

БАКТЕРИАЛЬНЫЕ СООБЩЕСТВА МИКРОБНЫХ МАТОВ СУПРАЛИТОРАЛИ БЕЛОГО МОРЯ И ЛИТОРАЛИ ОТДЕЛИВШИХСЯ ОТ МОРЯ ОЗЕР¹

© 2019 г. Е. И. Бурганская^а, *, Д. С. Груздев^а, М. С. Круткина^а, В. М. Горленко^а

^аФедеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии”
Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

*e-mail: kateburganskaya@gmail.com

Поступила в редакцию 01.04.2019 г.

После доработки 15.04.2019 г.

Принята к публикации 15.05.2019 г.

Исследовали условия образования и филогенетический состав пигментированных биопленок и микробных матов в супралиторали Кандалакшского залива Белого моря и литорали отделившихся от моря озер. В период проведения работ соленость в местах отбора проб была от 15 до 26 г/л за исключением нескольких распресненных участков солевых маршей (соленость 4–11 г/л), температура составляла 9–12°C. Суровые климатические условия – низкая среднегодовая температура и промерзание литоральных зон – оказывали влияние на видовой состав и структуру бентосных фототрофных сообществ. Биоразнообразие микробных сообществ определяли высокопроизводительным секвенированием области V3–V4 гена 16S рРНК в сочетании с микроскопией природных образцов и выросших культур, что дало возможность расширить имеющиеся ранее представления о разнообразии как оксигенных, так и аноксигенных фототрофных бактерий литоральной зоны Кандалакшского залива Белого моря. Видовые составы микробных матов соляных маршей и мелководных участков озер морского происхождения не имели заметных отличий друг от друга. Основу матов и биопленок составляли представители филумов *Bacteroidetes* (до 36%) и *Proteobacteria* (до 67%). Доля фототрофных бактерий была 0.3–18%. Среди фототрофов преобладали оксигенные фототрофы: цианобактерии родов *Phormidium*, *Oscillatoria*, *Spirulina*, *Anabaena* и диатомовые водоросли. Количество аноксигенных фототрофных бактерий не превышало 5% от всех прокариот. В основном это мезофильные морские виды пурпурных серобактерий родов *Thiorhodococcus* и *Thiocapsa*. Отличительной особенностью приполярных матов являлось отсутствие бактерий семейства *Ectothiorhodospiraceae*, характерных для микробных матов южных морей. Несерные пурпурные бактерии и аэробные аноксигенные фототрофные бактерии в основном были близки к известным морским видам. Зеленые серобактерии обнаружены в двух пробах прибрежных матов меромиктических озер. Это соленоводные виды родов *Prosthecochloris* и *Chlorobium*. Аноксигенные нитчатые фототрофные бактерии присутствовали почти во всех бентосных фототрофных сообществах и были представлены новыми филотипами.

Ключевые слова: солевые марши и лагуны Белого моря, цианобактериальные маты, фототрофные сообщества, аноксигенные фототрофные бактерии, эволюция биосферы

DOI: 10.1134/S0026365619050033

Микробные маты господствовали на планете Земля на протяжении более миллиарда лет (Awgami, 1992; Neilson, Verelson, 2003; Seckbach, Oren, 2010). Об этом свидетельствуют строматолиты – окаменевшие слоистые структуры, сложенные нитчатыми фототрофами (Krumbein, 1983; Walter, 1983). Древние маты развивались при умеренных температурах в атмосфере, практически не содержащей кислород. Весьма вероятно, что именно

аноксигенные фототрофные бактерии (АФБ) составляли основу докембрийских цианобактериальных матов (Karppler и др., 2005).

Современные бентосные фототрофные сообщества являются модельными объектами реликтов, их исследование позволяет лучше понять историю развития жизни на нашей планете. Фототрофные маты в мелководных морских лагунах и солевых маршах южных широт наиболее продуктивны и сохраняют черты древних матов теплого архейского океана (Walter, 1983). Арктические и Антарктические микробные маты наиболее хоро-

¹ Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.1134/S0026365619050033 для авторизованных пользователей.

шо моделируют специфику микробных сообществ в постледниковый период (Kirschvink, Корр, 2008). Такие сообщества могли формироваться после глобальных оледенений, начавшихся 2.4 млрд. лет назад и приведших к разрушению первичных структур прокариотных бентосных сообществ и охлаждению вод мирового океана. Сегодня полярные микробные маты распространены в Арктике и Антарктике (Herbert, Tanner, 1977; Wharton Jr., Parker, Simmons Jr., 1983; Vincent et al., 2000; de los Ríos et al., 2015; Tahon et al., 2016). Определенный интерес представляют также микробные маты приполярных районов, отличающихся суровым климатом (Горленко, Пучков, Демчев, 1985).

Целью настоящего исследования было изучение условий формирования и микробного разнообразия литоральных фототрофных сообществ акватории Кандалакшского залива Белого моря.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Отбор проб, физико-химические характеристики мест их отбора. Пробы отбирали в первую декаду сентября 2016 года. Микробный мат (био пленку) вырезали скальпелем с площади 2 см² и помещали в стерильный пластиковый флакон объемом 50 мл, который доверху заполняли водой из места отбора пробы. Образцы хранили в темноте при температуре 4°C. Отобранный образец использовали для микроскопии, анализа пигментов и извлечения тотальной ДНК. Общая характеристика образцов и физико-химические параметры воды в местах отбора проб, а также их координаты представлены в табл. 1.

Температуру и значение pH среды в местах отбора проб измеряли с помощью портативного pH-метра с температурным датчиком (HANNA HI 8314, Румыния). Соленость определяли с помощью рефрактометра FG-211 ("Comecta", Испания).

Микроскопия. Морфологию клеток фототрофных микроорганизмов изучали в световом микроскопе Olympus BX 41 ("Olympus Corp.", Япония) с фазовым контрастом.

Фотосинтезирующие пигменты. Для анализа общего состава пигментов в природных образцах и клетках выделенных культур бактерий использовали спектрофотометр СФ 56А ("ЛОМО", Россия). Спектры поглощения фрагментов клеточных мембран, полученных при разрушении биомассы ультразвуком частотой 14.5 кГц, регистрировали в диапазоне длин волн 400–1100 нм.

Выделение аноксигенных фототрофных бактерий. Образцы микробных матов смешивали с придонной водой, гомогенизировали растиранием и 1 мл гомогената использовали в качестве посевого материала для выделения АФБ. Культиви-

рование АФБ проводили на модифицированной агаризованной среде Пфеннига с добавлением 500 мг/л сульфида натрия (Pfennig, 1965) при pH 7.8. Выросшие колонии микроскопировали и пересевали с разведением до получения монокультур различных видов АФБ. Предварительную идентификацию фототрофных микроорганизмов осуществляли по фенотипическим признакам.

Молекулярно-генетическая идентификация бактерий. Филогенетическое разнообразие микробных сообществ определяли с использованием высокопроизводительного секвенирования ПЦП-фрагментов гена 16S рНК, извлеченной из образцов ДНК микробного мата. ДНК выделяли с помощью набора PowerMax Soil DNA Isolation Kit ("MO BIO Laboratories, Inc.", США) согласно инструкции производителя.

Сравнительный анализ полученных последовательностей с последовательностями базы данных GenBank проводили с помощью программы BLAST [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>]. Дендрограммы были построены по методу Maximum Likelihood с помощью программного пакета MEGA 6.1.

Аmplификацию и секвенирование варибельного участка V3–V4 (с использованием стандартных праймеров Illumina 5'-CCTACGGGGGGG-GGCGC-3' и 5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3') гена 16S рНК проводили с помощью секвенатора Illumina MiSeq (парные чтения 2 × 250 bp) при использовании в качестве матрицы той же ДНК, выделенной из матов для ПЦП. Последовательности депонированы в Sequence Read Archive (SRA) в NCBI под номерами SRX5561573–SRX5561585. Обработку данных проводили при помощи программы QIIME (версия 1.9.1) (Caporaso et al., 2010). Все предполагаемые химеры проверяли с помощью инструмента поиска при использовании справочной бесхимерной базы в соответствии с алгоритмом UCHIME (Edgar et al., 2011). Полученные чтения группировали в ряд OTU (operational taxonomic unit, операционных таксономических единиц) на основе 97%-ого порога сходства. Таксономическое положение OTU определяли с использованием базы данных RDP (<http://rdp.cme.msu.edu>) (Wang et al., 2007). Относительную численность каждой группы на разных таксономических уровнях (тип, класс, порядок, семейство и род) использовали для последующего анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Условия образования микробных матов и окрашенных биопленок. Изученные местообитания бентосных фототрофных бактерий разделили на три типа. К первому типу отнесли солевые марши (супралитораль), в углублениях дна которых стабильно сохранялись небольшие лужи с гниющими

Таблица 1. Значения координат и описания образцов

Образец	Координаты отбора	Соленость, г/л	pH	T, °C	Описание образца
Ег1	66.55404 с.ш. 33.04268 в.д.	24	7.9	—	По поверхности гниющих растений развивались пурпурные бактерии в виде красно-бурых пятен и зеленые пятна водорослей с признаками развития бесцветных серобактерий
Ег2	66.55215 с.ш. 33.04892 в.д.	27	7.91	—	Многолетний мат. Верхняя часть — цианобактерии, затем — темно-зеленая зона деструкции, далее следует слой пурпурных бактерий, а ниже располагается гомогенная черная масса гниющих органических остатков
Ег5	66.55276 с.ш. 33.04924 в.д.	4	6.6	—	На глубине находилась тонкая пленка, в которой просматриваются пурпурные вкрапления
Gub1	66.54655 с.ш. 33.14352 в.д.	15	7.1	—	Достаточно обширные обрастания пурпурного цвета с зелеными пятнами. Интенсивное развитие АФБ (в основном пурпурных) происходило в результате интенсивного поступления сульфида из нижних слоев осадков
Gub3	66.54655 с.ш. 33.14352 в.д.	26	6.97	—	Поверхность бактериальных обрастаний в основном зеленого цвета с признаками выпадения элементной серы. По краям микробных обрастаний прослеживалось присутствие пурпурных бактерий
KS4	66.54922 с.ш. 33.13393 в.д.	11	6.8	9	Образец представлял собой пурпурные пятна на поверхности гниющих водорослей (до дна 5 см), имел рыхлую структуру с отдельными хлопьями пурпурных бактерий
KS5	66.54922 с.ш. 33.13393 в.д.	15	7.1	9	Образец был отобран на расстоянии 20 см от дна. АФБ развивались по рыхлому слою разлагающихся водорослей, имели буро-зеленый цвет с пурпурными пятнами
Nil2	66.50345 с.ш. 33.12741 в.д.	26	7.9	15	АФБ, преимущественно ПСБ, развивались на сульфидсодержащем грунте, образованном в результате гниения водорослей
Nil3	66.50404 с.ш. 33.11926 в.д.	28	6.76	14	Отобран из небольших углублений, в которых обнаружен многослойный цианобактериальный мат, толщиной около 1 см. Верхние слои состояли из нескольких слоев цианобактерий. На глубине 0.3–0.5 см прослеживался слой пурпурных бактерий, ниже мат имел темный цвет
Nil4	66.50477 с.ш. 33.11857 в.д.	20	6.77	14	Мат отрывался от дна и всплывал в виде кожистых пленок розового цвета толщиной 2–3 мм
ZM2	66.53042 с.ш. 33.09309 в.д.	25	7.2	13	Возвышающийся, увлажненный во время прилива тонкий мат оливкового цвета, имеющий слоистость с розовыми прослоями, сформированными ПСБ
ZM3	66.5295 с.ш., 33.094 в.д.	15	6.6	12	Мат серо-зеленого цвета, обнажающийся во время отлива
ZM4	66.52955 с.ш. 33.09567 в.д.	15	6.86	—	Многослойный мат, имеющий определенные морфологические особенности. Пурпурные бактерии располагались под слоем нитчатых цианобактерий

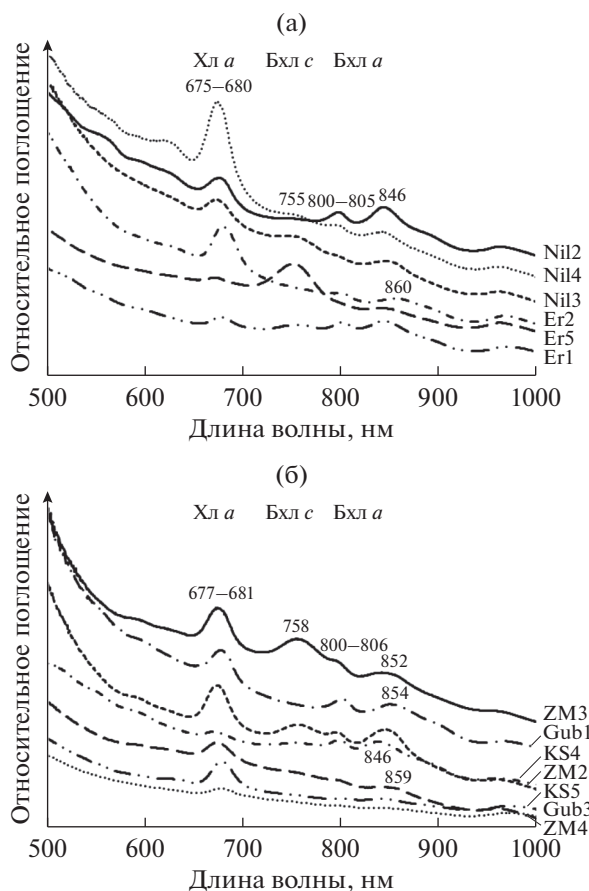


Рис. 1. Спектры поглощения целых клеток в природных образцах в солевых маршах (а) и озерах лагунного типа (б).

ми водорослями, по поверхности которых формировались многослойные микробные маты. Распреснение отдельных участков маршей (образец Er5) происходило под воздействием береговых стоков. К этому типу принадлежали мелководные участки Ермолинской губы (образцы Er 1, 2, 5) и Нильма-губы (образцы Nil 2–4) Кандалакшского залива. Температура в них колебалась от 9 до 15°C, соленость 15–28 г/л, рН 6.7–7.2 (табл. 1).

К второму типу отнесли прибрежные участки стратифицированных озер, полностью или частично отделенных от Кандалакшского залива. В этот тип вошли литораль Кисло-Сладкого озера (пробы KS 4, 5) и прибрежные участки озера Зеленый мыс (пробы ZM 2–4). В литоральной зоне озер наблюдали развитие окрашенных в пурпурный или зеленый цвет биопленок, реже – микробного мата. Эти водоемы в разной степени находились под воздействием морских приливов и пресных береговых стоков. Температура в них колебалась от 9 до 12°C, соленость изменялась в пределах 11–28 г/л, рН – от 6.8 до 8.0.

К третьему типу отнесли Вонючую губку (ВГ), являющуюся небольшим водоемом (30 × 40 м), соединенным через узкую протоку с безымянной лагуной Кандалакшского залива. Обрывки морских водорослей заносило приливными волнами в ВГ, где они концентрировались, что приводило к ее обогащению органическим веществом. Анаэробная деструкция вызывала интенсивное образование сероводорода и развитие фототрофных и бесцветных серобактерий в этом водоеме. Глубина ВГ не превышала 20 см, при отливах поверхность микробных обрастаний обнажалась. Распреснение вод в ВГ происходило за счет обильного поступления прибрежных болотистых вод. Температура колебалась от 9 до 15°C, соленость 15–26 г/л, рН 6.9–7.1.

Все перечисленные фототрофные сообщества относились к категории “сульфурета”, в которых доминируют микробные процессы круговорота серы.

В исследованных водоемах было выделено две разновидности бентосных сообществ: первая – однолетние биопленки, окрашенные в зеленый или пурпурный цвет. Вторая – многолетние маты толщиной около 1 см с четкими слоями зеленого (кислородные фототрофы), пурпурного (пурпурные серные бактерии – ПСБ) и черного цвета (сульфидогены). У многолетних матов прослеживались погребенные окрашенные слои фототрофов, где особенно заметны чередующиеся пурпурные микрозоны.

Состав пигментов. Анализ тотальных препаратов пигментов из природных образцов (рис. 1) выявил, что доминирующим пигментом во всех исследованных микробных сообществах являлся хлорофилл *a*, характерный для цианобактерий (максимум поглощения *in vivo* составил 675–681 нм). Во всех образцах, кроме Gub3 и KS5 были заметны пики поглощения бактериохлорофилла *a* с максимумами *in vivo* при 800–806 и 846–856 нм. Присутствие бактериохлорофилла *a* указывало на наличие в микробных сообществах пурпурных бактерий. В образцах Nil3, Nil4, Er1, Er5, ZM2 и ZM3 обнаружен заметный пик бактериохлорофилла *c* с максимумом 755–758 нм, что указывало на присутствие хлоросом-содержащих зеленых серобактерий (ЗСБ) или аноксигенных нитчатых фототрофных бактерий (АНФБ).

Основные морфотипы в микробных матах и биопленках. На рис. 2 и 3 представлены микрофотографии фототрофных микроорганизмов литорали Кандалакшского залива, солевых маршей и озер лагунного типа.

Основу матов и биопленок составляли: нитчатые цианобактерии морфотипов *Oscillatoria*, *Phormidium*, *Spirulina*; одноклеточные цианобактерии, морфологически сходные с видами *Synechococcus* и *Synechocystis* (рис. 2). Среди АФБ преобладали пурпурные бактерии: родов *Thiocapsa* и *Thiorhodo-*

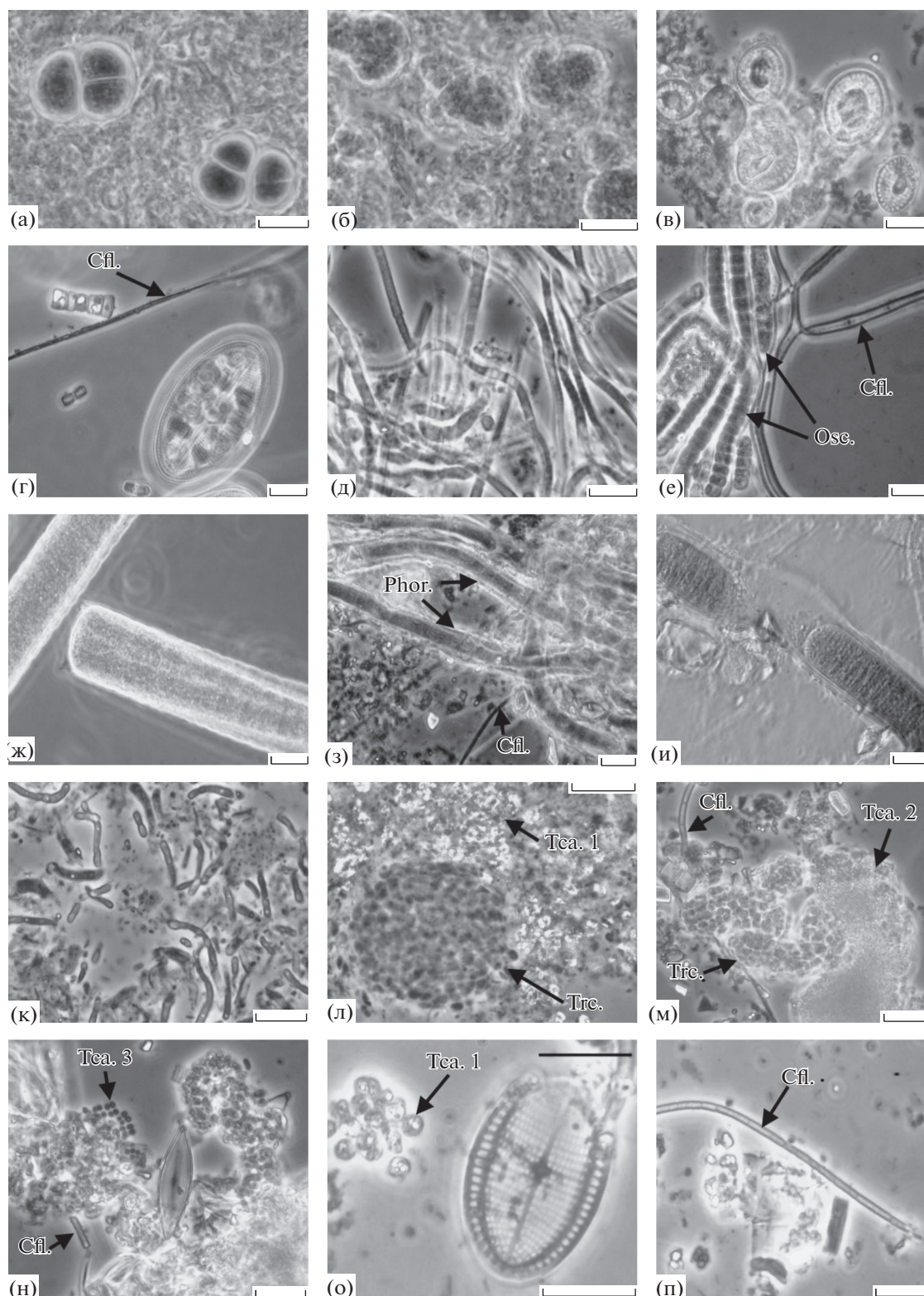


Рис. 2. Морфотипы фототрофных бактерий в природных образцах: (а) – *Gloeocapsa* sp.; (б) – *Synechocystis* sp.; (в) – диатомовые водоросли; (г) – диатомовая водоросль и АНФБ (Cfl.); (д) – *Phormidium* sp.; (е) – *Oscillatoria* sp. (Osc.) и АНФБ (Cfl.); (ж) – *Oscillatoria* sp.; (з) – *Phormidium* sp. 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.). Масштабная метка – 10 мкм.

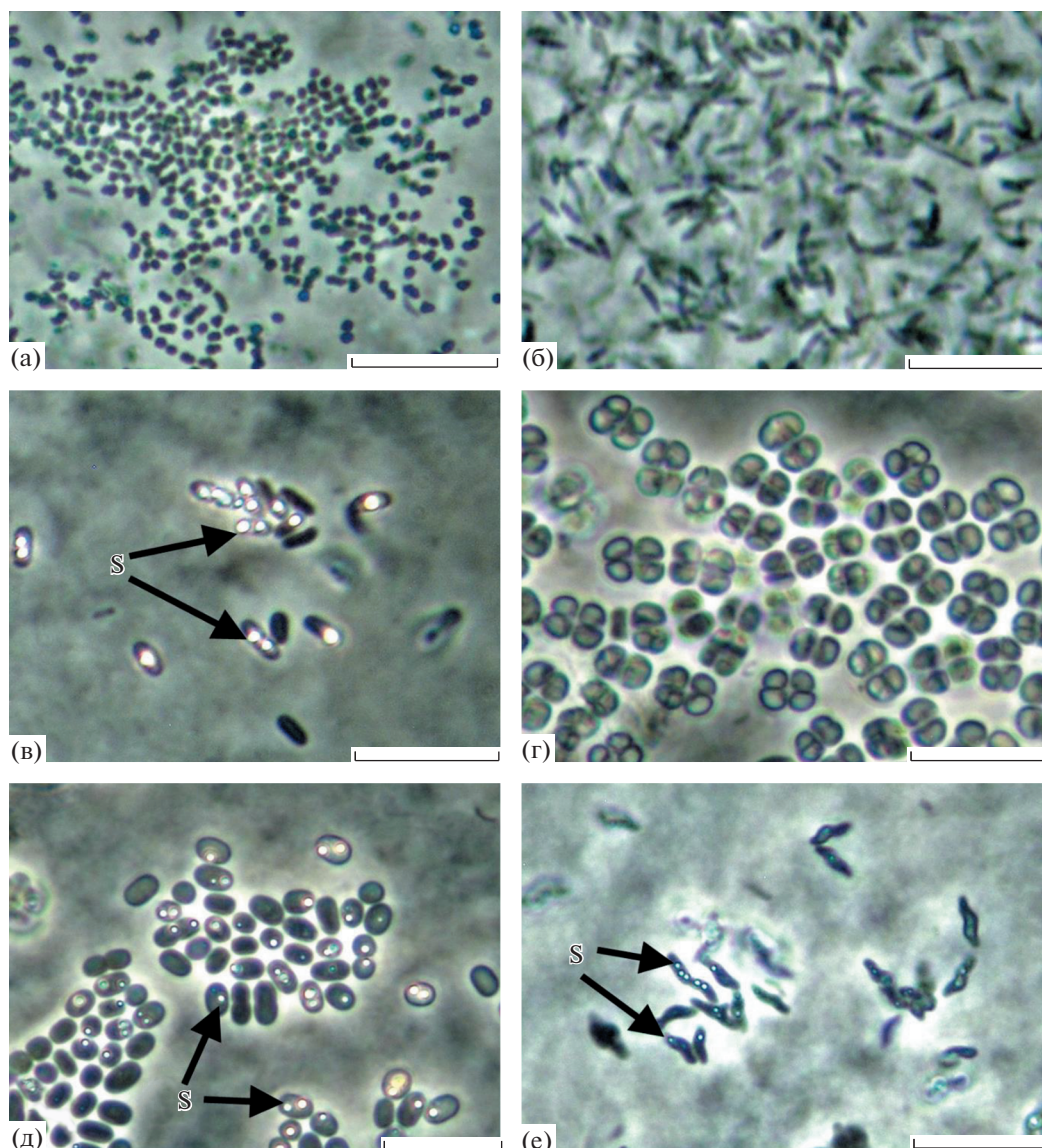


Рис. 3. Морфотипы фототрофных бактерий, выросших на селективных средах: (а) – *Prosthecochloris* sp.; (б) – *Rhodovulum* sp.; (в) – мелкие формы *Chromatium*-подобных бактерий; (г) – *Thiocapsa litoralis*; (д) – *Thiorhodococcus* sp.; (е) – *Thiorhodovibrio* sp. Масштабная метка – 10 мкм.

coccus, мелкие формы *Chromatium*-подобных бактерий и *Thiorhodovibrio* sp. Во всех матах и биопленках были обнаружены АНФБ.

Оценка разнообразия бактерий с помощью высокопроизводительного секвенирования. Состав микроорганизмов в биопленках и многолетних матах существенно не различался. Было обнаружено большое филогенетическое разнообразие в исследованных образцах. Больше всего OTU присутствовало в образце Nil3 (соленость 14 г/л, 6313 OTU), а менее разнообразным оказался образец Eg5 (1846 OTU) отобранный в распресненной части Ермолинской губы (табл. 2).

Одним из наиболее представленных во всех образцах филумов являлся филум *Proteobacteria*,

который составлял от 24.21 до 59.45% от общего числа бактерий (табл. 2). 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 – Eg1 и Gub3 (4.45 и 17.30%), тогда как практически отсутствовали в других образцах (табл. 2). В небольшом количестве присутствовали представители филумов: *Fusobacteria* – от 0.01 до 0.39%, *Parcubacteria* – от 0.09 до 1.56%, SR1 – от 0.1 до 1.89%, *Chloroflexi* – от 0.32 до 1.93%, *Spirochaetes* – от 0.82 до 3.88%, *Verrucomicrobia* – от 0.81 до 9.1%, *Firmicutes* – от 1.2 до 9.67%. Количество *Cyanobacteria* варьировало в образцах от 0.98 до 12.47%, а *Tener-*

icutes — от 0.06 до 6.45%. К неклассифицируемым бактериям отнесли от 2.63 до 11.03% от общего числа бактерий. *Archaea* составляли от 0.7 до 3.63%. Оставшиеся OTU были представлены другими малочисленными филумами (от 1.86 до 12.28%).

Цианобактерии представлены в сообществе 38 филотипами (рис. 4). В трех образцах они составляли небольшую часть фототрофного сообщества — Er1 (3.93%), Er5 (6.49%) и Gub3 (1.00%) (табл. 3). В трех образцах цианобактерии являлись доминирующими фототрофами — KS5 (93.62%), Nil4 (98.56%) и Zm4 (97.53%). В остальных образцах цианобактерии занимали 71.94–88.56% от общего количества фототрофных бактерий (ОКФ). 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 ЗСБ обнаружено два филотипа — OTU4, OTU6633 (рис. 5). Наибольшее количество ЗСБ, в частности OTU4, присутствовали в образцах Er1 и Gub3 (17.3 и 4.45%) (табл. 3). OTU4 близка к *Prosthecochloris phaeoasteroidea* ЗМ и *Prosthecochloris aestuaria*. Она составляла 95.2% от 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.

ПСБ были представлены 7 филотипами (рис. 6). Наибольшее содержание ПСБ отмечено в образцах Er5 и Er2 — 22.76 и 15.48% от ОКФ соответственно (табл. 3). Наиболее представленным филотипом являлась OTU666, близкая к бактерии *Chromatium okenii*. В минорных количествах также из семейства *Chromatiaceae* в сообществах присутствовали: филотип OTU9535, близкая к *Thiocystis gelatinosa*; OTU2028, близкая 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*. В образцах KS5, Nil2–4, Zm2–4 и Er1 содержание ПСБ от ОКФ было менее 1%. 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% (рис. 7). Наиболее представленным филотипом являлась OTU190, близкая к *Rhodoferrax antarcticus*. Также в сообществе присутствовали минорные филотипы: OTU5604, близкая к *Rhodoferrax ferrireducens*; OTU2630, отно-

сящаяся к роду *Roseospira*; OTU15736, относящаяся к роду *Rhodobacter*, и OTU12442, близкая к бактерии *Rhodovulum bhavnagarensis*.

Аэробные АФБ были представлены 16 филотипами (рис. 7). Больше всего аэробных АФБ было в образце Nil2 — 11.6% от ОКФ (табл. 3). Наиболее представленным филотипом была OTU718, близкая к *Roseicyclus mahoneyensis*. В минорных количествах в сообществах присутствовало 5 филотипов, относящихся к роду *Erythrobacter*, а также филотипы, относящиеся к родам: *Roseomonas* (OTU3797), *Roseobacter* (OTU4253), *Porphyrobacter* (OTU4267 и OTU13478), *Blastomonas* (OTU5699), *Sandaracinobacter* (OTU13553), *Roseovarius* (OTU7630).

АНФБ были представлены четырьмя филотипами: OTU79, OTU1395, OTU5457, OTU8094 (рис. 8). Все четыре АНФБ присутствовали в образце KS4 и составляли 3.24% от ОКФ в образце (табл. 3). Наиболее близким организмом к филотипам OTU79 и OTU8094 являлась 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%. Наибольшее количество АНФБ отмечено в образцах Nil3, Zm2 и Zm3, содержащих 13.37, 10.03 и 11.06% от ОКФ соответственно. В образцах Er2 и Gub3 АНФБ не обнаружены.

ОБСУЖДЕНИЕ

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. В донных осадках литорали присутствует сульфид.

Комплекс условий в литорали Кандалакшского залива и связанных с ним озер и солевых маршей по некоторым оценкам приближается к состоянию океана среднего Протерозоя в последниковоый период 2.4 млрд лет назад (Habicht et al., 2002; Olson, 2006). В это время Мировой океан стал обогащаться сульфатами, в результате чего в гидросфере появился биогенный сероводород и микробные сообщества приобрели характер “сульфурета”, в котором доминировал круговорот серы.

В исследованных нами приполярных фототрофных сообществах преобладали однолетние пигментированные био пленки, инициирован-

Таблица 2. Распределение бактериальных OTU в филогенетических группах (в %), количество парных чтений и количество OTU (в единицах) в исследованных образцах микробных матов

Филум	Er1	Er2	Er5	Gub1	Gub3	KS4	KS5	Nii2	Nii3	Nii4	ZM2	ZM3	ZM4
<i>Bacteroidetes</i>	30.79	34.08	25.56	36.75	22.37	35.20	30.79	39.61	22.61	29.70	26.69	29.93	15.92
<i>Chlorobi</i>	17.30	0.00	0.00	0.06	4.45	0.01	0.03	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.01
<i>Chloroflexi</i>	1.26	1.06	1.42	0.60	1.02	0.67	0.33	0.32	1.40	0.32	0.34	1.93	0.62
<i>Fusobacteria</i>	0.02	0.01	0.06	0.28	0.15	0.14	0.14	0.14	0.10	0.39	0.01	0.10	0.35
<i>Proteobacteria</i>	29.77	42.87	46.44	35.98	47.44	29.62	30.31	31.77	48.17	38.39	59.45	24.21	67.97
<i>Spirochaetes</i>	1.29	2.11	3.20	1.72	1.88	1.83	1.41	1.33	1.19	1.21	2.08	3.88	0.82
<i>Verrucomicrobia</i>	1.64	1.33	0.94	1.41	0.87	2.54	3.45	9.10	4.70	5.39	0.81	1.68	1.25
<i>Cyanobacteria</i>	0.78	1.31	0.46	0.74	0.05	2.07	1.92	2.06	2.79	4.08	0.98	12.47	5.27
<i>Firmicutes</i>	1.42	1.96	2.45	9.67	4.15	1.71	2.40	2.01	1.98	2.49	1.85	6.24	1.20
<i>Parcubacteria</i>	0.55	0.41	0.34	0.27	0.30	1.56	1.00	0.37	0.55	0.91	0.09	0.54	0.23
<i>Tenericutes</i>	0.32	0.06	6.45	0.93	1.23	1.03	1.09	0.49	0.16	0.49	0.42	1.05	0.55
SR1	0.14	0.10	0.28	0.75	0.42	0.52	0.52	0.29	0.27	0.15	0.63	1.89	0.10
Неклассифицируемые бактерии	7.48	10.35	7.99	4.87	10.21	10.63	11.03	6.92	10.60	7.00	2.63	9.80	2.74
<i>Archaea</i>	1.98	0.70	2.07	1.54	1.70	3.63	3.30	1.83	2.48	3.41	1.15	3.47	1.13
Другие филумы	5.25	3.63	2.33	4.43	3.78	8.85	12.28	3.76	2.98	6.05	2.88	2.82	1.86
Всего парных чтений	144 372	89 156	34 572	177 593	133 160	33 752	53 574	136 685	217 840	83 751	276 184	158 858	156 521
Количество OTU	3831	2553	1846	3196	3214	2871	3385	3825	6313	3929	2835	3893	3516
Все фототрофные бактерии (%)	18.17	1.68	7.13	1.02	4.96	2.38	2.05	2.37	3.45	4.14	1.13	14.04	5.38

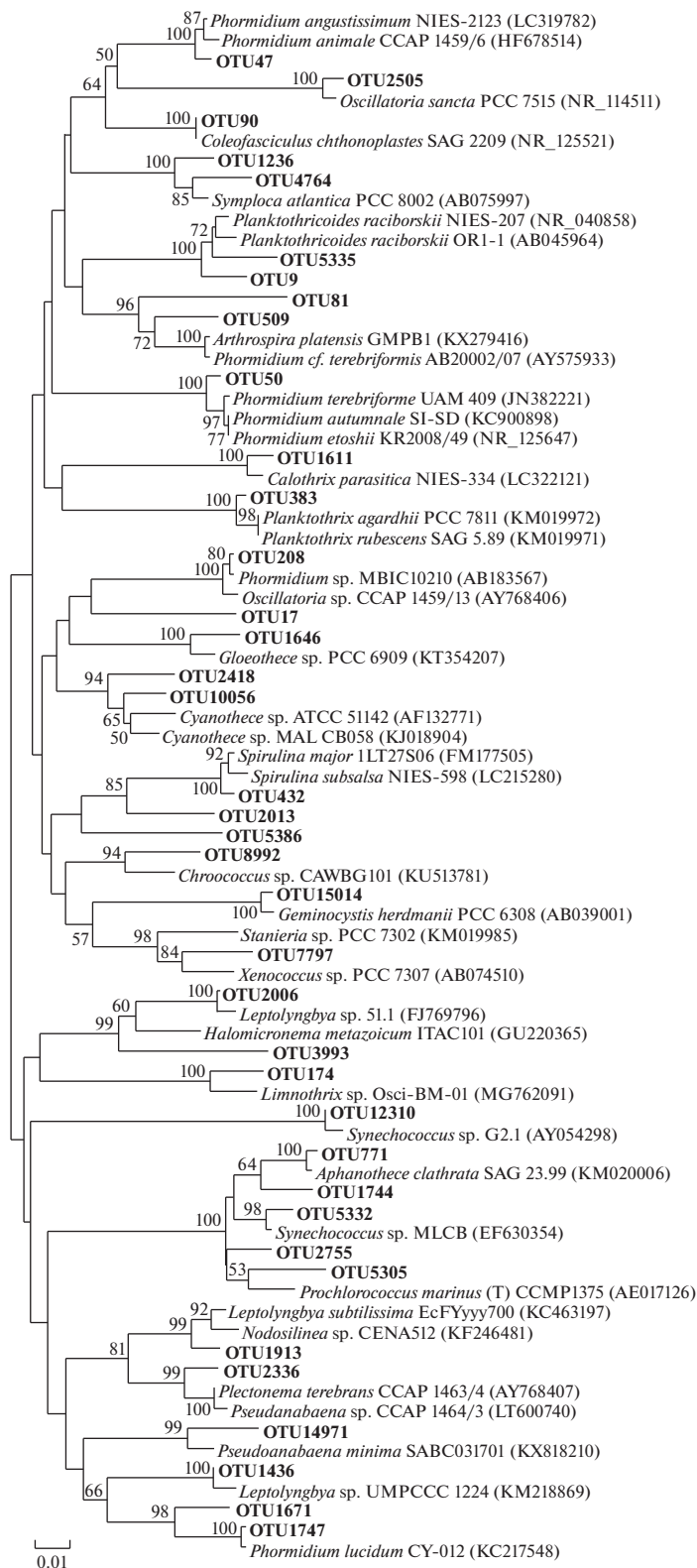


Рис. 4. Филогенетическое дерево, показывающее филогенетическое разнообразие OTU, относящихся к цианобактериям. Дендрограмма построена на основании анализа последовательностей гена 16S рРНК с использованием алгоритма максимального подобия (Maximum Likelihood). Достоверность ветвления рассчитана по результатам анализа 500 альтернативных дендрограмм. Длина сравниваемых последовательностей составляла 440 пар нуклеотидов.

Таблица 3. Распределение бактериальных OTU, принадлежащим фототрофным бактериям, в филогенетических группах (в %)

Филум	Er1	Er2	Er5	Gub1	Gub3	KS4	KS5	Nil2	Nil3	Nil4	ZM2	ZM3	ZM4
Цианобактерии	3.93	77.65	6.49	71.94	1.00	86.41	93.62	83.58	80.52	98.56	85.97	88.56	97.53
АНФБ	0.51	0.00	3.08	0.28	0.00	3.24	1.64	3.56	13.37	0.20	10.03	11.06	1.09
Зеленые серобактерии	95.20	0.27	0.04	5.46	89.56	0.50	1.55	0.00	0.29	0.00	0.00	0.00	0.11
Пурпурные серные бактерии	0.27	15.48	22.76	5.51	7.46	4.24	0.64	0.62	0.19	0.29	0.22	0.04	0.05
Несерные пурпурные бактерии	0.02	0.27	67.59	16.04	1.88	2.99	0.46	0.65	2.01	0.09	1.82	0.04	1.13
Аэробные АФБ	0.07	6.34	0.04	0.77	0.11	2.62	2.10	11.60	3.63	0.87	1.95	0.30	0.09

Примечание. За 100% принимали общее количество всех фототрофных бактерий в соответствующем образце.

ные 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 микрозонами, который был подвержен промерзанию в зимний период. Микроорганизмы, входящие в состав бентосных сообществ, переживали сезонный цикл замерзания–оттаивания.

Видовые составы исследованных приполярных микробных матов и биопленок соляных мар-

шей и мелководных участков озер лагунного типа не имели заметных отличий между собой.

Большинство идентифицированных нами видов АФБ были представлены известными видами, являющимися мезофилами. Единственная обнаруженная истинно психрофильная фототрофная бактерия – *Rhodofera antarcticus*, впервые была выделена из планктона покрытого льдом меромиктического озера в Антарктиде (Madigan et al., 2000). Следует отметить, что АФБ, ранее изолированные из донных осадков антарк-

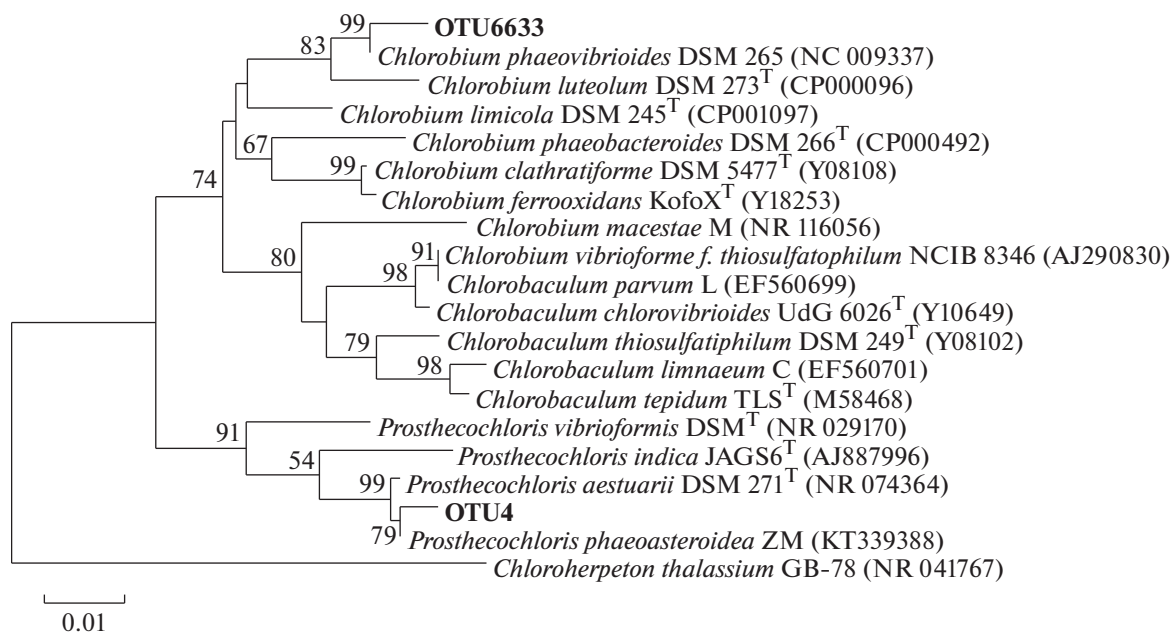


Рис. 5. Филогенетическое дерево, показывающее филогенетическое разнообразие OTU, относящихся к зеленым серобактериям. Дендрограмма построена на основании анализа последовательностей гена 16S рРНК с использованием алгоритма максимального подобия (Maximum Likelihood). Достоверность ветвления рассчитана по результатам анализа 500 альтернативных дендрограмм. Длина сравниваемых последовательностей составляла 440 пар нуклеотидов.

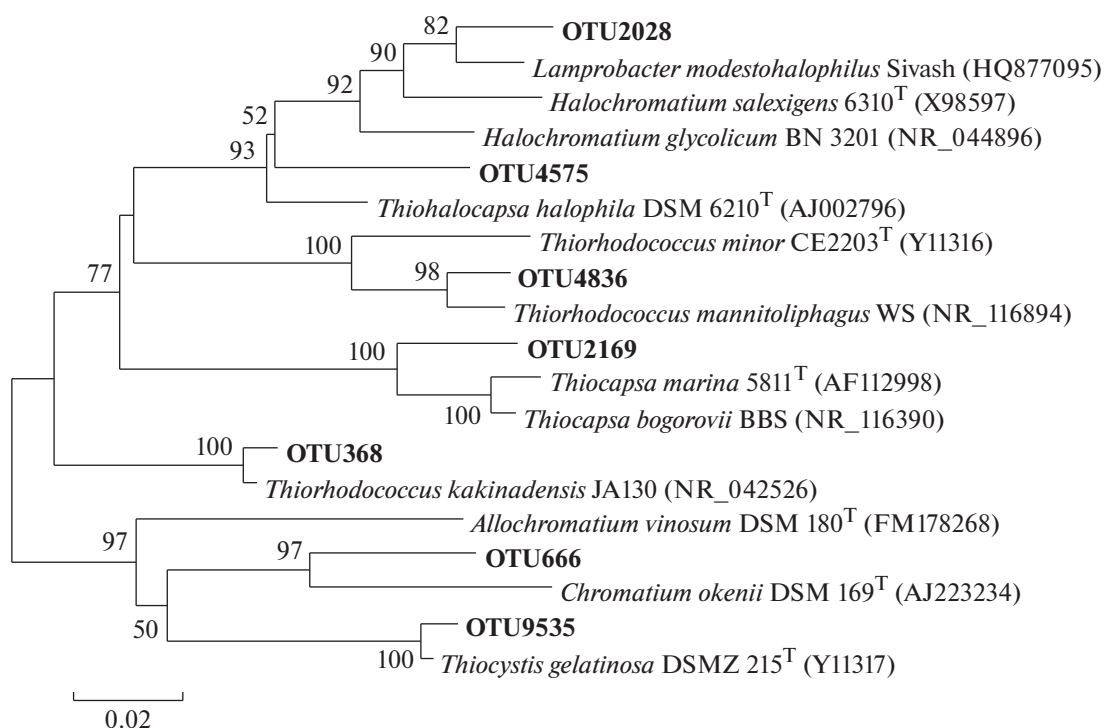


Рис. 6. Филогенетическое дерево, показывающее филогенетическое разнообразие OTU, относящихся к пурпурным серобактериям. Дендрограмма построена на основании анализа последовательностей гена 16S рРНК с использованием алгоритма максимального подобия (Maximum Likelihood). Достоверность ветвления рассчитана по результатам анализа 500 альтернативных дендрограмм. Длина сравниваемых последовательностей составляла 440 пар нуклеотидов.

тических вод, принадлежали к известным мезофильным видам пурпурных и зеленых серобактерий (Herbert, Tanner, 1977). Очевидно, способность к психрофилии развивалась постепенно в результате становления холодноводного глубоководного океана.

Климатические и гидрологические условия приполярных районов Беломорья были неблагоприятны для существования экстремальных галофилов. Большинство обнаруженных нами видов являлись умеренными галофилами или галотолерантами.

Одним из факторов толерантности к внешним воздействиям является гликокаликс (слизистый матрикс), который скрепляет все микроорганизмы в бентосных сообществах в единое целое и обладает криопротекторными свойствами (Саралов, 2019). Доминирующие в матах виды цианобактерий, АНФБ, пурпурных и зеленых серобактерий развиваются в природе в виде микроколоний, окруженных слизью или имеющих защитный слизистый чехол.

В исследованных нами приполярных микробных матах обитали как космополитные виды пурпурных бактерий (*Chromatium* sp., *Thiocapsa rosea*, *Thiocapsa marina*, *Thiorhodovibrio* sp.), так и виды, обнаруженные только в приполярных районах.

Среди них ПСБ *Thiorhodococcus mannitoliphagus*, *Thiocapsa litoralis*, *Thiocapsa bogorovii* (Puchkova et al., 2000; Rabold et al., 2006; Tourova et al., 2009) и неизвестные ранее АНФБ. Отличительной особенностью приполярных матов являлось отсутствие ПСБ семейства *Ectothiorhodospiraceae*, характерных для микробных матов южных морей. Космополитами являлись ЗСБ родов *Prosthecochloris aestuarii* (*Prosthecochloris phaeoasteroidea*), *Prosthecochloris indica*, *Chlorobium phaeovibrioides*. Последний вид, образующий коричневые и зеленые фенотипы, доминировал в планктоне меромиктических озер приполярья (Grouzdev et al., 2018; Krasnova et al., 2018; Лунина и соавт., 2019). Этот же вид встречался также в средних и южных широтах (van Gemerden, Mas, 1995). Присутствие коричневых ЗСБ в бентосных сообществах отмечали и ранее, но это исключение из правила (Martínez-Alonso et al., 2005). Обычно обогащенные каротиноидами ЗСБ доминируют только в планктоне глубоководных меромиктических озер. Специфичными для исследованных сообществ являлись также АНФБ, которые относятся к новым филотипам (рис. 8). Следует отметить, что применение высокопроизводительного секвенирования дало возможность расширить имеющиеся ранее представления о разнообразии как окси-

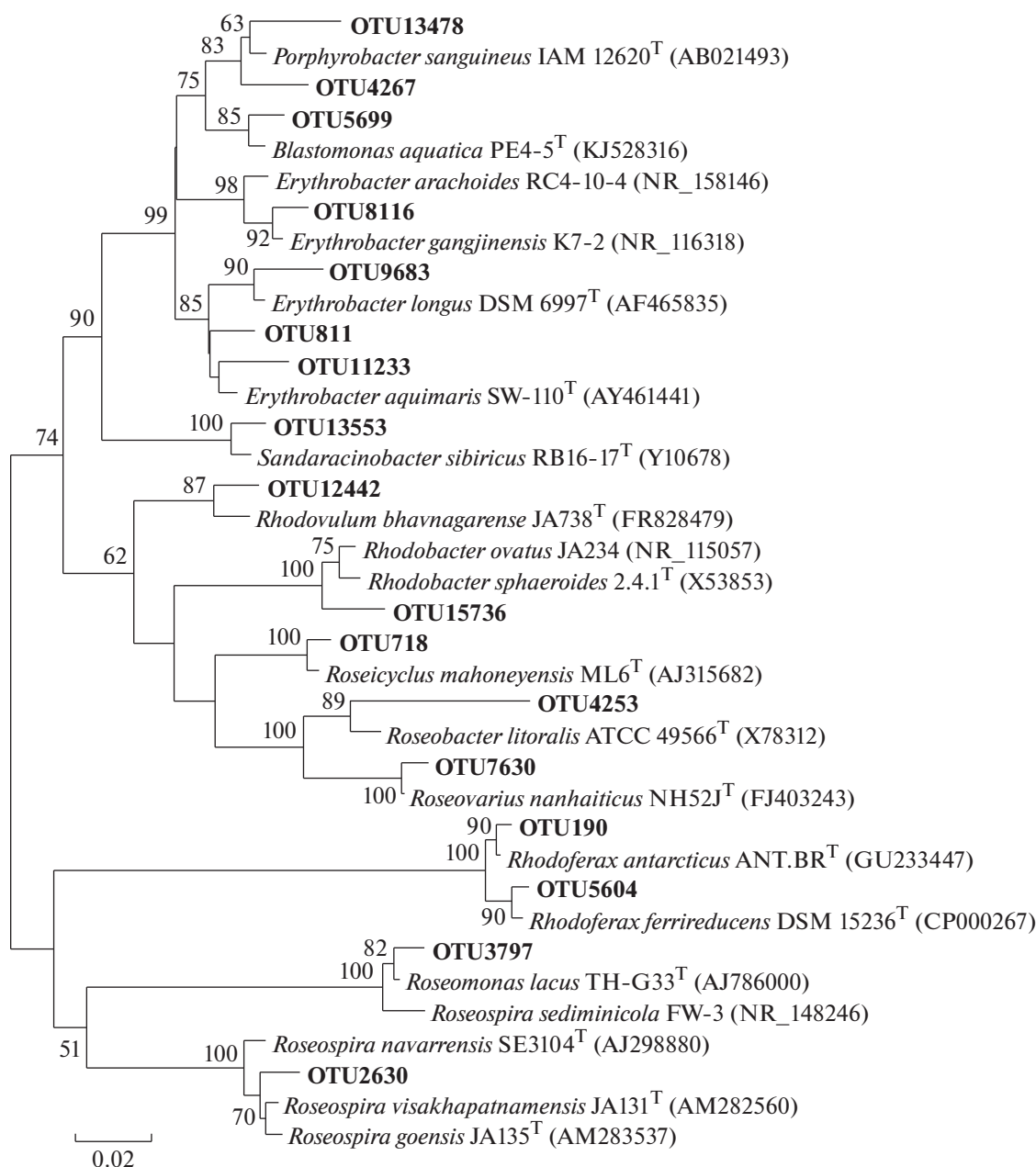


Рис. 7. Филогенетическое дерево, показывающее филогенетическое разнообразие OTU, относящихся к несерным пурпурным бактериям и аэробным анаэробным фототрофным бактериям. Дендрограмма построена на основании анализа последовательностей гена 16S рРНК с использованием алгоритма максимального подобия (Maximum Likelihood). Достоверность ветвления рассчитана по результатам анализа 500 альтернативных дендрограмм. Длина сравниваемых последовательностей составляла 440 пар нуклеотидов.

генных, так и анаэробных фототрофных бактерий литоральной зоны Кандалакшского залива Белого моря.

также В.А. Гайсину за помощь в отборе образцов. Секвенирование ДНК частично проводили с использованием оборудования ЦКП “Биоинженерия” ФИЦ Биотехнологии РАН.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность дирекции Биологической станции МГУ им. Н.А. Перцова за предоставленную возможность работать на биостанции, а

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке программы Президиума РАН “Эволюция органического

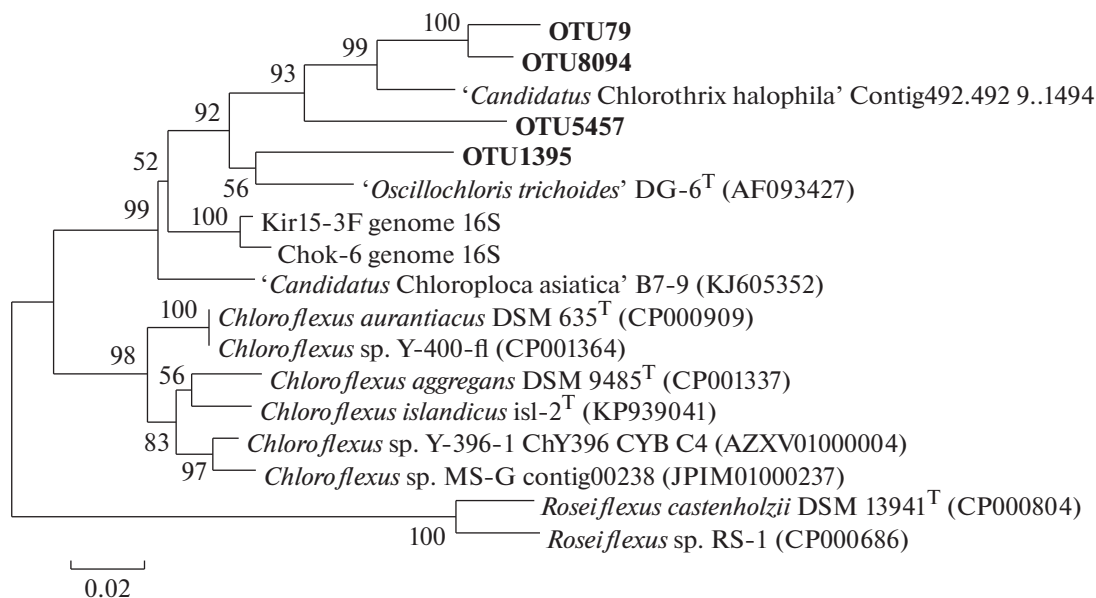


Рис. 8. Филогенетическое дерево, показывающее филогенетическое разнообразие OTU, относящихся к АНФБ. Дендрограмма построена на основании анализа последовательностей гена 16S рРНК с использованием алгоритма максимального подобия (Maximum Likelihood). Достоверность ветвления рассчитана по результатам анализа 500 альтернативных дендрограмм. Длина сравниваемых последовательностей составляла 440 пар нуклеотидов.

мира и планетарных процессов” (подпрограмма 2), гранта РФФИ № 19-04-00423 и Министерства науки и высшего образования РФ.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит материалов каких-либо исследований с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Горленко В.М., Пучков А.Н., Демчев В.В. Фотосинтезирующие микроорганизмы супралиторальных ванн Белого моря // Биологические науки. 1985. Т. 5. С. 66–72.

Лунина О.Н., Саввичев А.С., Бабенко В.В., Болдырева Д.И., Колганова Т.В. Краснова Е.Д., Кокрятская Н.М., Веслополова Е.Ф., Воронов Д.А., Демиденко Н.А., Летарова М.А., Летаров А.В., Горленко В.М. Сезонные изменения структуры сообщества аноксигенных фототрофных бактерий меромиктического озера Трехцветное (Кандалакшский залив Белого моря) // Микробиология. 2019. Т. 88. № 1. С. 100–115.

Lunina O.N., Savvichev A.S., Babenko V.V., Boldyreva D.I., Kuznetsov V.B., Krasnova E.D., Kolganova T.V., Kokryatskaya N.M., Veslopolova E.F., Voronov D.A., Demidenko N.A., Letarova M.A., Letarov A.V., Gorlenko V.M. Seasonal variations in community structure of anoxygenic phototrophic bacteria from the meromictic Lake Trekhtsvetnoe (Kanda-

laksha Bay, White Sea) // Microbiology (Moscow). 2019. V. 88. P. 71–85.

Саралов А.И. Адаптивность экстремофилов *Archaea* и *Bacteria* // Микробиология. 2019. Т. 88. № 4. С. 377–400.

Awramik S.M. The oldest records of photosynthesis // Photosynth. Res. 1992. V. 33. P. 75–89.

Caporaso J.G., Kuczynski J., Stombaugh J., Bittinger K., Bushman F.D., Costello E.K., Fierer N., Peña A.G., Goodrich J.K., Gordon J.I. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data // Nat. Methods. 2010. V. 7. P. 335–336.

de los Ríos A., Ascaso C., Wierchos J., Vincent W.F., Quesada A. Microstructure and cyanobacterial composition of microbial mats from the High Arctic // Biodivers. Conserv. 2015. V. 24. P. 841–863.

Edgar R.C., Haas B.J., Clemente J.C., Quince C., Knight R. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection // Bioinformatics. 2011. V. 27. P. 2194–2200.

Grouzdev D.S., Gaisin V.A., Krutkina M.S., Bryantseva I.A., Lunina O.N., Savvichev A.S., Gorlenko V.M. Genome sequence of *Prosthecochloris* sp. strain ZM and *Prosthecochloris* sp. strain ZM-2, isolated from an Arctic meromictic lake // Microbiol. Resour. Announc. 2018. V. 7. № 21. P. 1–3.

Habicht K.S., Gade M., Thamdrup B., Berg P., Canfield D.E. Calibration of sulfate levels in the Archean ocean // Science. 2002. V. 298. P. 2372–2374.

Herbert R.A., Tanner A.C. The isolation and some characteristics of photosynthetic bacteria (*Chromatiaceae* and *Chlorobiaceae*) from Antarctic marine sediments // J. Appl. Bacteriol. 1977. V. 43. P. 437–445.

Kappler A., Pasquero C., Konhauser K.O., Newman D.K. Deposition of banded iron formations by anoxygenic pho-

- trophic Fe(II)-oxidizing bacteria // *Geology*. 2005. V. 33. P. 865–868.
- Kirschvink J.L., Kopp R.E. Palaeoproterozoic ice houses and the evolution of oxygen-mediating enzymes: the case for a late origin of photosystem II // *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 2008. V. 363. P. 2755–2765.
- Krasnova E.D., Matorin D.N., Belevich T.A., Efimova L.E., Kharcheva A.V., Kokryatskaya N.M., Losyuk G.N., Todorenko D.A., Voronov D.A., Patsaeva S.V. The characteristic pattern of multiple colored layers in coastal stratified lakes in the process of separation from the White Sea // *J. Oceanol. Limnol.* 2018. V. 36. P. 1962–1977.
- Krumbein W.E. Stromatolites – the challenge of a term in space and time // *Precambrian Res.* 1983. V. 20. P. 493–531.
- Madigan M.T., Jung D.O., Woese C.R., Achenbach L.A. *Rhodoferrax antarcticus* sp. nov., a moderately psychrophilic purple nonsulfur bacterium isolated from an Antarctic microbial mat // *Arch. Microbiol.* 2000. V. 173. P. 269–277.
- Martínez-Alonso M., Bleijswijk J., Gaju N., Muyzer G. Diversity of anoxygenic phototrophic sulfur bacteria in the microbial mats of the Ebro Delta: a combined morphological and molecular approach // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2005. V. 52. P. 339–350.
- Nealson K., Berelson W. Layered microbial communities and the search for life in the universe // *Geomicrobiol. J.* 2003. V. 20. P. 451–462.
- Olson J.M. Photosynthesis in the Archean era // *Photosynth. Res.* 2006. V. 88. P. 109–117.
- Pfennig N. Anreicherungskulturen für rote und grüne Schwefelbakterien. *Zb. Bakt., 1 // Abt. Orig. Suppl.* 1965. V. 1. P. 503–504.
- Puchkova N.N., Imhoff J.F., Gorlenko V.M. *Thiocapsa litoralis* sp. nov., a new purple sulfur bacterium from microbial mats from the White Sea // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2000. V. 50. P. 1441–1447.
- Rabold S., Gorlenko V.M., Imhoff J.F. *Thiorhodococcus manitoliphagus* sp. nov., a purple sulfur bacterium from the White Sea // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2006. V. 56. P. 1945–1951.
- Schloss P.D., Westcott S.L., Ryabin T., Hall J.R., Hartmann M., Hollister E.B., Lesniewski R.A., Oakley B.B., Parks D.H., Robinson C.J. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities // *Appl. Environ. Microbiol.* 2009. V. 75. P. 7537–7541.
- Seckbach J., Oren A. *Microbial Mats* / Eds. Seckbach J., Oren A. Dordrecht: Springer Netherlands, 2010. 606 p.
- Tahon G., Tytgat B., Stragier P., Willems A. Analysis of *cbbL*, *nifH*, and *pufLM* in soils from the Sør Rondane Mountains, Antarctica, reveals a large diversity of autotrophic and phototrophic bacteria // *Microb. Ecol.* 2016. V. 71. P. 131–149.
- Tourova T.P., Keppen O.I., Kovaleva O.L., Slobodova N.V., Berg I.A., Ivanovsky R.N. Phylogenetic characterization of the purple sulfur bacterium *Thiocapsa* sp. BBS by analysis of the 16S rRNA, *cbbL*, and *nifH* genes and its description as *Thiocapsa bogorovii* sp. nov., a new species // *Microbiology (Moscow)*. 2009. V. 78. P. 339–349.
- van Gemerden H., Mas J. Ecology of phototrophic sulfur bacteria // *Anoxygenic photosynthetic bacteria* / Eds. Blankenship R.E., Madigan M.T., Bauer C.E. Dordrecht: Kluwer Academic Press, 1995. P. 49–85.
- Vincent W.F., Gibson J.A.E., Pienitz R., Villeneuve V., Broady P.A., Hamilton P.B., Howard-Williams C. Ice shelf microbial ecosystems in the high Arctic and implications for life on Snowball Earth // *Naturwissenschaften*. 2000. V. 87. P. 137–141.
- Walter M.R. Archean stromatolites: evidence of the Earth's earliest benthos // *Earth's Earliest Biosphere – Its Origin and Evolution* / Ed. Schopf J.W. Princeton: Princeton Univ. Press, 1983. P. 187–213.
- Wang Q., Garrity G.M., Tiedje J.M., Cole J.R. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy // *Appl. Environ. Microbiol.* 2007. V. 73. P. 5261–5267.
- Wharton R.A., Jr., Parker B.C., Simmons G.M., Jr. Distribution, species composition and morphology of algal mats in Antarctic dry valley lakes // *Phycologia*. 1983. V. 22. P. 355–365.

Bacterial Communities of Microbial Mats of the White Sea Supralittoral and of the Littoral of the Lakes Separated from the Sea

E. I. Burganskaya^{1,*}, D. S. Grouzdev¹, M. S. Krutkina¹, and V. M. Gorlenko¹

¹Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

*e-mail: kateburganskaya@gmail.com

Received April 1, 2019; revised April 15, 2019; accepted May 15, 2019

Abstract—Conditions of formation and phylogenetic composition were studied for pigmented biofilms and microbial mats of the Kandalaksha Bay (White Sea) supralittoral and of the littoral of the lakes separated from the sea. During the sampling period, salinity was 15 to 26 g/L, except for several desalinated salt marsh sites (4–11 g/L); the temperature was 9–12°C. The species composition and structure of benthic phototrophic communities were affected by severe climatic conditions of the area, including low average annual temperature and freezing of the littoral zones. Application of next-generation sequencing of the 16S rRNA gene V3–V4 regions combined with microscopy of the samples and obtained cultures for analysis of the biodiversity of microbial communities resulted in improved understanding of diversity of both oxygenic and anoxygenic bacteria in the Kandalaksha Bay littoral. No significant differences were revealed in species composition of microbial mats from salt marshes and shallow sites of the lakes of marine origin. Members of the phyla *Bacteroidetes* (up to 36%) and *Proteobacteria* (up to 67%) predominated in the mats and biofilms. The share of pho-

totrophic bacteria was 0.3–18%. Oxygenic phototrophs (cyanobacteria *Phormidium*, *Oscillatoria*, *Spirulina*, and *Anabaena*, as well as diatoms) predominated in the phototrophic community. The species number of anoxygenic phototrophic bacteria did not exceed 5% of all prokaryotes. These were mainly mesophilic marine species of purple sulfur bacteria of the genera *Thiorhodococcus* and *Thiocapsa*. No members of the family *Ectothiorhodospiraceae*, which are typical of microbial mats from southern seas, were found in subpolar microbial mats. Nonsulfur purple bacteria and aerobic anoxygenic phototrophic bacteria were mostly similar to the known marine species. Green sulfur bacteria (salt-water *Prosthecochloris* and *Chlorobium* species) were detected in two coastal mat samples from meromictic lakes. Anoxygenic filamentous phototrophic bacteria, which occurred in almost all benthic phototrophic communities, were represented by new phylotypes.

Keywords: White Sea lagoons and salt marshes, cyanobacterial mats, phototrophic communities, anoxygenic phototrophic bacteria, biosphere evolution