

На правах рукописи

МАМАЕВА Елена Васильевна

**ИССЛЕДОВАНИЕ ПРИРОДНЫХ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ
ДОННЫХ ОСАДКОВ ШЕЛЬФА КАРСКОГО МОРЯ, ЕНИСЕЙСКОГО
ЗАЛИВА И ГЫДАНСКОЙ ГУБЫ**

03.02.08. –Экология
(биологические науки)

АВТОРЕФЕРАТ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Иркутск – 2016

Работа выполнена в лаборатории микробиологии углеводов в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Лимнологическом институте Сибирского отделения Российской академии наук, г. Иркутск

Научный руководитель: доктор биологических наук,
Земская Тамара Ивановна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук,
Бузолева Любовь Степановна
Профессор кафедры биохимии, микробиологии и биотехнологии школы естественных наук ФГАОУ ВПО «Дальневосточный федеральный университет», г. Владивосток

доктор биологических наук,
Рогозин Денис Юрьевич
Доцент, ст. научный сотрудник лаборатории биофизики экосистем ФГБУН «Институт биофизики СО РАН», г. Красноярск

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», г. Москва

Защита диссертации состоится 17 марта 2016 г. в 16.00 часов на заседании диссертационного совета Д 212.074.07 при ФГБОУ ВПО «Иркутский государственный университет» по адресу 664003, г. Иркутск, ул. Сухэ-Батора, 5, Байкальский музей им. профессора М.М. Кожова (ауд. 219).

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБОУ ВПО «Иркутский государственный университет» по адресу: 664003, г. Иркутск, бульвар Гагарина, 24, и на сайте ИГУ: <http://isu.ru/ru/science/boards/dissert/dissert.html?id=60>

Отзывы просим направлять ученому секретарю диссертационного совета по адресу: 664003, г. Иркутск, ул. Карла Маркса, 1, Биолого-почвенный факультет. Тел/факс: (3952) 241855; e-mail: dissovet07@gmail.com.

Автореферат разослан 26 января 2016 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук,
доцент



Приставака Алексей Александрович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследований. Процессы, происходящие в арктических регионах, привлекают пристальное внимание исследователей в течение последних десятилетий. Изучение биогеохимических процессов шельфовых морей связано с необходимостью прогнозирования последствий освоения запасов углеводородов в арктической зоне (Безопасность России., 2000). Высокоширотные экосистемы являются очень чувствительными к климатическим и антропогенным факторам, и медленно восстанавливаются (Арктика на пороге., 2000). Учитывая, что более 70 % всего арктического шельфа принадлежит России, исследования этого региона в нашей стране поддерживаются рядом национальных и международных программ.

Карское море является частью Арктического бассейна и его роль в формировании среды всей Арктики исключительно велика. Море является важным поставщиком дрейфующих льдов и осадочного материала в Центральную Арктику вследствие поступления в это шельфовое море до 40 % пресной воды с мощным материковым стоком рек Оби и Енисея. Вместе с речной водой в Карское море поступает до 35 % органического вещества и биогенных элементов (Лисицын и др., 1994; Мошаров и Мошарова, 2010). Большая часть привносимого материала осаждается вблизи прибрежной зоны (Лисицын, 1994), в открытое море попадает лишь небольшой процент от всего поступающего со стоком органического вещества. В этой зоне взаимодействия морской воды и поверхностного материкового стока образуется маргинальный фильтр Карского моря, где показано наличие активных процессов трансформации воды (Лисицын, 1974, 1994; Емельянов, 1998; Гордеев, 2004), активно развиваются фито- и бактериопланктон, а также бентосные организмы (Мицкевич и др., 1994; Ведерников и др., 1994; Антипова, Семенов, 1989; Сажин и др., 2010).

Исследования разнообразия природных сообществ микроорганизмов донных осадков в данном регионе ранее были проведены методами культивирования и микроскопии. Однако до настоящего времени, результатов работ по исследованию молекулярно-генетической структуры микробных сообществ донных осадков шельфа Карского моря, Енисейского залива и Гыданской губы методами анализа рибосомных и функциональных генов не опубликовано. В литературе имеются данные аналогичного плана в других регионах Арктики и Антарктики (Baldwin, 2005; Bowman, 2003; Koch et al., 2009; Lie et al., 2015). Принимая во внимание недостаточную изученность микробных сообществ полярных регионов, полученные данные дополняют исследования по изучению разнообразия микроорганизмов континентальных арктических морей и

позволяют оценить роль микроорганизмов в исследуемой арктической экосистеме с учетом их метаболического потенциала.

Цель работы: исследовать разнообразие природных микробных сообществ донных осадков шельфа Карского моря, Енисейского залива и Гыданской губы, находящихся под влиянием рек Енисей, Гыда и Юрибей, выделить доминирующие таксоны и в экспериментальных условиях оценить их метаболический потенциал.

Задачи исследования:

1. Установить таксономический статус культивируемых микроорганизмов, выделенных из донных осадков шельфа Карского моря и прилегающих заливов, с использованием анализа нуклеотидных последовательностей фрагментов гена 16S рРНК.

2. Исследовать таксономическое разнообразие природного микробного сообщества донных осадков шельфа Карского моря и прилегающих заливов с учетом минерализации поровых вод, с использованием двух методов секвенирования фрагментов гена 16S рРНК.

3. Выявить наличие в микробных сообществах функциональных генов, отвечающих за основные шаги в деструкции углеводов.

4. В модельном эксперименте изучить способность чистых культур бактерий, изолированных из донных осадков Карского моря, участвовать в деструкции *n*-алканов нефти

Научная новизна работы. Впервые проведена глубокая характеристика состава природных микробных сообществ донных осадков районов шельфа Карского моря, Енисейского залива и Гыданской губы с помощью высокопроизводительного массового параллельного секвенирования на платформе 454 Roche и секвенирования по Сенгеру фрагментов генов 16S рРНК. Полученные результаты значительно расширяют знания о разнообразии микроорганизмов арктических донных осадков, различающихся по компонентному составу и уровню минерализации поровых вод. Установлены доминирующие представители бактерий *Cyanobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* и архей *Thaumarchaeota*, *Crenarchaeota*. Обнаружено, что с изменением градиента солености происходит смена доминирующих таксономических групп в сообществах бактерий и архей. На основе сравнительного анализа фрагментов гена 16S рРНК установлено, что в поверхностном слое донных осадков шельфа Карского моря, Енисейского залива и Гыданской губы преобладают некультивируемые микроорганизмы, нуклеотидные последовательности которых имеют высокую степень сходства с нуклеотидными последовательностями микроорганизмов из морских,

пресноводных и почвенных экосистем, а также из районов, загрязненных углеводородами. Впервые исследовано наличие функциональных генов в микробных сообществах разных районов арктического шельфа. В суммарной ДНК детектировано присутствие генов, ответственных за процессы образования и окисления метана у архей (ген *mcrA*), окисления метана у бактерий (ген *pmoA*) и окисления *n*-алканов у бактерий (ген *alkB*). У двух из семи штаммов, изолированных из донных осадков Карского моря, детектированы гены алкангидроксилазы (*alk*), ответственные за деградацию широкого спектра алканов. В лабораторных экспериментах исследована способность полученных штаммов участвовать в деструкции *n*-алканов нефти. Выявлена высокая (до 80-95%) деструкционная активность смеси микроорганизмов, изолированных из Карского моря и оз. Байкал, в условиях солености 7-15 мг/мл NaCl.

Практическая и теоретическая значимость работы. Данная работа дает представление о разнообразии микробных сообществ донных осадков шельфа Карского моря, Енисейского залива и Гыданской губы, основанное на современных методах высокопроизводительной геномики. Эти данные могут быть использованы как фоновые в мониторинге для оценки воздействия внешних факторов в случае техногенных катастроф. В эксперименте показано, что бактериальные штаммы, изолированные из донных осадков арктического шельфа, менее активны в процессе деструкции *n*-алканов по сравнению с байкальскими бактериями. Их активность увеличивается в общей смеси с байкальскими штаммами в условиях солености 7-15 мг/мл NaCl. Проведенные исследования будут полезны при создании препаратов для биоремедиации нефтяных месторождений в условиях Крайнего Севера. Результаты исследования функциональных генов в сообществах из разных мест могут быть использованы для понимания механизмов деградации углеводородов в экосистемах с низкими температурами. Полученные в работе нуклеотидные и аминокислотные последовательности (JN203043-JN203049, JN203014-JN203042, JN133442-JN133497, JX413060-JX413100, JX441119-JX441299, KT220707-KT220732) и массивы данных пиросеквенирования (SRR1760207 и SRR1805125) зарегистрированы в базе данных NCBI и находятся в открытом доступе, могут быть использованы для сравнительного анализа с последовательностями микроорганизмов из других холодноводных экосистем.

Защищаемые положения:

1. Применение методов массового параллельного секвенирования и метода секвенирования по Сенгеру позволило получить глубокую характеристику состава микробных сообществ, обитающих в осадках шельфа Карского моря и

прилегающих заливов. Разнообразие микробных сообществ в донных осадках районов шельфа Карского моря, Енисейского залива и Гыданской губы, определяется влиянием речного стока рек и воздействием морских водных масс.

2. В составе микробных сообществ донных осадков выявлены представители бактерий и архей, участвующие в деструкции органических веществ и углеводов, в геноме которых установлено присутствие функциональных генов метанмонооксигеназ (*pmoA*), метил-коэнзим М редуктаз (*mcrA*), алкангидроксилаз (*alk*), обеспечивающих разные этапы образования и деструкции углеводов. В лабораторных экспериментах отмечена различная способность штаммов чистых культур, изолированных из донных осадков исследуемых районов, деградировать углеводороды в условиях различной солености.

Апробация работы. Результаты диссертационной работы представлены и обсуждены на 5-ой Верещагиной Байкальской конференции (Иркутск, 2010); 3-ем и 4-м Байкальском Микробиологическом симпозиуме с межд. участием (Иркутск, 2011, 2015); XIX межд. научной конференции (Школе) по морской геологии «Геология морей и океанов» (Москва, 2011); I Всероссийской молодежной конференции «Россия в Арктике. XXI век: среда обитания, общество, освоение» (Томск, 2012); International conference on Arctic Ocean Acidification (Норвегия, Берген, 2013); VI Всероссийском Конгрессе молодых ученых-биологов с межд. участием «Симбиоз-Россия 2013» (Иркутск, 2013).

Личный вклад автора заключается в постановке целей и задач исследований, решении поставленных задач, планировании экспериментов и выполнении исследований, обобщении результатов. Результаты диссертационной работы являются совокупностью многолетних научных исследований, проведенных в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Лимнологическом институте СО РАН лично автором и при его непосредственном участии в качестве ответственного исполнителя. Работа выполнена при поддержке проекта 20.7 программы Президиума РАН.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 10 научных работ, из них 3 статьи в изданиях из Перечня ВАК РФ и 7 тезисов конференций.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, 3 глав, заключения, выводов, списка литературы и приложения, изложена на 154 страницах, содержит 17 рисунков и 8 таблиц. Список литературы включает 300 наименований, из которых 81 отечественных и 219 зарубежных.

Благодарности. Автор выражает искреннюю благодарность и признательность научному руководителю д.б.н. Земской Т.И. за идейное

вдохновение, ценные советы и научно-методическое руководство, к.б.н., доц. Парфеновой В.В., к.б.н. Сусловой М.Ю., к.г.-м.н., Погодаевой Т.В., к.г.н. Томберг И.В., к.г.м. Сорокиковой Л.М., д.б.н., профессору Дрюккеру В.В., к.б.н. Ломакиной А.В., Ханаевой Т.А., к.б.н. Павловой О.Н., к.б.н. Петровой Д.П., к.х.н., доц. Горшкову А.Г., группе пиросеквенирования и биоинформатики отдела Ультраструктуры клетки, сотрудникам лаборатории микробиологии углеводов ЛИН СО РАН за оказанную помощь при выполнении работ и обсуждении результатов.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Приведены литературные данные по экологической характеристике исследуемых районов и истории изучения микробных сообществ Карского моря различными методами. Представлены результаты исследования состава и разнообразия микробных сообществ холодноводных морей.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

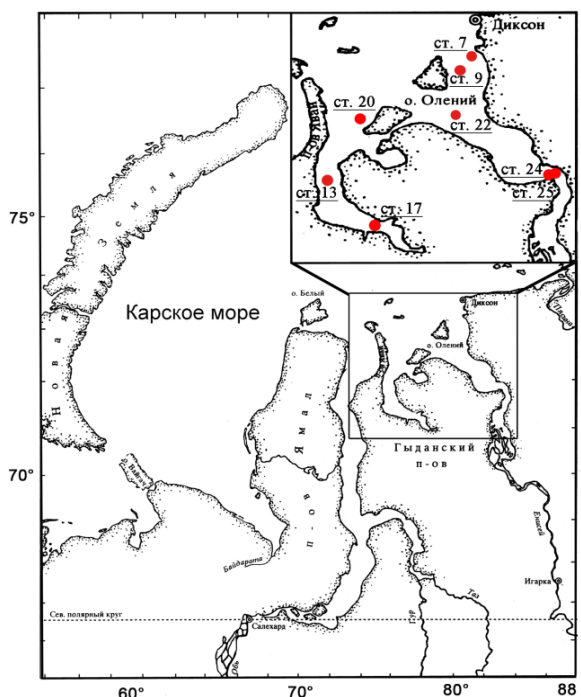


Рис. 1. Схема района и станций отбора проб донных осадков шельфа Карского моря, Енисейского залива и Гыданской губы

2.1. Объекты исследования.

Объектами исследования были сообщества микроорганизмов донных осадков шельфа Карского моря, Енисейского залива и Гыданской губы. Для исследования были отобраны пробы донных отложений на 8 станциях шельфа Карского моря, Енисейского залива и Гыданской губы в ходе экспедиции 2009 г (рис. 1). По уровню минерализации поровых вод станции 17, 24, 25 можно отнести к пресным (от 0.1 до 0.7 г/л), станции 20, 13, 22, 7, 9 к морским (от 8.1 до 30.0 г/л). Отбор осадков осуществляли с помощью гравитационной трубы (ГТ) (до 75 см длинной) на станциях 9, 13, 17, 20 и дночерпателем «Океан» (ДЧ) на станциях 7, 22, 24, 25. Осадок из срединной части керна отбирали асептически и помещали в стерильные пакеты в жидкий азот до проведения молекулярных анализов в лаборатории. Часть

пробы донных осадков использовали для изолирования чистых культур бактерий непосредственно в лаборатории на судне.

2.2. Методы исследований

2.2.1. Микробиологические методы. Выделение микроорганизмов осуществляли на следующих питательных средах: органотрофы – на РПА:10, психрофильные микроорганизмы при 4–6°C на R2A:10 Agar («Fluka Analytical»), спорообразующие бактерии рода *Bacillus* – на молочном агаре (Практикум по микробиологии, 1976) с добавлением 10 мг $MnSO_4 \times 5H_2O$ на 1 л (DSMZ, <http://www.dsmz.de>), споры бацилл – методом пастеризации образца (10 мин при 65°C) с последующим посевом на среду РПА:10 с добавлением $MnSO_4 \times 5H_2O$ (<http://www.dsmz.de>). Фенотипические свойства микроорганизмов исследовали с использованием стандартных методов (Практикум по микробиологии, 2005), ферментативную активность определяли по ранее отработанным методикам (Белькова и др., 2005). Морфологический анализ бактериальных клеток и их фотографирование осуществляли с помощью светового микроскопа AxioStarplus («Carl Zeiss», Германия) и цифровой фотокамеры Pover Shot A640 («Canon», Япония), сканирующего микроскопа FEI Company Quanta 200. Идентификацию выделенных штаммов проводили с помощью определителя Берджи (Крат. спр Берджи, 1980). Спорообразующие грамположительные палочки определяли по схеме, предложенной Дж. Р. Норрисом и соавт. (Практикум по микробиологии, 2005) и определителю Берджи (Schleifer, 2009).

2.2.2. Молекулярные методы. Выделение суммарной бактериальной ДНК и ДНК из чистых культур проводили по методу Рошель (Rochelle, 1992) с добавлением ТЕ-буфера и поливинилпирролидона (PVPP). Для синтеза фрагментов гена 16S рРНК использовали универсальные эубактериальные и архейные праймеры, группы праймеров на гены *pmoA* (Holmes et al., 1995) и *mcrA* (Hales et al., 1996), и 3 группы праймеров на *alk* гены (Sei et al., 2003). Полученные фрагменты гена 16S рРНК суммарной ДНК длиной от 550 до 1300 п.н. были клонированы в плазмидный вектор pGEM-T («Promega»). Лигирование и трансформацию проводили согласно предложенной методике фирмы производителя. Секвенирование продуктов амплификации выполняли в ЦКП СО РАН «Геномика» (г. Новосибирск). Идентификацию полученных фрагментов гена 16S рРНК чистых культур и суммарного микробного сообщества и функциональных генов осуществляли с использованием поисковой программы BLAST сервера NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) (Altschul et al., 1997). Редактирование последовательностей проводили с помощью редактора BioEdit. Филогенетический анализ проводили с

использованием программы MEGA версия 5.0, Neighbor-Joining кластерного метода и Kimura two-parameters алгоритма. Показатель достоверности порядка ветвления (в %) определяли на основании «bootstrap»-анализа 100 альтернативных деревьев. Пиросеквенирование переменных V1-V3 районов гена 16S рРНК образцов суммарной ДНК, выделенной из донных осадков, выполнено на платформе Roche 454 Genome Sequencer FLX Titanium с использованием бактериальных U341F/U515R (Kadnikov et al. 2012) и архейных A2Fa/A519R (Teske and Sørensen, 2008; Kim et al., 2011) праймеров. Для обработки и анализа данных пиросеквенирования использовали программу Mothur, версии v.1.31.2. (Schloss et al., 2009). Полученные последовательности были классифицированы с использованием референсной базы данных последовательностей 16S рРНК SILVA (<http://arb-silva.de> silva) с 80% доверительным порогом в Mothur и проанализированы.

2.2.3. Химические методы исследования. Деградация нефти чистыми культурами. В эксперименте использовали суточные культуры, выращенные на среде РПА. Бактериальные клетки суспендировали в пробирке со стерильной водой, затем 1 мл взвеси помещали в стерильные флаконы объемом 250 мл со 100 мл минеральной среды, добавляли 50 мкл нефти (рис. 2) (Ангарский нефтехимический завод, Россия) и перемешивали в течение 30 сут на орбитальном шейкере «BioSan OS-10» (Латвия) при 90 об/мин при +10°C.

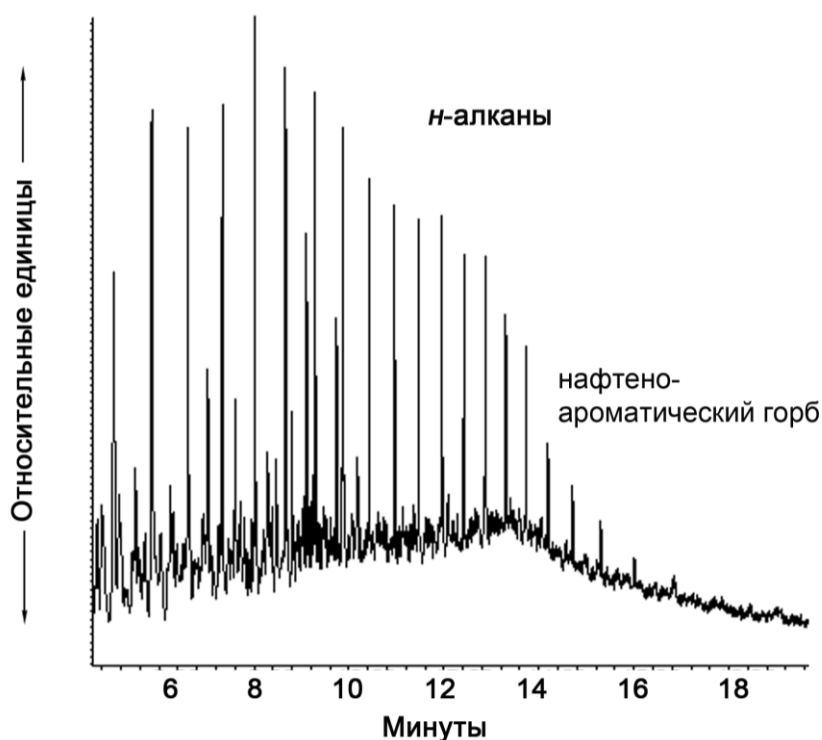


Рис. 2. Хроматограмма нефти, выбранной для проведения модельных экспериментов. Детектирование в режиме полного сканирования масс-спектра.

Штаммы были проверены на способность к деградации *n*-алканов нефти в условиях различной солености. Для проведения эксперимента была приготовлена бактериальная смесь штаммов чистых культур *Bacillus* sp., *Brevibacillus laterosporus*, *Aeromonas piscicola* и *Plantibacter* sp., далее именуемая смесь №1. Для сравнения были взяты чистые культуры байкальских бактерий, изолированных района естественного нефтепроявления м. Горевой Утес (*Microbacterium* sp., *Paenibacillus* sp, *Rhodococcus* sp.) и района грязевых вулканов (К2) Кукуйского каньона (*Rhodococcus* sp.). Байкальские штаммы представлены в эксперименте под смесью №2. Экспериментальная смесь №3 состояла из смесей №1 и №2. Модельный эксперимент проводили в лабораторных условиях на минеральной среде с добавлением нефти в трех сериях, отличающихся видом микробного сообщества. Каждая серия включала образцы с добавлением в среду разных концентраций NaCl (0, 7, 15 и 30 мг/мл), в качестве контроля использовали смесь среды и нефти. В полученные бактериальные смеси добавляли внутренние стандарты для *n*-алканов и полиароматических углеводородов (ПАУ). Определение концентрации *n*-алканов и ПАУ проводили методом хроматомасс-спектрометрии через 3, 8, 15 и 30 сутки на приборе «Agilent, 6890 GC, 5973 MSD». Результаты определения представлены как средние значения двух повторностей.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Исследование культивируемого микробного сообщества донных осадков шельфа Карского моря и прилегающих заливов.

У семи штаммов, изолированных из донных осадков шельфа Карского моря и прилегающих заливов, была определена структура нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК (около 1300 п.н.), которая имела высокий процент сходства (99-100 %) с последовательностями бактерий из различных природных экосистем, как морских, так и пресноводных. Пять штаммов были представлены бактериями филума *Firmicutes* порядка *Bacillales*, два отнесены к семейству *Aeromonadaceae* класса *γ-Proteobacteria* и семейству *Microbacteriaceae* филума *Actinobacteria*. Известно, что представители этих бактерий занимают доминирующее положение в различных экологических нишах, способны производить различные гидролитические ферменты, а также использовать в качестве единственного источника углерода широкий спектр веществ, в том числе углеводороды, представляющие опасность с точки зрения экологии (Garrity, 2005; Kampf, 2010).

3.2. Исследование природного микробного сообщества донных осадков шельфа Карского моря и прилегающих заливов с учетом минерализации поровых вод.

3.2.1. Исследование природного микробного сообщества методом секвенирования по Сенгеру. В результате исследования суммарной ДНК из поверхностного слоя донных осадков пяти станций (ст. 13, 17, 22, 24, 9) получена библиотека клонов, содержащая фрагменты гена 16S рРНК эубактерий и архей длиной до 900 п.н. Методом секвенирования по Сенгеру определено 375 нуклеотидных последовательностей, большая часть которых имеет высокий процент сходства (97-100 %) с некультивируемыми микроорганизмами, выделенными из водной толщи и донных отложений морей, в том числе и холодноводных, а также из почв различных регионов мира. Для подтверждения таксономического статуса были построены филогенетические деревья, где полученные нуклеотидные последовательности были сопоставлены с последовательностями ближайших родственников, в том числе из сходных мест обитания и типовыми штаммами микроорганизмов. Полученные последовательности микроорганизмов принадлежат филумам *Actinobacteria*, *Acidobacteria*, *Cyanobacteria*, *Planctomycetes*, *Spirochaetes*, *Synergistetes*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Verrucomicrobia* и классам α -, β -, γ -, δ -*Proteobacteria*, а также археям филумов *Euryarchaeota*, *Thaumarchaeota* и *Crenarchaeota*.

3.2.2. Исследование природного микробного сообщества на основе данных массового параллельного секвенирования (платформа 454 Roche).

В результате пиросеквенирования гена 16S рРНК суммарной ДНК из образцов осадков ст. 25, ст. 20 и ст. 9 в нашей работе было получено 19240 последовательностей бактерий и 8413 последовательностей архей со средней длиной чтения 180-250 и 370-400 п.н., соответственно (табл. 1). После фильтрации и удаления химер анализировали 14345 бактериальных и 8027 архейных последовательностей. Построенные кривые «Rarefaction» для бактерий и архей показали, что ни в одном из рассматриваемых массивов данные не выходили на плато, по крайней мере, на уровне вида и рода. Наиболее таксономически сложное сообщество бактерий на уровне рода наблюдалось в образце низкоминерализованных осадков ст. 25, о чем свидетельствуют высокие индексы биоразнообразия (табл. 1). Менее сложные сообщества архей характерны для всех исследуемых образцов (табл. 1). Неполная оценка таксономического разнообразия в частности для бактерий, подтверждается значениями покрытия (Good Coverage), которые варьировали от 85.7 до 87.7 %.

Для архей значения покрытия составляли 99 % для каждого образца (табл. 1). Наиболее разнообразный состав сообщества архей (как и для бактерий) был определен для образца ст. 25 (табл. 1).

Таблица 1

Индексы видового богатства и разнообразия (при кластерном расстоянии 0.03) микробных сообществ донных осадков шельфа Карского моря и Енисейского залива

Образец	Число последовательностей	OTE	Chao1	ACE	Shannon index (H')	Simpson's Inverse Index	Good Coverage (%)
Бактерии							
Ст. 9	3919	706	1765.0	3292.0	3.4	3.9	87.7
Ст. 20	3345	705	2084.0	3531.0	4.6	25.0	85.7
Ст. 25	7081	1214	3120.0	5824.0	4.1	8.4	88.5
Археи							
Ст. 9	3248	7	7.0	8.0	0.7	1.8	99.0
Ст. 20	1226	6	9.0	0	0.2	1.1	99.0
Ст. 25	3513	17	72.0	164.0	0.8	1.6	99.0

Для оценки сходства таксономического состава сообществ бактерий и архей были построены диаграммы Венна (рис. 3). Анализ библиотек последовательностей генов 16S рРНК бактерий (рис. 3 А) всех образцов показал, что более 76.1 % в сообществах представлены уникальными ОТЕ, и только 3.9 % являются общими. В их число входят представители филумов *Cyanobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Firmicutes*, *Fusobacteria*.

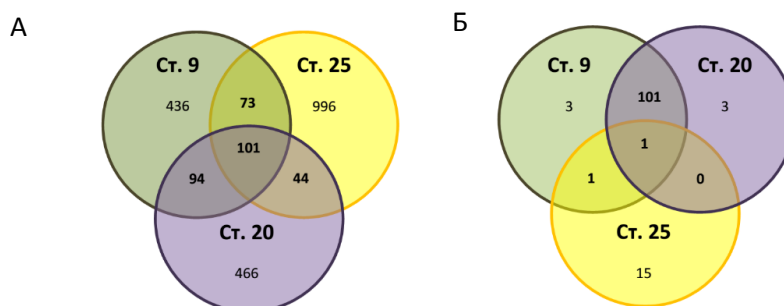


Рис. 3. Диаграммы Венна. Число общих ОТЕ в бактериальных (А) и архейных (Б) сообществах донных осадков шельфа Карского моря и Енисейского залива (при кластерном расстоянии 0.03).

Анализ библиотек генов 16S рРНК архей показал (рис. 3 Б), что 70% ОТЕ в сообществах являются уникальными и из них лишь 3.3% присутствуют во всех образцах (последовательности филума *Thaumarchaeota*).

С использованием метода непараметрического многомерного шкалирования (nmDS) исследовано влияние концентрации органического углерода ($C_{орг}$) и суммы ионов (Σ_i) на распределение отдельных филоотипов бактерий и архей (ОТЕ, при кластерном расстоянии 0.03) (рис. 4). Достоверное влияние (p -value < 0.05) Σ_i поровых вод и $C_{орг}$ отмечено на распределение нескольких филоотипов филума *Actinobacteria*, присутствующих во всех образцах, одного филоотипа филума *Cyanobacteria*, доминирующего в сообществе ст. 9 с высокой суммой ионов и филоотипа филума *Chloroflexi*, выявленного в образцах ст. 25 и ст. 20 с низкой и средней Σ_i , соответственно (рис. 4 А). Для архейных сообществ достоверная связь минерализации поровых вод и $C_{орг}$ отмечалась с филоотипами филума *Thaumarchaeota* (p -value < 0.05), преобладающими в образце ст. 9 с высокой суммой ионов (рис. 4 Б).

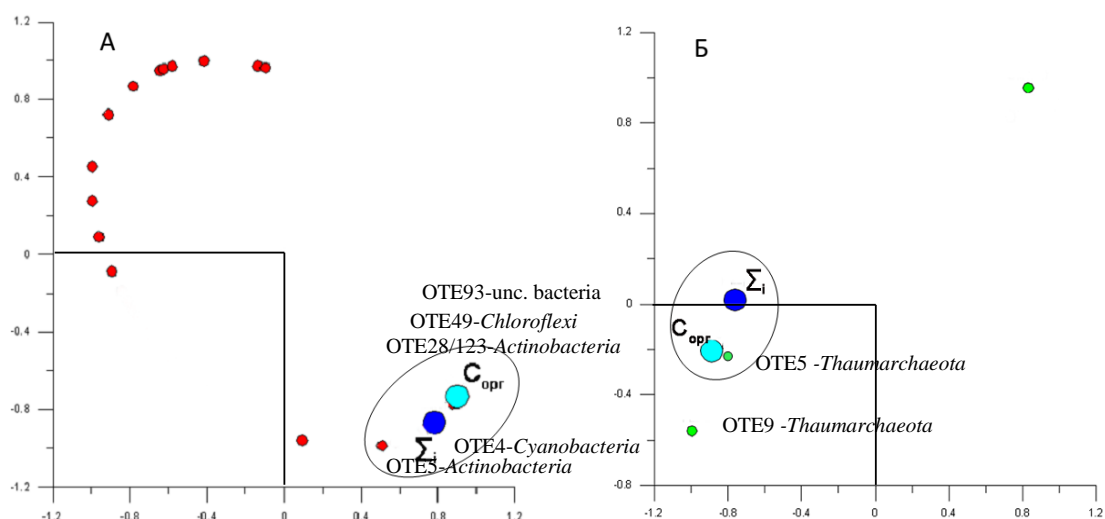
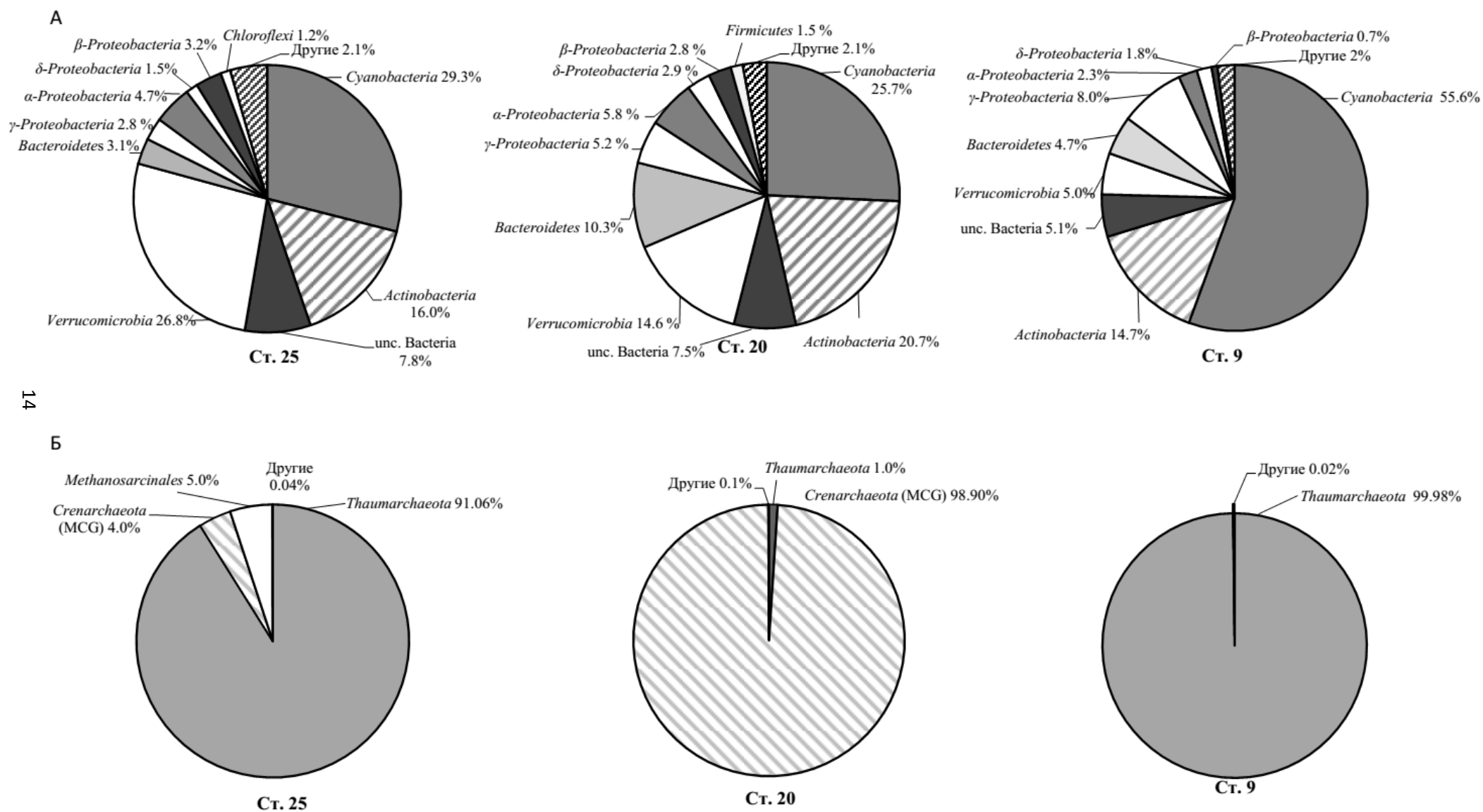


Рис. 4. График многомерного непараметрического шкалирования (nmDS), показывающий взаимосвязь между ОТЕ библиотек генов 16S рРНК бактерий (А) и архей (Б), детектированных в донных осадках шельфа Карского моря и Енисейского залива и суммой ионов поровых вод (Σ_i) и органическим углеродом ($C_{орг}$).

Таксономический состав микробных сообществ исследованных образцов представлен на рис. 5. В библиотеке фрагментов гена 16S рРНК ст. 25 из низкоминерализованных донных осадков южной части Енисейского залива доминировали *Cyanobacteria* (29.3 %), *Verrucomicrobia* (26.9 %), *Actinobacteria* (16.0 %) и *Proteobacteria* (13.7 %) (рис.5 А). В сообществе архей образца ст. 25 отмечено доминирование последовательностей филума *Thaumarchaeota* (91.1%) (рис. 5 Б).



14

Рис. 5. Таксономический состав бактериальных (А) и архейных (В) сообществ донных осадков шельфа Карского моря и Енисейского залива.

В бактериальном сообществе из среднеминерализованных осадков (ст. 20) преобладали *Cyanobacteria* (25.7 %), *Actinobacteria* (20.7 %), *Proteobacteria* (17.4 %) (рис. 5 А). Среди архейного сообщества доминировали представители филума *Crenarchaeota* (98.9 %), а именно линия некультивируемых архей Miscellaneous Crenarchaeotic Group (MCG) (рис. 5 Б). В библиотеке фрагментов гена 16S рРНК высокоминерализованных осадков (ст. 9) отмечено доминирование филумов *Cyanobacteria* (55.6 %), *Actinobacteria* (14.7 %) и *Proteobacteria* (13.2 %) (рис. 5 А).

Архейные сообщества были представлены последовательностями филума *Thaumarchaeota* (рис. 5 Б). Для нуклеотидных последовательностей полученных флотипов ближайшими родственниками были последовательности некультивируемых микроорганизмов почв, в том числе арктических, а также из озер и рек.

Таким образом, шельф Карского моря и южная часть Енисейского залива характеризуются различными геохимическими характеристиками (Погодаева и др., 2010) и в разной степени подвержены мощному материковому стоку рек и ручьев, а также влиянию вод арктического бассейна, что сказывается и на структуре микробных сообществ донных осадков. В отличие от других холодноводных морей, где наблюдалось преобладание представителей филумов *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* (Zhang et al., 2014; Li et al., 2015; Liu et al., 2014), в бактериальных сообществах донных отложений исследуемых нами районов доминировали представители *Cyanobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*. Их соотношение в разных образцах и таксономический состав внутри филумов варьировало в зависимости от уровня минерализации поровых вод.

3.3. Исследование в природном микробном сообществе донных осадков Карского моря функциональных генов метанмонооксигеназ (*pmoA*), метилкоэнзим М редуктаз (*mcrA*), алкангидрогенилаз (*alk*).

Тестирование суммарной ДНК станций шельфа Карского моря и прилегающих заливов на наличие гена *pmoA* показало положительную реакцию в образцах ст. 9 и 25. Проанализировано 23 клон, содержащих фрагмент гена *pmoA* (приблизительно 500 п.н.). Детектированные аминокислотные последовательности гена *pmoA*, принадлежащие метанотрофам I и II типов классов α -, β - и γ -*Proteobacteria*, свидетельствуют о способности микроорганизмов карской экосистемы участвовать в процессах трансформации метана, средние концентрации в донных осадках водной толще губ, заливов, эстуариев, барьерных зон река-море и в воде рек моря на два порядка выше, чем на морских станциях (Большаков, Егоров, 1995; Леин, 2008). Тестирование

суммарной ДНК, изолированной из донных осадков шельфа Карского моря и прилегающих заливов показало положительную реакцию с праймерами на ген *mcrA* также в образцах ст. 9 и 25, как и в случае детекции последовательностей гена *pmoA*. Для этих образцов проанализировано 52 клон, содержащих фрагмент гена *mcrA* (≈ 800 п.н.) и принадлежащих порядкам *Methanomicrobiales* и *Methanosarcinales* филума *Euryarchaeota*. Филогенетический анализ показал, что полученные последовательности фрагментов гена *mcrA* сходны с последовательностями *mcrA* метаногенных, но не анаэробно окисляющих метан (АОМ) архей (групп ANME).

Образцы суммарной ДНК, выделенной из поверхностного слоя донных осадков шельфа Карского моря и прилегающих заливов были исследованы на наличие функциональных генов алкангидроксилаз (*alk*), отвечающих за способность микроорганизмов участвовать в деградации коротко- и длинноцепочечных алканов. Для этого использовали группу праймеров *alk* B1, *alk* B2 и *alk* B3, а также праймеры *alk* с инозином (Sei et al., 2003; Назина и др., 2008). По результатам ПЦР-анализа ген *alk* B3 был идентифицирован только в образце ДНК ст. 24. В других образцах ДНК присутствие генов *alk* обнаружено не было. Также было проведено тестирование штаммов Ар. 46-09, Ар. 47-09 и Ар. 55-09, Ар. 42-09, Ар. 20-09, Ар. 17-09 и Ар. 16-09, изолированных из донных осадков шельфа Карского моря и Енисейского залива на наличие *alk* генов. ПЦР-анализ показал, что только у двух штаммов было подтверждено наличие гена *alk* B-3 – у *Bacillus* sp. (Ар. 47-09) и *Aeromonas piscicola* (Ар. 46-09). Оба штамма изолированы из донных осадков южной части Енисейского залива.

3.4. Экспериментальные исследования по деградации *n*-алканов нефти чистыми культурами бактерий, изолированных из водной толщи и донных осадков Карского моря.

В модельных экспериментах со смесью микроорганизмов, изолированных из донных осадков Карского моря (№1) концентрация *n*-алканов в среде без добавления NaCl уменьшилось за 30 дней лишь на 30 % (рис. 6). При увеличении концентраций NaCl отмечалось замедление процесса конверсии *n*-алканов. В опытах с байкальскими микроорганизмами (№2), а также в смеси карских и байкальских бактерий (№3) при концентрациях 7–15 мг/мл NaCl обнаружена практически полная конверсия *n*-алканов за 30 дней эксперимента. При этом при отсутствии NaCl или увеличении его концентрации до 30 мг/мл отмечалось замедление процесса конверсии *n*-алканов в анализируемых смесях №2 и №3. Анализ полученных хроматограмм (рис. 7) показал отсутствие пиков *n*-алканов при сохранении пиков изопреноидов и нафтено-ароматического

горба, что свидетельствует о полной деградации *n*-алканов в смеси с байкальскими микроорганизмами.

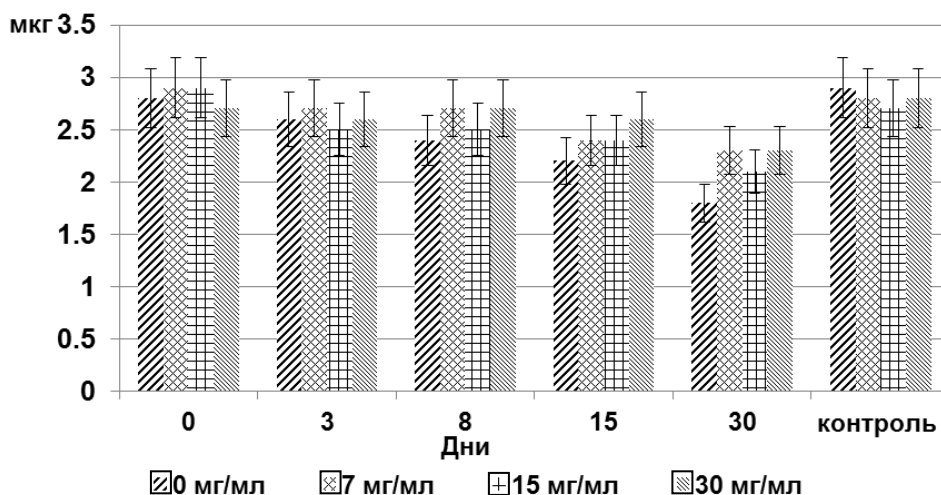


Рис. 6. Содержание *n*-алканов в течение лабораторного эксперимента при различных уровнях минерализации среды со смесью микроорганизмов, изолированных из донных осадков Карского моря (смесь №1) Концентрация NaCl, мг/мл.

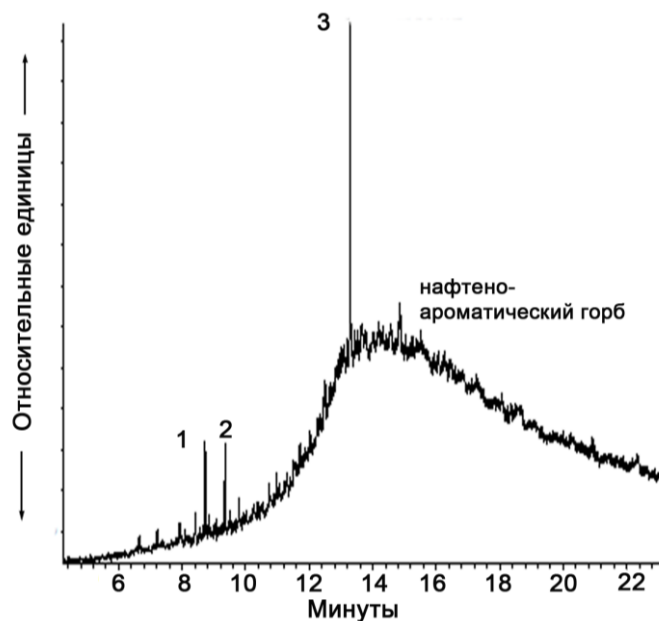


Рис. 7. Хроматограмма экстракта среды со смесью № 2 после 30 дней эксперимента. Пики: 1 – пристан; 2 – фитан; 3 – сквалан (внутренний стандарт).

Также следует отметить, что количество ПАУ в экспериментальной смеси за 30 дней эксперимента сохранялось, включая доминирующие арены - нафталины и фенантрены. Таким образом, конверсия *n*-алканов была результатом деградации микроорганизмами, в результате которой наиболее легко деградируют *n*-алканы, затем изо-алканы и ароматические соединения, что согласуется с результатами Дж. Мишель и М. Нейса (Michel and Hayes, 1999)

ВЫВОДЫ

1. С помощью метода массового параллельного секвенирования (Roche 454) фрагментов гена 16S рРНК впервые исследовано разнообразие микробных сообществ донных осадков шельфа Карского моря и Енисейского залива, различающихся по компонентному составу поровых вод и уровню минерализации. В бактериальных сообществах донных отложений исследуемого региона доминировали представители филумов *Cyanobacteria* (26-56 %), *Verrucomicrobia* (5-27 %), *Actinobacteria* (15-21 %), *Proteobacteria* (13-17 %), *Bacteroidetes* (3-10 %), а их соотношение и таксономический состав варьировали внутри филумов. Архейные сообщества были представлены менее разнообразно и включали представителей филумов *Thaumarchaeota* (91-99.9 %) и *Crenarchaeota* (99 %).

2. Таксономическое разнообразие суммарного микробного сообщества донных осадков шельфа Карского моря, Енисейского залива и Гыданской губы определялось изменением уровня минерализации поровых вод. В донных осадках с низким уровнем минерализации поровых вод преобладали представители классов γ - и β -*Proteobacteria*, филума *Actinobacteria*, в осадках со средним уровнем – бактерии классов γ - и δ -*Proteobacteria*, в осадках с высоким уровнем – бактерии класса γ -*Proteobacteria*.

3. Культивируемое микробное сообщество донных осадков шельфа Карского моря и Енисейского залива на основе анализа нуклеотидных последовательностей фрагментов гена 16S рРНК было представлено бактериями филумов *Firmicutes*, *Actinobacteria* и родами *Brevibacillus*, *Bacillus*, *Aeromonas* и *Plantibacter* класса γ -*Proteobacteria*.

4. В суммарной ДНК, изолированной из донных осадков районов южной части Енисейского залива и шельфа Карского моря выявлено наличие функциональных генов, обеспечивающих образование и окисление метана (гены *mcrA* и *pmoA*) и деструкцию коротко и длинноцепочечных *n*-алканов нефти (*alk* гены). Последовательности метанотрофов (ген *pmoA*) представлены I и II типами, принадлежащим классам α -, β - и γ -*Proteobacteria*. Последовательности гена *mcrA* были схожи с таковыми метаногенами порядков *Methanomicrobiales* и *Methanosarcinales* филума *Euryarchaeota*, но не с метанооксиляющими археями (группа ANME).

5. Микроорганизмы, изолированные из донных осадков Карского моря, в лабораторных экспериментах деградировали *n*-алканы в условиях различной солености. Более высокая деструкционная активность (80-95 %) отмечалась для смеси бактерий из Карского моря и из оз. Байкал при солености 7-15 мг/мл NaCl, более низкая (15 %) при 30 мг/мл NaCl для бактерий из Карского моря.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах:

1. Сулова М.Ю., Липко И.А., **Мамаева Е.В.**, Парфенова В.В. Разнообразие культивируемых бактерий, выделенных из водной толщи и донных осадков шельфа Карского моря // Микробиология. – 2012. – Т. 81, № 4. – С. -524-531.
2. **Мамаева Е.В.**, Сулова М.Ю., Погодаева Т.В., Парфенова В.В., Земская Т.И. Микробное некультивируемое сообщество донных осадков Гыданской губы и Енисейского залива Карского моря // Океанология. – 2014. – Т. 54, № 3. – С. 338-348.
3. **Мамаева Е.В.**, Галачьянц Ю.П., Хабудаев К.В., Петрова Д.П., Погодаева Т.В., Ходжер Т.В., Земская Т.И. Метагеномный анализ микробных сообществ донных осадков шельфа Карского моря и Енисейского залива // Микробиология. – 2016. – Т. 85, № 2.

Материалы конференций:

4. **Мамаева Е.В.**, Сулова М.Ю., Павлова О.Н., Парфенова В.В., Земская Т.И. Исследование разнообразия суммарного микробного сообщества донных осадков шельфа Карского моря молекулярно-биологическими методами // 5-я Верещагинская Байкальская конференция (Иркутск, 4-9 октября, 2010). - Иркутск, 2010. - С. 145-146.
5. **Мамаева Е.В.**, Сулова М.Ю., Павлова О.Н., Липко И.А., Парфенова В.В., Земская Т.И. Разнообразие культивируемого и природного микробного сообщества донных осадков шельфа Карского моря // Материалы XIX Межд. науч. конф. (Школы) по морской геологии «Геология морей и океанов» (Москва, 14-18 ноября, 2011). - Москва, 2011.- Т.4. - С. 110-112.
6. **Мамаева Е.В.**, Сулова М.Ю., Павлова О.Н., Парфенова В.В., Земская Т.И. Разнообразие культивируемого и природного микробного сообщества донных осадков шельфа Карского моря, Енисейского залива и Гыданской губы. // Материалы 3-го Байкальского Микробиологического симпозиума с межд. участием «Микроорганизмы и вирусы в водных экосистемах» BSM 2011, (Иркутск, 3-8 октября, 2011). - Иркутск, 2011. – С. 86-87.
7. **Мамаева Е.В.** Исследование разнообразия природного микробного сообщества донных осадков шельфа Карского моря молекулярно-биологическими методами // Материалы 1 Всероссийской межд. конференции «Россия в Арктике, XXI век: среда обитания, общество» (Томск, 14-15 июня, 2012). - Томск, 2012. - С. 99.
8. **Мамаева Е.В.** Исследование разнообразия природного микробного сообщества донных осадков шельфа Карского моря, Енисейского залива и

Гыданской губы // Сборник тезисов VI Всероссийского с межд. участием Конгресса молодых ученых-биологов «Симбиоз-Россия 2013» (Иркутск, 19-23 августа, 2013). - Иркутск, 2013. - С. 213-215.

9. **Мамаева Е.В.**, Suslova M.Y., Pogodaeva T.V., Parfenova V.V., Zemskaya T.I. Study of Biodiversity of Total Microbial Community of Sediments in Kara Sea shelf, Yenisey Bay and Gydan Bay. International conference on Arctic Ocean Acidification, (Bergen, Norway, 6–8 May, 2013). - Bergen, 2013. – С. 47-48.

10. **Мамаева Е.В.**, Губарев П.С., Сулова М.Ю., Горшков А.Г., Земская Т.И. Исследование в модельном эксперименте деградации алкановой фракции нефти культивируемыми микроорганизмами донных осадков Карского моря // 4-ый Байкальский Микробиологический симпозиум с межд. участием «Микроорганизмы и вирусы в водных экосистемах» BSM-2015 (Иркутск, 7-12 сентября, 2015). - Иркутск, 2015. – С. 134-136.