.812–814.

SULFATE-REDUCING BACTERIA IN THE BLACK SEA – PHYLOGENETIC ANALYSIS OF COMMUNITIES FROM THE WATER COLUMN AND BOTTOM SEDIMENTS

A. L. Bryukhanov[1,2], V. A. Korneeva[1], E. E. Zakharova[2], N. V. Pimenov[2]

[1]Lomonosov Moscow State University, Moscow, RF, brjuchanov@mail.ru

[2]Research Center of Biotechnology, RAS, Winogradsky Institute of Microbiology, Moscow, RF

The phylogenetic composition of sulfate-reducing bacterial communities in the Black Sea water column (continental slope in the Gelendzhik area) and bottom sediments (the Blue Bay, Sevastopol) was studied in detail using molecular biological, biochemical and microbiological techniques. A sulfate-reducing bacterium designated *Desulfofrigus euxinos* was isolated as a pure culture and described for the first time from oxygenated subsurface waters of the Black Sea.

Keywords: molecular ecology, the Black Sea, chemocline, microbial mats, sulfate-reducing bacteria, *dsrB* gene