

**ВЕРТИКАЛЬНАЯ СТРУКТУРА СООБЩЕСТВ ПРОКАРИОТ
МЕРОМИКТИЧЕСКОГО ОЗЕРА КИСЛО-СЛАДКОЕ
(КАНДАЛАКШСКИЙ ЗАЛИВ, БЕЛОЕ МОРЕ)**

Е.А. Селиванова¹, Ю.А. Хлопко¹, Е.Д. Краснова²,
Д.А. Воронов³, А.О. Плотников¹

¹*Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, Оренбург,
selivanova-81@mail.ru, 140374@mail.ru, protoz@mail.ru*

²*Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва,
e_d_krasnova@mail.ru*

³*Институт проблем передачи информации им. А.А. Харкевича РАН, Москва,
da_voronov@mail.ru*

**VERTICAL STRUCTURE OF PROKARYOTE COMMUNITIES IN THE
MEROMICTIC LAKE KISLO-SLADKOE (KANDALAKSHA BAY, WHITE SEA)**

Е.А. Selivanova¹, Y.V. Mindolina¹, Y.A. Khlopko¹, E.D. Krasnova²,
D.A. Voronov³, A.O. Plotnikov¹

¹*Institute for Cellular and Intracellular Symbiosis, Ural Branch of Russian Academy of Sciences,
Orenburg*

²*Biological Faculty of M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow*

³*Kharkevich Institute for Information Transmission Problems, Russian Academy of Sciences,
Moscow*

Аннотация. Меромиктические водоемы являются уникальными экосистемами в Арктике, микробиота которых недостаточно хорошо исследована. Впервые методом ДНК метабаркодинга по гену 16S рРНК определены таксономический состав и вертикальная структура сообществ прокариот в оз. Кисло-Сладкое на берегу Белого моря. Установлено четкое зонирование сообществ, соответствующее меромиктическому состоянию водоема. В аэробной зоне преобладали бактерии фил Actinobacteria, Bacteroidetes, Cyanobacteria, Planctomycetes, Proteobacteria и Verrucomicrobia. В зоне хемоклина и ниже доминировали филы Chlorobi, метаногенные археи порядка Methanomicrobiales, метанотрофы и сульфатредукторы. Археи фил Rasearchaeota и Woesearchaeota присутствовали только в придонной анаэробной зоне.

Ключевые слова: озеро Кисло-Сладкое, меромиксия, стратифицированное озеро, сообщество прокариот, ДНК метабаркодинг.

Введение

На побережье Белого моря насчитывается около двух десятков меромиктических водоемов, находящихся на разных стадиях изоляции от моря, которые образовались в результате постледникового изостатического поднятия морского берега [2]. Оз. Кисло-Сладкое (66°32'54" N, 33°08'05" E), расположенное рядом с Беломорской биологической станцией им. Н.А. Перцова МГУ, находится в процессе отдаления от Белого моря. Его уровень на 40 см выше уровня моря, в связи с чем морская вода поступает в озеро только в результате сизигийных приливов, периодически нарушая меромиксию [8]. В состоянии меромиксии слоистая гидрологическая структура исследуемого водоема включает верхний обогащенный кислородом миксолимнион, который разделен пикноклином на опреснённый слой и соленый аэробный слой, хемоклин, являющийся переходной зоной, и придонный слой с анаэробными условиями (монимолимнион) [3].

Градиенты физико-химических факторов, растворенных веществ и температуры воды влияют на вертикальное распределение различных организмов [6]. Стратифицированные водные массы с бескислородным придонным слоем предлагают большое разнообразие экологических ниш, формируя сложные взаимодействия между химической стратификацией и зонированным по вертикали микробным сообществом [5].

Биогеохимические, изотопные и микробиологические исследования в оз. Кисло-Сладкое позволили охарактеризовать вертикальную динамику процессов микробной трансформации соединений углерода и серы и продемонстрировать их высокую интенсивность, а также описать аноксигенное фототрофное сообщество [9, 10]. Однако вертикальная структура и разнообразие прокариот в оз. Кисло-Сладкое не изучались.

Цель данного исследования – методом ДНК метабаркодинга по гену 16S рРНК определить таксономический состав и вертикальную структуру сообществ прокариот в оз. Кисло-Сладкое.

Регион исследований, объекты и методы

В июле 2018 г. оз. Кисло-Сладкое состояло из четырех слоев от поверхности до дна: 1) солоноватый распресненный слой ветрового перемешивания от поверхности до 0,5 м; 2) аэробный слой с морской соленостью, перенасыщенный кислородом в результате фотосинтетической активности фитопланктона 1,0-2,5 м; 3) хемоклин (переходная зона между аэробным и анаэробным горизонтами 2,5-3,1 м; 4) анаэробная зона 3,5-4,0 м. Для ДНК-метабаркодинга были отобраны пробы с горизонтов 0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,1; 3,5 и 4,0 м. На этих же горизонтах измерены температура, соленость, концентрация растворенного O₂, pH, Eh, освещенность. Образцы воды сразу после отбора фильтровали в лаборатории ББС МГУ через мембранные фильтры с диаметром пор 2,4-4,5, 0,45 и 0,22 мкм. Фильтры помещали в пробирки с 200 мкл консерванта DNA/RNA Shield (Zymo Research, США) и транспортировали в Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения РАН (ИКВС УрО РАН) (г. Оренбург). Все последующие этапы экспериментальной работы и обработку данных выполняли в ЦКП «Персистенция микроорганизмов» ИКВС УрО РАН.

Тотальную ДНК из фильтров выделяли комбинированным методом, включавшим механическую гомогенизацию в сочетании с методом ферментативного лизиса [1]. ДНК-библиотеки синтезировали с праймерами к варибельному участку V3–V4 гена 16S рРНК S-D-Bact-0341-b-S-17 и S-D-Bact-0785-a-A-21 [7] в соответствии с протоколом IlluminaPart #15044223 Rev. B. Секвенирование проводили на приборе MiSeq (Illumina, США) с использованием набора реактивов MiSeqReagent Kit V3 2×300. Биоинформатическая обработка включала оценку качества, объединение парно-концевых ридов, триммирование адаптеров, фильтрацию по качеству и длине, формирование ОТЕ (операционных таксономических единиц) путем дерепликации и кластеризации на уровне 97%, используя алгоритм UPARSE [4]. В процессе кластеризации удалялись химерные последовательности. Применяли глобальное выравнивание последо-

вательностей ОТЕ на первоначальные объединенные риды с помощью команды `usearch_global`. Из полученных данных исключали ОТЕ, представленные в количестве менее 10 в образце. Таксономию ОТЕ определяли с помощью базы данных RDP. ОТЕ, соответствующие ДНК эукариот, были удалены.

Результаты и их обсуждение

Всего выявлено 414 ОТЕ прокариот, относящихся к 27 филам бактерий и 3 филам архей. Микробные сообщества в разных слоях оз. Кисло-Сладкое отличались по своему составу согласно гидрологической и гидрохимической стратификации водоема на момент исследования. В аэробной зоне (0-2 м) наблюдались микробные сообщества, характерные для водоемов с насыщенной кислородом водой. В них преобладали Actinobacteria (23-41% в разных горизонтах), Bacteroidetes (10-24%), Planctomycetes (2-7%), Alphaproteobacteria (2-4%), Betaproteobacteria (1-4%), Gammaproteobacteria (4-10%), Cyanobacteria (8-14%), Planctomycetes (1-7%) и Verrucomicrobia (1-5%). По сравнению с поверхностным слоем Белого моря в поверхностных слоях озера Кисло-Сладкое таксономическое богатство было значительно выше. Цианобактерии составляли значительную долю сообщества. Почти все ОТЕ относились к родам *Cyanobium* и *Synechococcus*. Среди гаммапротеобактерий наиболее обильными были ОТЕ, относящиеся к роду *Pseudohongiella*. Из альфапротеобактерий доминирующими оказались флотипы, относящиеся к родам *Candidatus Pelagibacter* и *Marivita* из клады *Roseobacter*. Отмечены пурпурные несерные бактерии рода *Roseicyclus*. Хотя этот род не являлся доминантным, он регистрировался во всех аэробных слоях. Среди актинобактерий одной из наиболее обильных была ОТЕ, наиболее близкая морской актинобактерии из арктического фьорда – «*Candidatus Aquiluna*». Она была многочисленна во всех горизонтах озера и в поверхностном слое Белого моря. Другая ОТЕ, наиболее близкая к *Aquiluna* sp. AP026677.1, выявлена в поверхностных пресных слоях воды, и в Белом море не обнаружена. Несмотря на сходство доминирующих фил между верхним распресненным и нижним соленым слоями выявлены различия: в нижних слоях, по сравнению с верхними, преобладали Valneolaeota, доля которых достигала 1-3%, и класс Oligoflexia (1%), представленный хищными бактериями родов *Peredibacter* и *Halobacteriovorax*, отмечалось более высокое относительное обилие Planctomycetes, развитие которых в морских местообитаниях часто связано с микроводорослями и цианобактериями.

В целом анализ таксономической принадлежности ОТЕ, составляющих значительную часть сообщества в миксолимнионе продемонстрировал, что большинство из них являются гетеротрофными морскими бактериями.

В хемоклине и соседствующих с ним горизонтах резко увеличивалась доля филы Chlorobi, на долю которой приходилось 65-88% всех ридов, при этом доля других доминирующих фил была ниже: Actinobacteria – 5-6%, Bacteroidetes – 2-11%. Хлоробии были представлены лишь несколькими ОТЕ, из которых самая многочисленная наиболее близка виду *Chlorobium vibrioforme*, тогда как ранее выделенный из хемоклина вид *Chlorobium phaeovibrioides* был представлен единичными ОТЕ на горизонтах 3,1 и 3,5 м.

Среди гаммапротеобактерий появлялись метилотрофы родов *Methylophaga* и *Methyloprofundus*, указывающие на активный процесс окисления метана в зоне хемоклина. Только в этих горизонтах регистрировались Euryarchaeota, представленные метаногенами порядка Methanomicrobiales. В горизонте хемоклина и ниже снижалась доля классов Alphaproteobacteria и Betaproteobacteria, но увеличивалась доля дельтапротеобактерий, представленных сульфатредукторами семейств Desulfobacteraceae, Desulfobulbaceae и Desulfuromonadaceae. Данный факт согласуется с отмеченной ранее высокой скоростью бактериальной сульфатредукции в редокс-зоне. Одновременно в этой зоне присутствовали сероокисляющие хемолитотрофные представители гаммапротеобактерий, среди которых максимальным относительным обилием характеризовался *Thiomicrothabodus*. Пурпурные серные бактерии семейства Chromatiaceae обнаруживались в зоне хемоклина, однако их доля в сообществе была незначительна.

Микробные сообщества анаэробной зоны, расположенной ниже хемоклина (горизонты 3,5-4 м), отличались присутствием архей из некультивируемых линий Rasearchaeota и Woesearchaeota.

Выводы

1. Впервые в меромиктическом оз. Кисло-Сладкое методом высокопроизводительного секвенирования гена 16S рРНК исследована вертикальная структура микробных сообществ. Установлено четкое зонирование сообществ, соответствующее гидрологическому состоянию водоема в условиях меромиксии.

2. В аэробной зоне (от 0 до 2,0 м) преобладали ОТЕ, принадлежащие морским гетеротрофным бактериям фил Actinobacteria, Bacteroidetes, Cyanobacteria, Planctomycetes, Proteobacteria и Verrucomicrobia.

3. В зоне хемоклина (2,5-3,1 м) доминировала фила Chlorobi составляя 65-88%, практически полностью представленная одной ОТЕ, близкой *Chlorobium vibrioforme*. Метаногены представлены метаногенными археями порядка Methanomicrobiales, метанотрофы – родами *Methylophaga*, *Methyloprofundus* и *Methylothermobacter*. Сульфатредукторы включали представителей семейств Desulfobacteraceae, Desulfobulbaceae и Desulfuromonadaceae, из которых к доминантам относился род *Desulfobacterium*. Среди сероокисляющих хемолитотрофных гаммапротеобактерий доминировал род *Thiomicrothabodus*.

4. В придонной анаэробной зоне (3,5-4,0 м) присутствовали археи фил Rasearchaeota и Woesearchaeota.

Благодарности

Коллектив авторов выражает благодарность администрации Беломорской биологической станции им. Н.А. Перцова МГУ им. М.В. Ломоносова и Центра выявления и поддержки одаренных детей в Оренбургской области «Гагарин» за содействие в проведении данного исследования. Работы по выделению ДНК, приготовлению ДНК-библиотек, высокопроизводительное секвенирование и биоинформатический анализ данных выполнены в ЦКП «Персистенция микроорганизмов» Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН (Оренбург).

Литература

- [1] *Белькова Н.Л.* Молекулярно-генетические методы анализа микробных сообществ // Разнообразие микробных сообществ внутренних водоемов России: Учебно-методическое пособие. Ярославль: Принтхаус, 2009. С. 53-63.
- [2] *Краснова Е.Д.* Экология меромиктических озер России. 1. Прибрежные морские водоемы // Водные ресурсы. 2021, т. 48, № 3. С. 322-333.
- [3] *Краснова Е.Д., Мардашова М.В.* Как морской залив превращается в озеро // Природа. 2020. № 1. С. 16-27.
- [4] *Edgar R.C.* UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads // Nature Methods. 2013, №10. P. 996-998.
- [5] *Fenchel T., Kristensen L.D., Rasmussen L.* Water Column Anoxia: Vertical Zonation of Planktonic Protozoa // Mar. Ecol. Prog. Ser. 1990, v. 62. P. 1-10.
- [6] *Khromechek E.B., Barkhatov Y.V., Rogozin D.Y.* Community Structure and Vertical Distribution of Planktonic Ciliates in the Saline Meromictic Lake Shira during Breakdown of Meromixis // Ecohydrol. Hydrobiol. 2021, v. 21. P. 142-152.
- [7] *Klindworth A., Pruesse E., Schweer T., Peplies J., Quast C., Horn M., Glöckner F.O.* Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies // Nucleic Acids Res. 2013, v. 41, № 1.
- [8] *Krasnova E.D., Pantyulin A.N., Belevich T.A., Voronov D.A., Demidenko N.A., Zhitina L.S., Ilyash L.V., Kokryatskaya N.M., Lunina O.N., Mardashova M.V., Prudkovsky A.A., Savvichev A.S., Filippov A.S., Shevchenko V.P.* Multidisciplinary studies of the separating lakes at different stage of isolation from the White Sea performed in March 2012 // Oceanology. 2013, v. 53. P. 639-642.
- [9] *Lunina O.N., Savvichev A.S., Krasnova E.D., Kokryatskaya N.M., Veslopolova E.F., Kuznetsov B.B., Gorlenko V.M.* Succession processes in the anoxygenic phototrophic bacterial community in Lake Kislo-Sladkoe (Kandalaksha Bay, White Sea) // Microbiology. 2016, v. 85. P. 570-582.
- [10] *Savvichev A.S., Lunina O.N., Rusanov I.I., Zakharova E.E., Veslopolova E.F., Ivanov M.V.* Microbiological and isotopic geochemical investigation of Lake Kislo-Sladkoe, a meromictic water body at the Kandalaksha Bay shore (White Sea) // Microbiology. 2014, v. 83. P. 56-66.

S u m m a r y. Meromictic water bodies are unique ecosystems in Arctic, microbiota of which is understudied. For the first time, the taxonomic composition and vertical structure of prokaryotic communities in Lake Kislo-Sladkoe on the coast of the White Sea were determined using DNA metabarcoding of the 16S rRNA gene. A clear distinction of communities was revealed according to the meromictic state of the water body. The aerobic zone was dominated by bacteria of the phyla Actinobacteria, Bacteroidetes, Cyanobacteria, Planctomycetes, Proteobacteria, and Verrucomicrobia. In the chemocline zone and below, phyla Chlorobi, methanogenic archaea of the order Methanomicrobiales, methanotrophs, and sulfate reducers dominated. Archaea of the phyla Pacearchaeota and Woesearchaeota were present in the near-bottom anaerobic zone only.

РОССИЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ПЕДАГОГИЧЕСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ им. А.И. ГЕРЦЕНА

HERZEN STATE PEDAGOGICAL UNIVERSITY OF RUSSIA

LXXVI Герценовские чтения
География:
развитие науки и образования

Материалы Международной научно-практической конференции
19–21 апреля 2023 года

В 2-х томах

I

LXXVI Herzen readings
Geography:
Development of Science and Education

Materials of the International Scientific and Practical Conference
on April 19–21, 2023

In 2 volumes

Санкт-Петербург
Издательство РГПУ им. А. И. Герцена
2023

УДК 911.5

Рецензенты:

Ал. А. Григорьев, доктор географических наук, профессор, РГПУ им. А. И. Герцена;
Д. В. Севастьянов, доктор географических наук, профессор, ЛГУ им. А. С. Пушкина

Редакционная коллегия:

Д. А. Субетто (отв. ред.), *А. Н. Паранина* (отв. ред.), *А. С. Баранов*, *Ю. Л. Войтеховский*,
Д. А. Гдалин, *Ю. Н. Гладкий*, *И. М. Греков*, *Е. Ю. Гуров*, *С. В. Ильинский*, *В. Ф. Куликов*,
С. И. Махов, *В. Г. Мосин*, *Е. М. Нестеров*, *Л. А. Пестрякова*, *В. Д. Сухоруков*

LXXVI Герценовские чтения. География: развитие науки и образования :
Материалы Международной научно-практической конференции 19–21 апреля
2023 года : в 2 т. Т. I / отв. ред. Д. А. Субетто, А. Н. Паранина. — Санкт-
Петербург : Изд-во РГПУ им. А. И. Герцена, 2023. — 384 с.

LXXVI Gertsenovskiy readings. Geography: development of science and education. Materials
of the International Scientific and Practical Conference on April 19–21, 2023 : in 2 vol. Part I / by
ed. D. A. Subetto, A. N. Paranina. — St. Petersburg : Publishing house of Herzen State Pedagogical
University of Russia, 2023. — 384 p.

ISBN 978-5-8064-3368-9

ISBN 978-5-8064-3369-6 (том 1)

Сборник материалов «География: развитие науки и образования» отражает результаты работы научно-практической конференции 76 Герценовские чтения 19–21 апреля 2023 года, посвященной 200-летию со дня рождения К. Д. Ушинского, 160-летию со дня рождения В. И. Вернадского, 140-летию со дня рождения А. Е. Ферсмана.

Материалы сгруппированы в два тома. Том I включает главы: 1. География — основа моделирования мира, 2. Современные вопросы физической географии, 3. Исследования полярных областей, 4. Лимнология и меромиктические озера, 5. Палеолимнологические и палеогеографические исследования. Том II включает главы: 1. Геоэкология и охрана окружающей среды, 2. Социально-экономические системы и географические аспекты глобализации, 3. Развитие географического образования, 4. Регионоведение, краеведение, туризм.

УДК 911.5

Материалы публикуются в авторской редакции

ISBN 978-5-8064-3368-9

ISBN 978-5-8064-3369-6 (1 том)

© РГПУ им. А. И. Герцена, 2023

© Р. В. Паранин, обложка, 2023

Научное издание

LXXVI Герценовские чтения
География: развитие науки и образования

Материалы Международной научно-практической конференции
19–21 апреля 2023 года

В 2-х томах
Том I

LXXVI Gertsenovskiy readings
Geography: development of science and education
Materials of the International Scientific and Practical Conference
on April 19–21, 2023

In 2 volumes
Part I

Подготовка оригинал-макета *А. Н. Параниной*
Дизайн обложки *Р. В. Паранина*

Печатается с готового оригинал-макета, в авторской редакции

Подписано в печать 12.05.2023. Формат 60 × 84 ¹/₁₆
Печать цифровая. Бумага офсетная. Гарнитура Times.
Усл. печ. л. 24,0. Тираж 500 экз. Заказ № 000к

Типография РГПУ им. А. И. Герцена
191186, Санкт-Петербург, наб. р. Мойки, 48