

УДК 579.26

## МИКРОБНОЕ НЕКУЛЬТИВИРУЕМОЕ СООБЩЕСТВО ДОННЫХ ОСАДКОВ ГЫДАНСКОЙ ГУБЫ И ЕНИСЕЙСКОГО ЗАЛИВА КАРСКОГО МОРЯ

© 2014 г. Е. В. Мамаева, М. Ю. Сулова, Т. В. Погодаева, В. В. Парфенова, Т. И. Земская

Лимнологический институт СО РАН, Иркутск

e-mail: elena\_m@lin.irk.ru

Поступила в редакцию 15.09.2012 г., после доработки 04.06.2013 г.

Методами молекулярной биологии (ПЦР, клонирование) исследовано разнообразие микроорганизмов в поверхностном слое донных отложений Гыданской губы и Енисейского залива Карского моря, различающихся по компонентному составу поровых вод и уровню минерализации. На основе анализа нуклеотидных последовательностей фрагментов гена 16S рРНК выявлены представители доменов *Bacteria* и *Archaea*.

Отмечено изменение состава сообществ микроорганизмов донных осадков по мере изменения градиента солености поровых вод. Как показал филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей, состав микробных сообществ в южных частях заливов находится под влиянием пресноводного стока рек и ручьев из озер с водосбора, в северных — под воздействием морских вод.

Полученные нами результаты указывают на присутствие в микробных сообществах донных осадков, бактерий способных использовать в качестве источника углерода широкий спектр субстратов, в том числе углеводороды, хлорорганические и ароматические соединения. Такие данные могут свидетельствовать как о присутствии загрязнений разного характера в осадках исследуемых районов, так и о потенциальной способности бактерий участвовать в деградации различных химических соединений, поступающих в воды и донные отложения Карского моря.

DOI: 10.7868/S0030157414030083

### ВВЕДЕНИЕ

Карское море характеризуется климатическими и гидрохимическими условиями, формирующимися под воздействием поступающих соленых вод частично из Баренцева моря, частично из Арктического бассейна, а также мощного пресноводного стока Оби и Енисея, годовой объем которого составляет более 40% всего стока пресной воды в Арктику [36]. Вместе с речной водой в Карское море поступают биогенные элементы, а также взвешенное и растворенное органическое вещество [13, 15, 20], большая часть которого осаждается вблизи прибрежной зоны [11]. В открытое море попадает лишь небольшой процент от всего поступающего со стоком органического вещества. Поэтому именно в зоне шельфа и эстуариях рек наиболее активно развиваются планктонные и бентосные водоросли и бактерии [4, 14].

Карское море считается олиготрофным из-за его низкой продуктивности, связанной с длительным ледовым покровом и долгопериодными отрицательными температурами воздуха и воды. С начала 20 века в Карском море проводятся периодические комплексные экспедиции [12, 25], в которых исследуется качественный и количественный состав микробных сообществ методами культивирова-

ния и микроскопии [2, 3, 6, 8, 9, 21, 22, 23], бактериальная первичная продукция [19], а также микробные процессы циклов метана и серы в водной толще и донных осадках [10, 16, 18]. Исследования разнообразия некультивируемых природных сообществ микроорганизмов методами современной филогенетики в Карском море ранее не проводились, хотя имеются публикации о таксономической структуре микробных сообществ районов Арктики и Антарктики [27, 29, 44, 45]. Такое состояние дел и определило цель нашей работы. А именно, изучение таксономического разнообразия микробного сообщества донных осадков заливов и шельфа Карского моря с помощью методов амплификации и клонирования.

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Район исследования.** Исследования проводили в секторе Российской Арктики между 75° и 87° в.д. и с юга около 70° с.ш. Материалом для работы послужили пробы донных отложений, отобранные на 5 станциях на шельфе Карского моря, заливах Гыданском и Енисейском в ходе экспедиции на теплоходе “Советская Арктика” в августе–октябре 2009 г. (рис. 1).

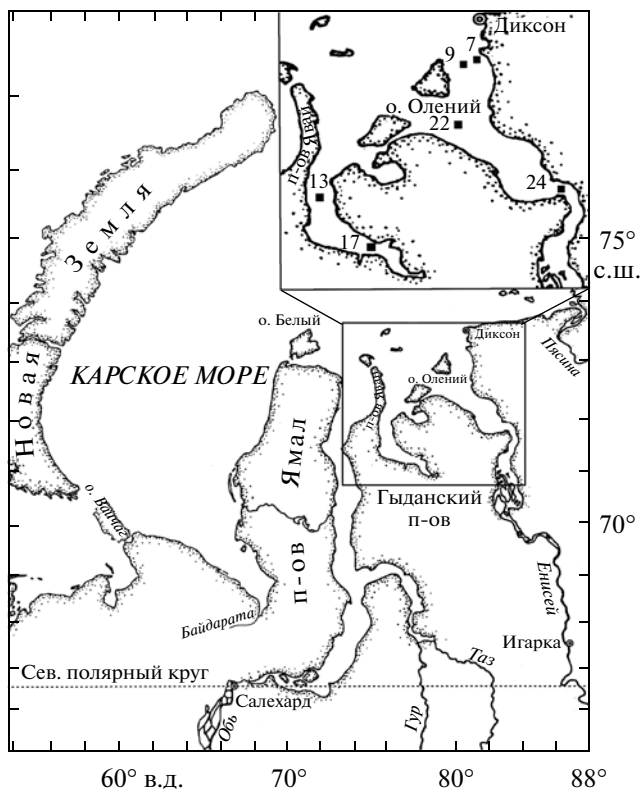


Рис. 1. Места отбора проб донных осадков.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Пробы донных осадков отбирали гравитационной трубкой (длиной 75 см) на станциях 13 и 17, и дночерпателем на станциях 7, 22 и 24. Поскольку измерения отдельных ионов на ст. 7 не прово-

дили, мы использовали данные химического состава поровых вод для расположенной рядом ст. 9 (таблица).

Отбор образцов проводили стерильно из срединной части керна, и затем, до момента исследования, пробы хранили в жидком азоте.

**Поровая вода** из образцов донных осадков была получена двойным центрифугированием при 10000 и 14000 об/мин. Измерения концентрации анионов и катионов в поровой воде осуществляли в соответствии с ранее описанными методами [57].

**Выделение суммарной ДНК** из поверхностного слоя донных осадков проводили методом фенол-хлороформной экстракции [49]. Фрагменты гена 16S рРНК эубактерий и архей амплифицировали с использованием универсальных эубактериальных праймеров 500L (CGTGCCAGCAGCCGCGGTAA) и 1350R (GACGGGCGGTGTGTACAAG). Амплификацию проводили на приборах “БИС” и “Му Cyclor”, Bio-Rad в режиме: 94°C – 3 мин (1 цикл), 94°C – 45 с, 53°C – 45 с, 72°C – 60 с (30 циклов), 72°C – 2 мин (1 цикл). О наличии ампликонов и их молекулярной массе судили по результатам электрофоретического разделения в 1% агарозном геле. Амплифицированные фрагменты гена 16S рРНК были лигированы с использованием набора pGEM-T Easy Vectors (“Promega”, США). Для получения рекомбинантов использовали компетентные клетки *E. coli* DH5-α. Трансформацию проводили методом, описанным ранее [40]. Отбор полученных клонов проводили методом “бело-голубого” скрининга. Колонии проверяли на наличие ожидаемой вставки амплификацией на праймерах 1F/1R (“Promega”).

Характеристика районов Енисейского залива и Гыданской губы Карского моря

Станции	Координаты: с.ш. в.д.	Используемый пробоотборник	Глубина водной толщи, м	Минерализация в поровой воде из поверхностного слоя осадка, г/л	Солевой состав поровых вод в поверхностном слое осадка, г/л						
					HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Cl <sup>-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>
7	73°150' 80°274'	Дч	25.0	—	—	—	—	—	—	—	—
9	73°083' 79°981'	БТ	23.0	30.0	0	17.5	2.3	8.3	0.5	0.2	1.0
22	72°557' 79°302'	Дч	13.5	22.9	0	13.2	1.8	6.7	0.3	0.2	0.7
24	71°875' 82°823'	Дч	9.5	0.3	0.06	0.1	0.02	0.06	0.006	0.01	0.004
13	71°776' 75°809'	БТ	10.7	8.9	0	5.1	0.8	2.5	0.01	0.06	0.2
17	71°193' 77°459'	БТ	4.5	0.1	0.06	0.03	0.007	0.03	0.006	0.003	0.002

Примечание. Дч – дночерпатель, БТ – бентосная трубка, прочерк – отсутствие данных.

Секвенирование клонированных фрагментов генов 16S рРНК проводили в Центре коллективного пользования “Геномика” СО РАН (г. Новосибирск). Для полученных последовательностей фрагментов гена 16S рРНК ближайших гомологов находили с использованием поисковой программы BLAST сервера NCBI в базе данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) [26]. Полученные последовательности на наличие химер проверяли в программе Pintail (<http://www.bioinformatics-toolkit.org/Web-Pintail/>). Редактирование последовательностей проводили с помощью редактора BioEdit, для выравнивания последовательностей использовали алгоритм программы CLUSTAL W [<http://www.genebee.msu.su/clustal>]. Филогенетические деревья строили с использованием метода объединения ближайших соседей (neighbor-joining) на основе алгоритма Kimura two-parameters в программе MEGA версия 4.0 [51]. Показатель достоверности порядка ветвления определяли на основании “bootstrap” – анализа 100 альтернативных деревьев.

Полученные в ходе работы нуклеотидные последовательности клонированных фрагментов гена 16S рРНК депонированы в базе данных GenBank под номерами JN203014 – JN203042, JN133442 – JN133497, JX413060 – JX413100, JX441119 – JX441299.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### *Характеристика химического состава поровых вод и донных осадков*

Химический состав поровых вод и характеристики донных осадков представлены в таблице. Южные районы Гыданской губы (ст. 17) и Енисейского залива (ст. 24) по минерализации придонной воды можно отнести к пресным (0.1–0.3 г/л), а северные районы заливов (станции 13 и 22) и шельф Карского моря (ст. 7) – к морским (8.9–22.9 г/л), (30.7 г/л) [17]. Компонентный состав поровых вод на всех исследуемых станциях был одинаков, а концентрации отдельных ионов варьировали значительно (таблица).

Наименее минерализованы (0.1 г/л) поровые воды в поверхностном слое донных отложений южной части Гыданской губы (ст. 17). Концентрации сульфат-ионов равны 0.007, гидрокарбонат-ионов – 0.06, ионов натрия – 0.03 г/л. Поровые воды донных осадков южной части Енисейского залива (ст. 24) также опреснены, общая минера-

лизация составляет 0.3 г/л. Солевой состав и уровень концентраций основных ионов схож с такими на станции 17 (таблица). В северной части Гыданской губы (ст. 13) минерализация поровых вод достигает 8.9 г/л, увеличивается содержание сульфат-ионов до 0.8 г/л, возрастают значения хлорид-ионов, ионов магния, натрия (таблица). Значительное увеличение уровня минерализации поровых вод наблюдается в районе устья р. Енисей (ст. 22), где в поверхностном слое осадка она составляет 22.9 г/л, содержание хлорид-ионов равно 13.2, сульфат-ионов 1.8 и ионов натрия 6.7 г/л, соответственно (таблица). Под влиянием морских вод находятся станции 7 и 9, общая минерализация в поверхностном слое осадков этих станций достигает 30.7 и 31.7 г/л, соответственно. В поровых водах этих станций повышается концентрация сульфат-ионов до 2.3, хлорид-ионов до 17.5, ионов натрия до 8.3 г/л.

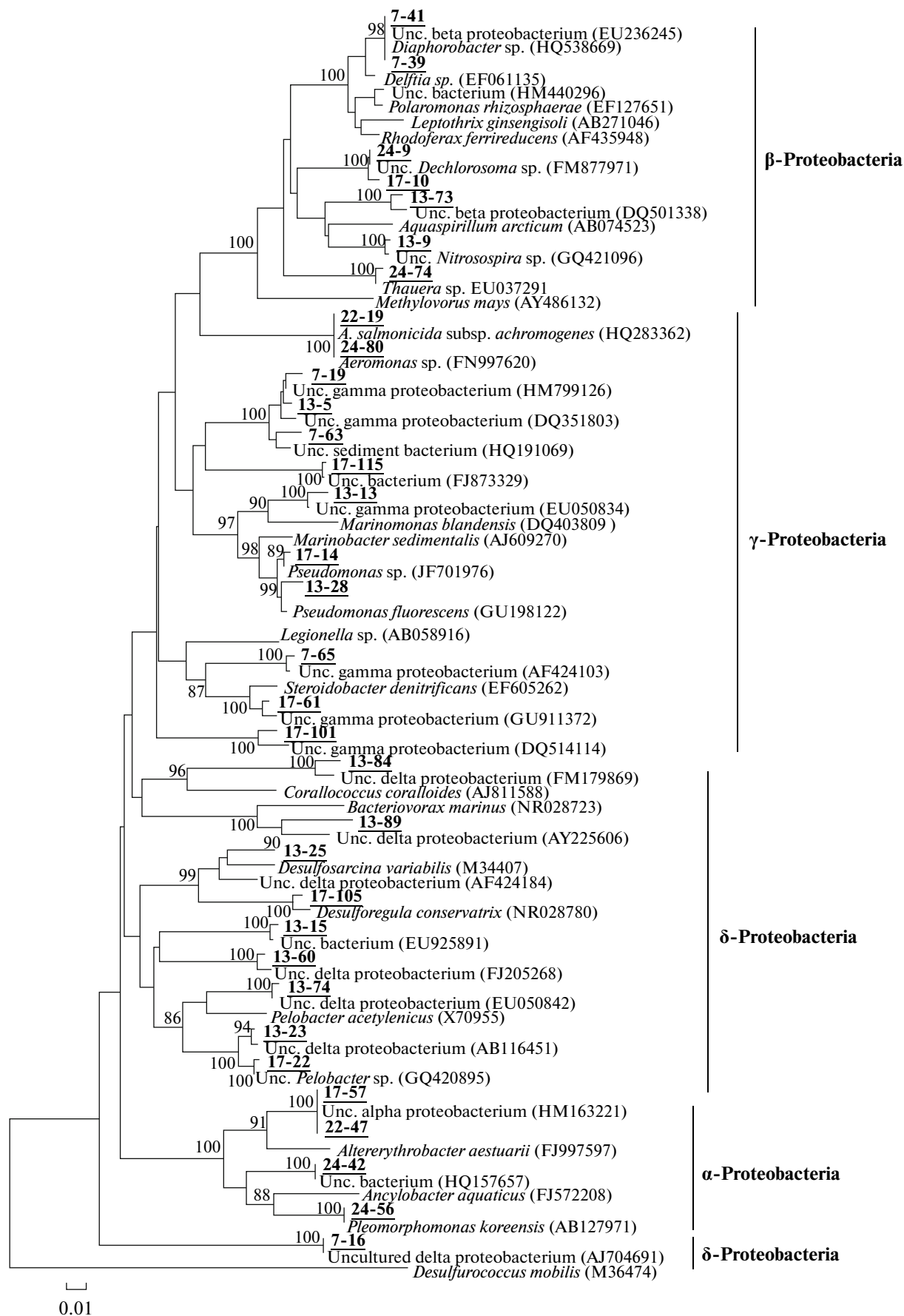
### *Анализ разнообразия и таксономического состава библиотек клонов фрагментов гена 16S рРНК*

В результате исследования суммарной ДНК из поверхностного слоя донных осадков пяти станций получена библиотека клонов, содержащая фрагменты гена 16S рРНК эубактерий и архей длиной до 900 пар нуклеотидов. 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 (рис. 2, 3).

В суммарной ДНК из донных отложений южной части Гыданской губы (ст. 17), характеризующихся самым низким уровнем минерализации поровых вод, идентифицированы представители бактерий филумов *Actinobacteria*, *Acidobacteria*, *Chloroflexi*, *Planctomycetes*, *Spirochaetes*, *Synergistetes*, классы  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -*Proteobacteria*, а также археи филума *Euryarchaeota* (всего 84 клон).

К филуму *Actinobacteria* отнесено 29 клонов, один из которых (17–23) принадлежит сем. *Micrococcineae*, его ближайший родственник, *Leifso-*

**Рис. 2.** Филогенетическое дерево, построенное на основе анализа нуклеотидных последовательностей фрагментов гена 16S рРНК  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -*Proteobacteria*, полученных из поверхностного слоя донных осадков пяти исследуемых станций шельфа Карского моря, Гыданской губы и Енисейского залива. Построено с помощью метода объединения ближайших соседей (NJ). Вероятностная поддержка отдельных узлов оценивалась с помощью “bootstrap”-анализа, приведены значения выше 85%. Шкала соответствует 0.01 нуклеотидных замен на сайт. Клоны, полученные из донных осадков, выделены и подчеркнуты.



*nia* sp., найден в мангровых осадках Бразилии (99%). 23 клон проявили высокий уровень сходства с представителями рода *Rhodococcus*, причем девять имели сходство с видом *Rhodococcus qingshengii*, который может в качестве единственного источника углерода или азота использовать противогрибковые препараты, применяемые в сельском хозяйстве [56]. Еще 12 последовательностей проявили высокий уровень сходства с последовательностью *Rhodococcus* sp., выделенной из загрязненной нефтью почвы, Китай.

Нуклеотидная последовательность клона 17-51, представляющая филум *Spirochaetes*, была сходна с последовательностью бактерии из микробных матов (97%). Представители *Spirochaetes* относятся к хемоорганогетеротрофам, аэробные и анаэробные виды которых встречаются как в почвенных, так и в водных экосистемах. К классу  $\alpha$ -*Proteobacteria* отнесено три клон. Клон 17-57 имел 99% сходства с некультивируемой бактерией из поверхностного слоя загрязненных осадков, а клон 17-7 – с бактерией из гиперсоленых микробных матов в Тихом океане. Представители этого класса способны окислять разнообразный спектр органических веществ [37].

Принадлежность к классу  $\beta$ -*Proteobacteria* показало 14 клонов, из них клон 17-10 был идентифицирован как представитель рода *Dechlorosoma*, изолированного из грунтовых вод, США. Бактерии этого рода известны как деструкторы хлората и перхлората (до хлорида), некоторые используют нитрат в качестве акцептора электрона [37]. Две последовательности были идентифицированы как *Burkholderia* sp., известных своей способностью разрушать хлорорганические пестициды и полихлорированные бифенилы (ПХБ) [37]. Принадлежность роду *Variovorax* определена для последовательности 17-93 с уровнем сходства 93%. Для последовательности 17-27 наибольшее сходство отмечено с бактерией *Variovorax paradoxus*, изолированной из ризосферы в Гималаях. Представители этого рода способны разрушать различные загрязняющие вещества, включая пестициды и сырую нефть [50].

Шесть клонов проявили высокий уровень сходства (99%) с представителями рода *Thauera* sp. сем. *Rhodocyclaceae*, известными своей способностью к метаболизму ароматических соединений в бескислородных условиях. Ближайшие родственники полученных клонов выделены из осадков в США, загрязненной хромом почвы в Индии и тяжелыми металлами в Китае, а также из эстуарных осадков. Представители этого рода встречаются в донных осадках и загрязненных пресных водах [37].

Четыре последовательности отнесены к классу  $\gamma$ -*Proteobacteria*. Последовательность клона 17-14 на 99% сходна с *Pseudomonas* sp. из почвы в Китае. Еще один клон, 17-61, показал высокое сходство

с последовательностью из района естественных нефтепроявлений из оз. Байкал. Четыре клон отнесено к классу  $\delta$ -*Proteobacteria*, причем последовательность 17-22 сходна на 99% с *Pelobacter* sp. из ледника в Индии. Клон 17-105 показал 98% сходства с видом *Desulforegula conservatrix* из пресноводного озера в Австралии, который окисляет неразветвленные карбоновые кислоты [48].

Принадлежность к бактериям филума *Chloroflexi*, представители которых способны окислять аммоний, показали два клон, один из них, (17-106), проявил 98% сходства с некультивируемой почвенной бактерией из Кореи. Еще три последовательности принадлежат филуму *Acidobacteria*, одна из них, 17-112, на 98% идентична некультивируемой бактерии из осадков в устье р. Янцзы, Китай. Бактерии этого филума часто встречаются в донных отложениях и почвах, способны деградировать низко и высокомолекулярные формы органических веществ, восстанавливать нитраты и нитриты [54].

Принадлежность к филуму *Synergistetes* показала последовательность клона 17-103, проявив 98% сходства с некультивируемой бактерией из почвы в Японии. Представители этого таксона являются облигатными анаэробами, способны разрушать аминокислоты, и как правило, составляют незначительную часть бактериального сообщества в каждой конкретной среде обитания. Следует отметить низкую степень сходства (93%) клона 17-28 с бактерией из антарктического озера. На филогенетическом дереве он кластеризуется с представителями филума *Planctomycetes* (рис. 3). Бактерии этого филума обитают в пресных и соленых водах [55], являются важными членами почвенных микробных сообществ, детектируются в анаэробных источниках, богатых соединениями серы [30, 34].

Кроме бактериальных последовательностей, в ДНК осадков южной части Гыданской губы (ст. 17) обнаружена последовательность археи 17-20 филума *Euryarchaeota*. Сходная на 96% с некультивируемой археей YLA118 полученная последовательность кластеризуется с представителями из глубоководного гидротермального вента группы-6 *Euryarchaeal* в оз. Йеллостоун, США.

Таксономический состав микробного сообщества в маломинерализованных донных осадках южной части Енисейского залива (ст. 24) характеризуется большим разнообразием. В ДНК этих осадков обнаружены представители (156 последовательностей) тех же филумов, что на ст. 17 (*Actinobacteria*, *Acidobacteria*, *Chloroflexi*, *Planctomycetes*, классов  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -*Proteobacteria*) за исключением таксона *Gemmatimonadetes*. Наибольшее количество последовательностей (58) отнесено к классу  $\gamma$ -*Proteobacteria*. Для клона 24-80 отмечено 99% сходства с родом *Aeromonas* из устьевых осадков рек в Англии

(рис. 2). Организмы этого рода широко распространены в пресных и солоноватых водах. Клон 24-24 имел высокий уровень сходства с некультивируемой серобактерией *Beggiatoa* sp. сем. *Thiotrichaceae*, изолированной из речного осадка в Германии.

Здесь также выявлены представители филума *Actinobacteria* (48 клонов), большая часть которых показала высокий уровень сходства с бактериями родов *Rhodococcus* и *Leifsonia*. Их ближайшие родственники изолированы из загрязненных металлами и углеводородами мест, почв, ледников, осадков Антарктики, морских осадков. Клоны 24-64 и 24-179 имели наибольшее сходство с типовым штаммом *Rhodococcus erythropolis* (99%) и некультивируемой почвенной бактерией (99%).

Как и на ст. 17, обнаружены представители класса  $\beta$ -*Proteobacteria* (5 клонов), широко распространенные в пресноводных экосистемах [38]. Для клона 24-9 ближайший таксономический родственник – некультивируемая бактерия из культуральной жидкости (99%), для клона 24-74 это вид *Thauera* sp. (99%) из загрязненной почвы. Филогенетический анализ показал, что клон 24-133 имеет сходство с последовательностью, выделенной из загрязненных углеводородами осадков во Франции (99%) и относящейся к филуму *Bacteroidetes*. Представители этого филума являются гетеротрофами и участвуют в деградации высокомолекулярного органического вещества в водных экосистемах [31, 41]. К классу  $\alpha$ -*Proteobacteria* относятся 14 клонов. Последовательность клона 24-42 на 99% сходна с некультивируемой бактерией из солеварни, Франция. Последовательность 24-56 имеет 99% сходства с *Pleomorphomonas korensis* сем. *Methylocystaceae*, способных к фиксации азота. Остальные последовательности представлены некультивируемыми бактериями.

Клон 24-102 отнесен к филуму *Gemmatimonadetes* (почва, Китай 99%), представители которого составляют небольшой процент в микробных сообществах почв [33]. Один клон 24-96 относится к филуму *Chloroflexi*, его ближайший родственник (98%) обнаружен в мерзлоте в районе дельты р. Лена. Кроме того, в ДНК этого образца обнаружены представители филума *Acidobacteria* (3 клона), один из них (24-13) показал сходство 98% с бактерией из почвы, Тайвань. Низкую степень сходства (95%) с бактерией из почвы (США) и из озера (Тибет) показали клоны 24-95 и 24-119. На филогенетическом дереве они кластеризовались с представителями *Planctomycetes* (рис. 3).

В библиотеке клонов фрагментов гена 16S рРНК, полученных из ДНК донных осадков северной части Гыданской губы (ст. 13) со средним уровнем минерализации выявлен более широкий спектр таксонов. Обнаружены представители филумов *Actinobacteria*, *Acidobacteria*, *Bacteroidetes*,

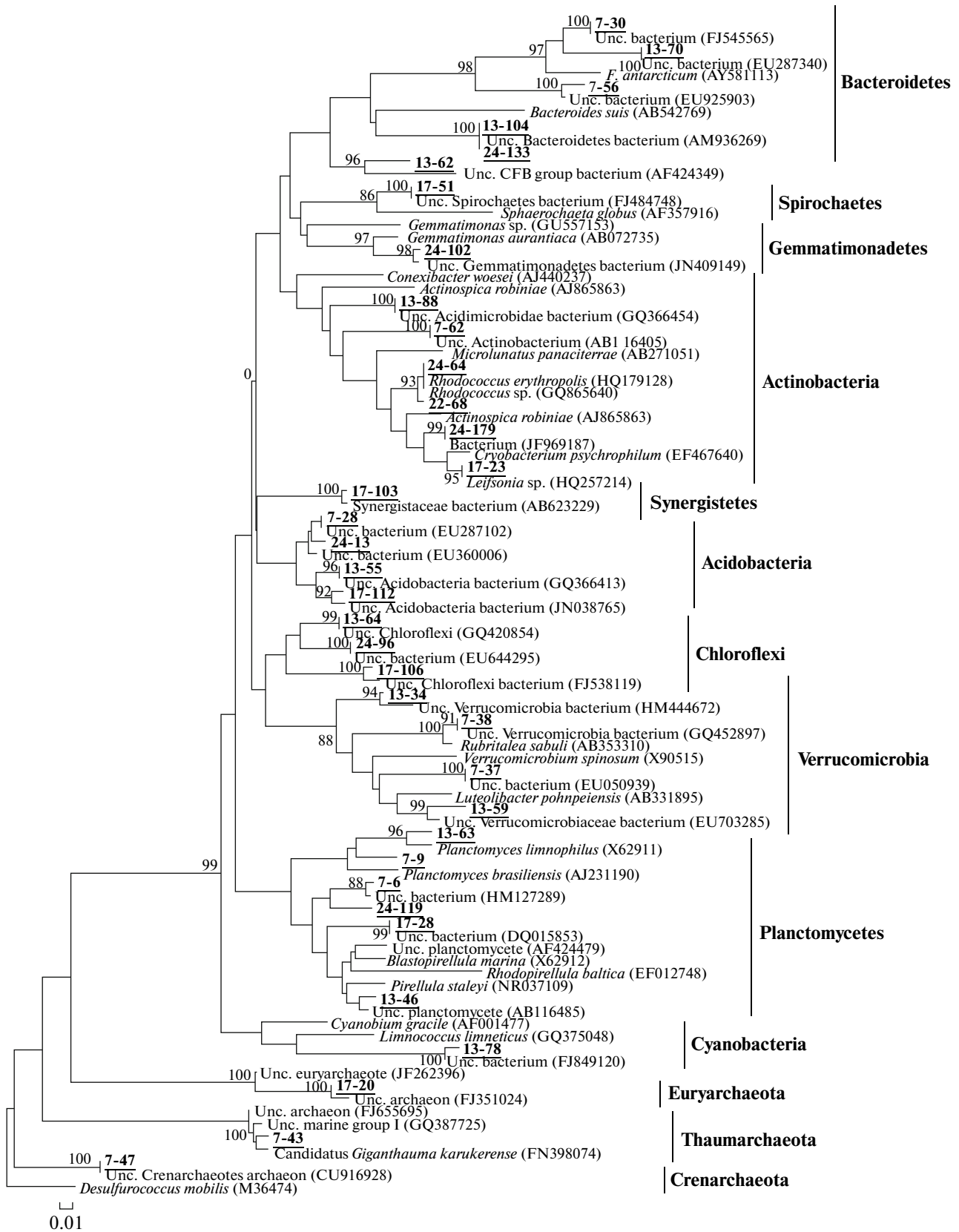
*Chloroflexi*, *Verrucomicrobia*, *Planctomycetes*, *Cyanobacteria*, классов  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -*Proteobacteria*. Два клона имеют наибольшее сходство с представителями *Actinobacteria*, один из них, 13-88, на 99% сходен с некультивируемой бактерией из почв Гималаев. Три клона 13-62, 13-70 и 13-104 отнесены к филуму *Bacteroidetes*, их ближайшие гомологи обнаружены в осадках Антарктики (некультивируемая бактерия из группы CFB, 92%), Арктики (некультивируемая бактерия, 98%) и в коллекции типовых штаммов (*Bacteroides suis*, 95%). Два клона 13-33 и 13-102 наиболее близки некультивируемому  $\alpha$ -*Proteobacteria* из осадков Антарктики (99%) и базальта Хуан-де-Фука, США (94%), соответственно.

Наибольшее количество клонов (15) отнесено к классу  $\gamma$ -*Proteobacteria*. Клон 13-5 наиболее близок некультивируемой бактерии из морских отложений в Бельгии (96%). Последовательность клона 13-28 на филогенетическом дереве (рис. 2) кластеризуется с видом *Pseudomonas fluorescens* из реки Волюв в Бельгии, представители которых являются активными деструкторами органических веществ. К классу  $\beta$ -*Proteobacteria* принадлежат 4 клона. Клон 13-9 сходен с автотрофом, способным к окислению аммония (*Nitrosospira* sp.) выделенным из почвы в Гималаях (99%), а клон 13-73 – с некультивируемой бактерией из пресной воды (97%).

Девять клонов отнесены к классу  $\delta$ -*Proteobacteria* причем их ближайшие родственники обитают в холодноводных экосистемах. Так, клон 13-15 имеет 97% сходства с некультивируемой бактерией из осадков Берингова моря, клоны 13-23 и 13-25 сходны с некультивируемыми бактериями из морских осадков (Япония, 99% и Арктика, 93%), клон 13-60 (97%) – с бактерией, из гидротермальных отложений (Китай), а клон 13-84 – с бактерией из осадков Северного моря (97%). Клон 13-89 имеет низкий процент сходства (92%) с некультивируемой бактерией из гидротермальных осадков Срединно-Атлантического хребта. Последовательность 13-67 идентична на 97% нуклеотидной последовательности порядка *Muxococcales*.

Как и на ст. 24, выявлены последовательности филума *Chloroflexi*, для одной из них показано сходство (99%) с некультивируемой бактерией из почвы в Гималаях. К филуму *Acidobacteria* отнесено 4 клона, один из ближайших родственников (13-55) с уровнем сходства 98% найден в ледниках Индии. Пять клонов принадлежат филуму *Verrucomicrobia*, отмечаемых в почвенных экосистемах и участвующих в цикле углерода [32]. Одна последовательность 13-34 проявила 99% сходства с некультивируемой бактерией из почвы, Чехия, 13-59 – 98% с некультивируемой бактерией из озера с Тибетского плато.

В ДНК осадков ст. 13 также выявлен представитель филума *Cyanobacteria* (13-78), который на



**Рис. 3.** Филогенетическое дерево, построенное на основе анализа нуклеотидных последовательностей фрагментов гена 16S рРНК бактерий и архей, полученных из поверхностного слоя донных осадков пяти исследуемых станций шельфа Карского моря, Гыданской губы и Енисейского залива. Построено с помощью метода объединения ближайших соседей (NJ). Вероятностная поддержка отдельных узлов оценивалась с помощью “bootstrap”-анализа, приведены значения выше 85%. Шкала соответствует 0.01 нуклеотидных замен на сайт. Клоны, полученные из донных осадков, выделены и подчеркнуты.

филогенетическом дереве (рис. 3) кластеризуются с бактерией из арктических вод. Более разнообразно по сравнению с предыдущими образцами, представлен филум *Planctomycetes*. Последовательность 13-46 имела сходство (96%) с таковой из морских осадков (Япония), а 13-63 — 97% с *Planctomyces limnophilus* из почвы.

Менее разнообразно микробное сообщество в донных отложениях ст. 22, характеризующихся высокой минерализацией поровых вод. Получено 56 последовательностей, принадлежащих *Actinobacteria* и  $\alpha$ -,  $\gamma$ -*Proteobacteria*, причем наибольшее их количество отнесено к классу  $\gamma$ -*Proteobacteria*. Последовательность 22-19 имеет 99% сходство с видом *Aeromonas salmonicida* subsp. *achromogenes*. Два клона попали в класс  $\alpha$ -*Proteobacteria*, ближайший родственник одного из них, 22-47, обнаружен в загрязненных осадках (99%). Кроме того, отмечены представители филума *Actinobacteria*, которые присутствовали во всех исследуемых образцах. Ближайший родственник (99%) клона 22-68 *Rhodococcus* sp. обнаружен в почве, Индия.

В ДНК осадков с высокой минерализацией (ст. 7) также отмечен разнообразный состав микробных сообществ. Получено 30 последовательностей филумов бактерий *Actinobacteria*, *Acidobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Planctomycetes*, классов  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -*Proteobacteria*, и филумов архей *Thaumarchaeota* и *Crenarchaeota*. Для большинства нуклеотидных последовательностей ближайшими родственниками являлись некультивируемые микроорганизмы донных осадков холодноводных морей. Так к представителям класса  $\gamma$ -*Proteobacteria* отнесено 5 клонов, из них клоны 7-63 и 7-65 сходны на 97 и 99% с последовательностями из литоральных осадков Боденского озера и осадков Антарктики, соответственно.

Клоны 7-39 и 7-41, отнесенные к классу  $\beta$ -*Proteobacteria*, обнаруживают сходство (99%) с видом *Diaphorobacter* sp. из ила (Китай) и с бактерией из осадков, загрязненных радионуклидами (США). 4 клона, принадлежащие филуму *Verrucomicrobia*, имеют наибольшее сходство с некультивируемыми формами, к примеру, клоны 7-37 и 7-38 на 99% сходны с бактерией из арктических осадков Свальбарда и придонной воды Берингова моря. Идентифицированные бактерии филума *Planctomycetes* (4 клона) представлены некультивируемыми формами. Клоны 7-6 и 7-9 наиболее близки таковым из озера с Тибетского плато (98%) и осадков Антарктики (92%), соответственно. Одна последовательность 7-16 принадлежит классу  $\delta$ -*Proteobacteria* и проявила 99% сходство с не-

культивируемой бактерией из осадков Баренцева моря. Три клона отнесены к представителям филума *Actinobacteria*. Последовательность 7-62 оказалась наиболее близка некультивируемой бактерии из морских осадков (98%), а 7-28 — последовательности из арктических осадков (99%), принадлежащей филуму *Acidobacteria*. Две последовательности 7-30 и 7-56 имеют сходство 99% с некультивируемыми последовательностями *Bacteroidetes* из осадков Желтого и Берингова морей.

В ДНК из осадков ст. 7 обнаружены также представители домена *Archaea*. 4 последовательности имели сходство с некультивируемыми археями, одна из них, 7-43, с клоном из осадков солончака (98%). На филогенетическом дереве она кластеризуется с представителем филума *Thaumarchaeota* — некультивируемой архей из поверхностной воды в Средиземном море и *Candidatus Giganthauma karukerense* из морских осадков. Клон 7-47 оказался наиболее близок некультивируемой архее из анаэробного реактора по обработке сточных вод (98%), на филогенетическом дереве он образует кладу с представителем филума *Crenarchaeota* (рис. 3).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные нами данные показывают, что состав микробных сообществ донных осадков Енисейского залива и Гыданской губы Карского моря изменялся по мере изменения градиента солёности поровых вод. Известно, что устьевые области рек и приустьевые морские воды являются зонами геохимических барьеров, где происходит смена форм миграции различных веществ, в том числе органических [11]. Большая роль в деструкции поступающих неорганических и органических веществ принадлежит микроорганизмам. В таких зонах увеличиваются численность и активность бактерий, изменяется структура микробных сообществ [5, 42 и др.].

В исследованных нами районах влияние стока рек наиболее заметно в южных частях Гыданской губы (ст. 17) и Енисейского залива (ст. 24). В первом районе (ст. 17), где происходит сток рек Гыда, Юрибей и многочисленных озёр с территории водосбора, донные осадки опреснены [1, 24]. В микробных сообществах этого района одна треть полученных последовательностей принадлежит бактериям рода *Rhodococcus* филума *Actinobacteria*. Представители этого рода известны как активные деструкторы высокомолекулярных n-алканов, сырой нефти, хлорорганических соединений в за-



грязненных экосистемах [7, 43]. Здесь выявлены бактерии, относящиеся к разным филогенетическим линиям. В частности, обнаружены последовательности класса  $\beta$ -*Proteobacteria* рода *Thauera*, способные разрушать хлорорганические и ароматические соединения, классов  $\gamma$ - и  $\delta$ -*Proteobacteria* родов *Pseudomonas* и *Pelobacter*, известные как активные участники биоремедиации ароматических углеводородов, простых и сложных органических компонентов [37].

Отмеченные здесь представители  $\alpha$ -*Proteobacteria*, *Chloroflexi*, *Acidobacteria*, *Synergistaceae* имеют некультивируемых ближайших родственников из пресноводных (озера, ледники) и почвенных экосистем, являются фото- и гетеротрофами. Следует отметить также присутствие археи филума *Euryarchaeota*, представители которого участвуют в образовании метана.

В донных осадках южной части Енисейского залива (ст. 24) микробное сообщество включало представителей, изолированных из почвенных экосистем, ледников, осадков Антарктики, загрязненных металлами и углеводородами мест. Также отмечено наличие представителей родов *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, являющихся деструкторами широкого спектра органических веществ, как аллохтонного так и автохтонного происхождения [37, 43, 53]. Кроме того, из ДНК осадков этого района выявлены микроорганизмы, участвующие в окислении метана (сем. *Methylocystaceae*) и способные к фиксации азота (*Thauera* sp.).

В ДНК из осадков ст. 24, как и в дельте р. Лена, выявлены последовательности, имеющие сходство с некультивируемыми представителями различных таксонов, участвующих в глобальных циклах углерода и азота и являющихся важными членами микробных сообществ [35, 9, 54].

Увеличение минерализации в северной части Гыданской губы (ст. 13), скорее всего, обусловлено влиянием вод Карского моря. Здесь преобладают некультивируемые представители  $\gamma$ - и  $\delta$ -*Proteobacteria*, которые являются хемотрофными бактериями. Выявлены серные бактерии, обитающие как в гидротермальных отложениях бассейна Гуаймас, так и в холодноводных экосистемах, например в районе архипелага Шпицберген [47, 52]. Как и в других образцах, обнаружены разнообразные микроорганизмы родов *Nitrosospira* и *Pseudomonas* классов  $\beta$ - и  $\gamma$ -*Proteobacteria*, рода *Flavobacterium* филума *Bacteroidetes*, филума *Actinobacteria*. Представители этих бактерий способны окислять аммоний и широкий спектр органических веществ.

В северной части Енисейского залива (ст. 22), где химический состав поровых вод соответствует морскому, преобладают представители класса  $\gamma$ -*Proteobacteria*. *Actinobacteria* и  $\alpha$ -*Proteobacteria*, обитающие в загрязненных тяжелыми металлами и углеводородами местах. Среди них выявлены фототрофы и метилотрофы. Несмотря на

высокую минерализацию поровых вод, в составе микробного сообщества донных осадков этой зоны выявлены представители бактерий, обитающих в пресноводных и почвенных экосистемах. Скорее всего, это аллохтонные виды, поступившие со стоком рек и адаптировавшиеся к существованию в водах с высокой минерализацией.

В районе шельфа Карского моря (ст. 7) с минерализацией, характерной для морских осадков, отмечено доминирование некультивируемых представителей  $\gamma$ -*Proteobacteria*, *Verrucomicrobia* и *Planctomycetes*. Большая их часть сходна с типичными представителями холодноводных морей Арктики и Антарктики, где отмечается высокое разнообразие микробных популяций [28, 29, 46, 58]. Ближайшие их родственники задействованы в глобальных циклах углерода и азота, некоторые способны окислять метан при экстремально низких значениях рН 2.0–2.5 [32, 35, 39]. В сообществе осадков также присутствовали археи, являющиеся хемолитотрофами, играющими немаловажную роль в круговороте углерода.

Таким образом, таксономическая структура микробных сообществ донных осадков в исследуемых нами районах характеризуется достаточно большим разнообразием и зависит от уровня минерализации поровых вод, которая, в свою очередь, определяется стоком рек и многочисленных ручьев, а также влиянием морских вод. Как показал филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей, состав микробных сообществ в южных частях заливов находится, главным образом, под влиянием пресноводного стока рек и ручьев из озер на территории водосбора, в северных — преимущественно под воздействием морских вод.

Полученные нами результаты указывают на присутствие в микробных сообществах донных осадков, бактерий способных использовать в качестве источника углерода широкий спектр субстратов, в том числе углеводороды, хлорорганические и ароматические соединения. Такие данные могут свидетельствовать как о присутствии загрязнений разного характера в осадках исследуемых районов, так и о потенциальной способности бактерий участвовать в деградации различных химических соединений, поступающих в воды и донные отложения Карского моря.

Работа выполнена при поддержке программы Президиума РАН (проект 20.7).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Атлас Арктики. М.: Главное управление по геодезии и картографии, 1985. 204 с.
2. Байтаз В.А., Байтаз О.Н. Микробиологические исследования. Общий бактериопланктон и бактериобентос // Гидробиологические исследования Байдарацкой губы Карского моря в 1990–1991 гг. Апатиты: КРЦ РАН ММБИ, 1993. С. 6–13.
3. Буткевич В.С. Бактериальное население арктических морей и его распределение в воде и грунтах //

- Избр. труды. М.: Изд-во АН СССР, 1958. Т. II. С. 77–134.
4. Ведерников В.В., Демидов А.Б., Судьбин А.И. Первичная продукция и хлорофилл в Карском море в сентябре 1993 г. // *Океанология*. 1994. Т. 34. № 5. С. 693–703.
  5. Виноградов М.Е., Шушкина Э.А. Функционирование планктонных сообществ эпинелагали океана. М.: Наука, 1987. 240 с.
  6. Исаченко Б.Л. Микробиологическая характеристика грунтов и воды Карского моря // Избр. труды. М.: Л., Изд-во АН СССР. 1951. С. 334–363.
  7. Коронелли Т.В., Дермичева С.Г., Ильинский В.В. Видовая структура углеводородокисляющих бактериоценозов водных экосистем разных климатических зон // *Микробиология*. 1994. Т. 63. № 5. С. 917–923.
  8. Кресс А.Е. Морская микробиология. М.: Изд-во АН СССР, 1959. 455 с.
  9. Кресс А.Е. Микробиологическая океанография. М.: Наука, 1976. 78 с.
  10. Леин А.Ю., Русанов И.И., Саввичев А.С. и др. Биогеохимические процессы циклов серы и углерода в Карском море // *Геохимия*. 1996. № 11. С. 1027–1044.
  11. Лисицын А.П. Маргинальный фильтр океанов // *Океанология*. 1994. Т. 34. № 5. С. 735–747.
  12. Лисицын А.П., Виноградов М.Е. Международная высокоширотная экспедиция в Карское море (49-й рейс НИС “Дмитрий Менделеев”) // *Океанология*. 1994. Т. 34. № 5. С. 643–651.
  13. Лисицын А.П., Шевченко В.П., Виноградов М.Е. Потoki осадочного вещества в Карском море и в эстуариях Оби и Енисея // *Океанология*. 1994. Т. 34. № 5. С. 748–758.
  14. Мицкевич И.Н., Намсараев Б.Б. Численность и распределение бактериопланктона в Карском море в сентябре 1993 г. // *Океанология*. 1994. Т. 34. № 5. С. 704–708.
  15. Мошаров С.А., Мошарова И.В. Сравнительный анализ продукционных и микробиологических характеристик Карского и Чукотского морей // *Физические, геологические и биологические исследования океанов и морей*. М.: Научный мир, 2010. С. 495–505.
  16. Намсараев Б.Б., Русанов И.И., Мицкевич И.Н. и др. Бактериальное окисление метана в эстуарии реки Енисей и Карском море // *Океанология*. 1995. Т. 35. № 1. С. 88–93.
  17. Погодаева Т.В., Доля И.Н., Томберг И.В. и др. Поровые воды донных отложений Енисейского залива и Гыданской губы (Карское море) // *Природа шельфов и архипелагов Европейской Арктики*. 2010. Вып. 10. С. 253–256.
  18. Савичев А.С., Захарова Е.Е., Веслополова Е.Ф. и др. Микробные процессы циклов углерода и серы в Карском море // *Океанология*. 2010. Т. 50. № 5. С. 942–957.
  19. Сажин А.Ф., Романова Н.Д., Мошаров С.А. Бактериальная и первичная продукция в водах Карского моря // *Океанология*. 2010. Т. 50. № 5. С. 801–809.
  20. Сороковикова Л.М. Трансформация главных ионов и минерализации воды р. Енисей в условиях регулируемого стока // *Водные ресурсы*. 1993. Т. 20. № 3. С. 320–25.
  21. Сулова М.Ю., Парфенова В.В., Павлова О.Н. и др. Разнообразие и распределение культивируемого микробного сообщества в районах нижнего Енисея и шельфа Карского моря // *Криосфера Земли*. 2011. Т. XV. № 4. С. 106–109.
  22. Сулова М.Ю., Липко И.А., Мамаева Е.В. и др. Разнообразие культивируемых бактерий, выделенных из водной толщи и донных осадков шельфа Карского моря // *Микробиология*. 2012. Т. 81. № 4. С. 524–531.
  23. Теплинская Н.Г. Бактериопланктон и бактериобентос Карского моря // *Экология и биоресурсы Карского моря*. Апатиты.: КНЦАН СССР, 1989. С. 29–37.
  24. Томберг И.В., Сороковикова Л.М., Сезько Н.П. и др. Гидрохимическая характеристика Гыданской губы (Карское море) // *Природа шельфов и архипелагов Европейской Арктики*. 2010. Вып. 10. С. 292–295.
  25. Флинт М.В. 54-й экспедиционный рейс научно-исследовательского судна “Академик Мстислав Келдыш” в Карское море // *Океанология*. 2010. Т. 50. № 5. С. 677–682.
  26. Altschul S.F., Madden T.L., Schaffer A.A. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs // *Nucl. Acids Res.* 1997. V. 5. P. 3389–3402.
  27. Baldwin, A.J., Moss J.A., Pakulski J.D. et al. Microbial diversity in a Pacific Ocean transect from the Arctic to Antarctic circles // *Aquat. Microb. Ecol.* 2005. V. 102. P. 41–91.
  28. Bano N., Ruffin S., Ransom B. et al. Phylogenetic composition of Arctic Ocean archaeal assemblages and comparison with Antarctic assemblages // *AEM*. 2004. V. 70. № 2. P. 781–9.
  29. Bowman J.P., McCammon S.A., Gibson J.A.E. et al. Prokaryotic metabolic activity and community structure in Antarctic continental shelf sediments // *AEM*. 2003. V. 69. P. 2448–62.
  30. Buckley D.H., Huangyutitham V., Hsu S-F. et al. Diversity of *Planctomycetes* in Soil in Relation to Soil History // *AEM*. 2006 V. 72. № 7. P. 4522–31.
  31. Cottrell M.T., Kirchman D.L. Natural assemblages of marine proteobacteria and members of the *Cytophaga-Flavobacter* cluster consuming low- and high-molecular-weight dissolved organic matter // *AEM*. 2000. V. 66. № 4. P. 1692–7.
  32. Dunfield P.F., Yuryev A., Senin P. et al. Methane oxidation by an extremely acidophilic bacterium of the phylum *Verrucomicrobia* // *Nature*. 2007. V. 6. № 450 (7171). P. 879–882.
  33. De Bruyn J.M., Nixon L.T., Fawaz M.N. et al. Global Biogeography and Quantitative Seasonal Dynamics of *Gemmatimonadetes* in Soil // *AEM*. 2011. V. 77. № 17. P. 6295–6300.
  34. Elshahed M.S., Youssef N.H., Luo Q. et al. Phylogenetic and Metabolic Diversity of *Planctomycetes* from Anaerobic, Sulfide- and Sulfur-Rich Zedletone Spring, Oklahoma // *AEM*. 2007. V. 73. № 15. P. 4707–4716.
  35. Fuerst J.A. The planctomycetes: emerging models for microbial ecology, evolution and cell biology // *Microbiology*. 1995. № 141. P. 1493–1506.
  36. Futterer F.W. III, Galimov E.M. Siberian river run-off into the Kara sea: Characterization, quantification, variability and environmental significance // *Proc. Mar. Sci.* 2003. V. 6. P. 1–9.
  37. Garrity G.M., Brenner D.J., Krieg N.R. et al. (eds.) *Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology*, Volume

- Two: The Proteobacteria, Part C: The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria. NY.: Springer, 2005. 1388 p.
38. Glöckner F.O., Fuchs B.M., Amann R. Bacterioplankton compositions of lakes and oceans: a first comparison based on fluorescence in situ hybridization // AEM. 1999. V. 65. P. 3721–26.
  39. Glöckner F.O., Kube M., Bauer M. et al. Complete genome sequence of the marine planctomycete *Pirellula* sp. strain 1 // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2003. № 100. P. 8298–8303.
  40. Inoue H., Nojima H., Okayama H. High efficiency transformation of *E. coli* with plasmids // Gene. 1990. V. 26. P. 23–28.
  41. Kirchman D.L. The ecology of *Cytophaga-Flavobacteria* in aquatic environments // FEMS Microbiol. Ecol. 2002. № 39. P. 91–100.
  42. Kirchman D., K'nees E., Hodson R. Leucine incorporation and its potential as a measure of protein synthesis by bacteria in natural aquatic systems // AEM. 1985. V. 49. № 3. P. 599–7.
  43. Larkin M.J., Kulakov L.A., Allen C.C.R. Biodégradation by members of the genus *Rhodococcus*: biochemistry, physiology and genetic adaptation // Adv. Appl. Microbiol. 2006. № 59. P. 1–29.
  44. Liebner S., Harder J., Wagner D. Bacterial diversity and community structure in polygonal tundra soils from Samoylov Island, Lena Delta, Siberia // Int. Microbiol. 2008. V. 11. № 3. P. 195–202.
  45. Lysnes K., Thorseth I.H., Steinsbu B.O. et al. Microbial community diversity in seafloor basalt from the Arctic spreading ridges // FEMS Microb. Ecol. 2004. V. 50. № 3. P. 213–230.
  46. Perreault N.N., Andersen D.T., Pollard W.H. et al. Characterization of the prokaryotic diversity in cold saline perennial springs of the Canadian high Arctic // AEM. 2007. V. 73. P. 1532–1543.
  47. Ravenschlag K., Sahm K., Pernthaler J. et al. High bacterial diversity in permanently cold marine sediments // AEM. 1999. № 65. P. 3982–3989.
  48. Rees G.N., Patel B.K. *Desulforegula conservatrix* gen. nov., sp. nov., a long-chain fatty acid-oxidizing, sulfate-reducing bacterium isolated from sediments of a freshwater lake // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2001. V. 51. № 5. P. 1911–6.
  49. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular cloning. A laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 350 p.
  50. Suyama, T., Hosoya H., Tokiwa Y. Bacterial isolates degrading aliphatic polycarbonates // FEMS Microbiol. 1998. P. 161.255–261.
  51. Tamura K., Dudley J., Nei M. et al. MEGA 3: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0 // Mol. Biol. Evol. 2007. V. 24. P. 1596–1599.
  52. Teske A., Hinrichs K.U., Edgcomb V. et al. Microbial diversity of hydrothermal sediments in the Guaymas Basin: evidence for anaerobic methanotrophic communities // AEM. 2002. № 68. P. 1994–2007.
  53. Uphoff H.U., Felske A., Fehr W. et al. The microbial diversity in picoplankton enrichment cultures // FEMS Microb. Ecol. 2001. V. 35. P. 249–258.
  54. Ward N.L., Challacombe J.F., Janssen P.H. et al. Three genomes from the phylum *Acidobacteria* provide insight into the lifestyles of these microorganisms in Soils // AEM. 2009. V. 75. № 7. P. 2046–2056.
  55. Woebken D., Teeling H., Wecker P. Fosmids of novel marine *Planctomycetes* from the Namibian and Oregon coast upwelling systems and their cross-comparison with planctomycete genomes // The ISME Journal. 2007. V. 1. P. 419–435.
  56. Xu J.L., He J., Wang Z.C. et al. *Rhodococcus qingshengii* sp. nov., a carbendazim-degrading bacterium // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2007. V. 57. Pt 12. P. 2754–7.
  57. Zemskaya T.I., Pogodaeva T.V., Shubenkova O.V. et al. Geochemical and microbiological characteristics of sediments near the Malenky mud volcano (Lake Baikal, Russia), with evidence of *Archaea* intermediate between the marine anaerobic methanotrophs ANME-2 and ANME-3 // Geo-Mar. Lett. 2010. V. 30. P. 411–425.
  58. Zeng Y., Zou Y., Chen B. et al. Phylogenetic diversity of sediment bacteria in the northern Bering Sea // Polar Biol. 2011. V. 34. P. 907–919.

## Microbic Non-Cultivated Community in Bottom Sediments of the Gydan Guba and the Enisey Zulf of the Kara Sea

E. V. Mamaeva, M. Yu. Suslova, T. V. Pogodaeva, V. V. Parfenova, T. I. Zemskaya

Using methods of molecular biology (PCR and cloning), we studied diversity of microorganisms in the surface layers of bottom sediments from the Bays of Gydan and Yenisey of the Kara Sea, which had differing component composition of pore water and mineralisation level. Representatives of the domains *Bacteria* and *Archaea* were identified based on the analysis of nucleotide sequences of 16S rRNA gene fragments.

The composition of microorganisms in the bottom sediments changed with the change of salinity gradient in pore water. Phylogenetic analysis of nucleotide sequences showed that the composition of microbial communities in the southern areas of these bays was affected by freshwater flows of rivers and streams from the lakes within the catchment area, whereas that in the northern parts was influenced by sea water.

The results obtained showed that bacteria in the microbial communities of bottom sediments were able to utilize a wide range of substrates, including hydrocarbon, organochlorine and aromatic compounds. These data may be evident of the presence of different types of pollution in the sediments of these areas, as well as of potential ability of bacteria to degrade different chemical compounds entering the water and bottom sediments of the Kara Sea.