

МИКРОБИОЛОГИЯ

УДК 579.2.08

ОБНАРУЖЕНИЕ АНАЭРОБНЫХ СУЛЬФАТРЕДУЦИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ В КИСЛОРОДСОДЕРЖАЩИХ ВЕРХНИХ ВОДНЫХ ГОРИЗОНТАХ ЧЕРНОГО И БАЛТИЙСКОГО МОРЕЙ

А.Л. Брюханов, В.А. Корнеева, Н.В. Пименов*

(кафедра микробиологии; e-mail: brjuchanov@mail.ru)

Методами флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) и ПЦР был проведен анализ филогенетического состава сообществ анаэробных сульфатредуцирующих бактерий (СРБ) в кислородсодержащих верхних водных горизонтах меромиктических водоемов — Черного моря и Гданьской впадины Балтийского моря. На глубинах 30–70 м черноморского континентального склона были обнаружены клетки, гибридизовавшиеся с FISH-зондами на 16S рРНК СРБ родов *Desulfotomaculum*, *Desulfobacter* и *Desulfovibrio*. В зоне хемоклина Черного моря на глубине 150 м преобладали представители рода *Desulfomicrobium*. Помимо *Desulfotomaculum* (1-я подгруппа СРБ), *Desulfobacter* (4-я подгруппа СРБ) и *Desulfovibrio-Desulfomicrobium* (6-я подгруппа СРБ) посредством вложенной ПЦР с праймерами на ген 16S рРНК в кислородсодержащей водной толще Черного и Балтийского морей было обнаружено также присутствие представителей 5-й подгруппы СРБ — *Desulfococcus-Desulfonema-Desulfosarcina*. Из водной пробы, отобранной в Черном море с глубины 70 м, выделена активная накопительная культура СРБ, основным компонентом которой является *Desulfosporosinus* sp.

Ключевые слова: сульфатредуцирующие бактерии, *Desulfosporosinus*, флуоресцентная гибридизация *in situ*, вложенная ПЦР, меромиктический водоем, Черное море, Гданьская впадина Балтийского моря.

Черное море представляет собой крупнейший в мире меромиктический водоем и резервуар растворенного сероводорода и метана. На континентальном склоне кислородсодержащие воды (~300 мкМ O_2 в подповерхностном слое) простираются до глубин 140–175 м, где концентрация кислорода падает до 2–10 мкМ. Зона хемоклина расположена обычно между 95 м (начало резкого снижения концентрации кислорода) и 157–167 м (присутствие следов сероводорода) [1, 2]. Ниже зоны хемоклина в Черном море находится бескислородная водная толща, содержащая H_2S (до 370 мкМ на глубинах свыше 1500 м). В Гданьской впадине Балтийского моря зона хемоклина начинается на глубине 80 м (содержание O_2 — 69 мкМ), а H_2S появляется в придонном слое на 102 м [3]. Таким образом, верхние водные горизонты Черного моря и впадины Балтийского моря представляют собой хорошие модели для изучения распространения микроорганизмов на одном вертикальном разрезе с различными гидрохимическими условиями.

Особый интерес представляют микробные сообщества на границе аэробных и анаэробных вод. Так, в зоне хемоклина Черного моря были обнаружены заметные активные микробные процессы (темновая фиксация углекислоты, трансформация соединений серы, продукция и окисление метана) [4].

Сульфатредуцирующие бактерии (СРБ), представляющие собой разнообразную в филогенетическом плане группу, используют водород и преимущественно низкомолекулярные органические вещества в качестве доноров электронов для восстановления сульфата, в результате чего образуется сероводород. СРБ относят к строгим анаэробам, однако многие виды обладают системами антиокислительной защиты и способны существовать в местообитаниях, подвергающихся воздействию кислорода [5]. СРБ играют важнейшую роль в накоплении H_2S в глубинных водах Черного моря. Однако с использованием меченого $^{35}S-SO_4^{2-}$ было обнаружено, что в Черном море сульфатредукция происходит не только в анаэробной водной толще, но даже и в кислородсодержащих водах [2].

Первые работы по обнаружению методом флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) клеток СРБ в кислородсодержащих горизонтах Черного моря были проведены лишь недавно [2]. Также путем анализа гена 16S рРНК было показано присутствие эндоспор *Desulfotomaculum* spp. в водах Балтийского моря на глубинах 1 м и 14 м [6]. К настоящему времени созданы ПЦР-праймеры, специфичные к генам 16S рРНК основных филогенетических подгрупп СРБ [7], однако их не использовали ранее для выявления СРБ в морских водах. Основной целью данной работы являлось

* Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН, г. Москва.

определение филогенетической принадлежности СРБ, детектированных ранее в кислородсодержащих водных горизонтах Черного и Балтийского морей.

Материалы и методы

В Черном море водные образцы с глубин до 200 м отбирали с помощью CTD-зонда “Sea-Bird 19” (США), оснащенного 10-литровыми батометрами Нискина и погружным насосом, с борта НИС “Ашамба”. Станция отбора (N44.458°, E37.882°, глубина 1300 м) располагалась на континентальном склоне в 16 км от Голубой бухты (г. Геленджик). В Гданьском заливе Балтийского моря пробы воды с глубин до 107 м отбирали на станции 22 (N54.860°, E19.333°) с борта траулера МРТК-1073.

Водные пробы для FISH-анализа фиксировали в 4%-м растворе формальдегида в PBS (pH 7,0) и хранили при 4°C. Клетки концентрировали на мембранных фильтрах GTBP 2500 (Millipore, США). Гибридизацию осуществляли в соответствии с методикой, описанной ранее [2]. Использовали меченые цианином-3 16S рРНК-специфичные зонды на домены Bacteria и Archaea [8] и основные филогенетические подгруппы СРБ [9–11]. Общую численность микроорганизмов определяли с помощью ДНК-красителя 4',6-диамидино-2-фенилиндола (0,5 нг/мкл). Визуализацию проводили в 30 полях зрения при увеличении $\times 1000$ на эпифлуоресцентном микроскопе Axio Imager.D1 (Carl Zeiss, Германия) с цифровой камерой Axio Cam HRC и световыми фильтрами Zeiss 20/49.

Для выделения тотальной ДНК по 5 л водных проб последовательно фильтровали через стекловолоконные фильтры GF/C (Whatman, США) и мембранные фильтры с диаметром пор 0,22 мкм (Millipore, США), затем их разрушали в жидком азоте и использовали набор Genomic DNA Purification Kit (Fermentas, Литва). Смесь для ПЦР содержала ~25 нг ДНК-матрицы; 2,0 mM MgCl₂; 400 мкМ дНТФ; по 500 нМ праймеров и 2,5 ед. Taq ДНК-полимеразы. ПЦР проводили при режиме: 5 мин при 95°C; 35 циклов — 1 мин при 95°C; 1 мин при соответствующей температуре отжига и 1 мин при 72°C (6 мин для праймеров рА и рН'); 10 мин при 72°C. Использовали праймеры на ген 16S рРНК Bacteria (рА и рН') [12] и шести филогенетических подгрупп СРБ [7], а также на ген *dsrB* [13].

Накопительные культуры СРБ получали анаэробно на среде Видделя для морских СРБ [14]. Посевным материалом служили капроновые фильтры со сконцентрированными из 100 мл воды клетками. Рост культур СРБ при 22°C оценивали по образованию сероводорода, определяемого колориметрически (λ 670 нм) после окраски проб парафенилендиаминном [15]. Идентификацию СРБ осуществляли по следующей схеме: амплифицировали участки гена 16S рРНК Bacteria с использованием выделенной ДНК и праймеров 341F/907R [16], клонировали полученные ампликоны в векторе pGEM-T

(Promega, США) и проводили их анализ с использованием эндонуклеазы рестрикции *Hae*III и последующего секвенирования.

Результаты и обсуждение

В зоне хемоклина Черного моря численность микроорганизмов была на 20% выше, чем в поверхностных водах ($1,06 \times 10^6$ кл/мл); доля бактерий в зоне хемоклина уменьшалась с 75 до 40%, но в 4 раза возрастала численность архей. В Гданьской впадине Балтийского моря количество бактерий также снижалось с 65% в аэробных водах (30–50 м) до 28% в зоне хемоклина, а доля архей повышалась с 4 до 12% от общей численности микроорганизмов.

ПЦР с тотальной ДНК, выделенной из водных проб, и праймерами на ген *dsrB* (кодирующий β -субъединицу диссимиляционной сульфитредуктазы — ключевого фермента сульфатредукции) показала наличие генетического материала СРБ в кислородсодержащих водных слоях как Черного (от 30 до 200 м), так и Балтийского (от 10 до 107 м) морей.

Количество бактериальных клеток, дающих гибридизационный сигнал с FISH-зондами на 16S рРНК родов *Desulfotomaculum* (Dtm229), *Desulfovibrio* (DSV1292) и *Desulfobacter* (DSB129), в подповерхностных водах Черного моря на глубинах 30–70 м составляло до 2×10^5 ; $1,2 \times 10^5$ и $4,4 \times 10^4$ кл/мл соответственно (рис. 1, а). Бактерии рода *Desulfomicrobium* (DSV214) представляли доминирующую филогенетическую подгруппу сульфатредукторов у нижней границы хемоклина Черного моря на глубинах 157–167 м (1×10^5 кл/мл), а численность *Desulfovibrio* spp. на этих глубинах резко снижалась (рис. 1, а). Клетки *Desulfotomaculum* spp. не были обнаружены в зоне хемоклина Черного моря методом FISH, однако участки гена 16S рРНК данного рода детектировали на глубинах 100 и 145 м вложенной ПЦР, что свидетельствует о возможном присутствии в хемоклине неактивных минорных представителей рода *Desulfotomaculum*. В предыдущих исследованиях Черного моря с применением FISH-зонда SRB385 на СРБ, относящихся к δ -Proteobacteria [17], и при оценке количества копий гена *dsrA* с помощью ПЦР в реальном времени [18] был обнаружен пик численности сульфатредукторов в зоне хемоклина.

Необходимо отметить, что реальные численности СРБ в кислородсодержащих водах Черного моря могут быть ниже из-за неабсолютной специфичности известных FISH-зондов. Но существуют и иные объяснения возможной высокой численности СРБ в верхних водных горизонтах. Так, многие виды СРБ (в особенности представители родов *Desulfovibrio* и *Desulfotomaculum*) обладают эффективными ферментативными системами защиты от окислительных стрессов, а также способны к образованию клеточных агрегатов и симбиотических консорциумов с аэробными микроорганизмами [5].

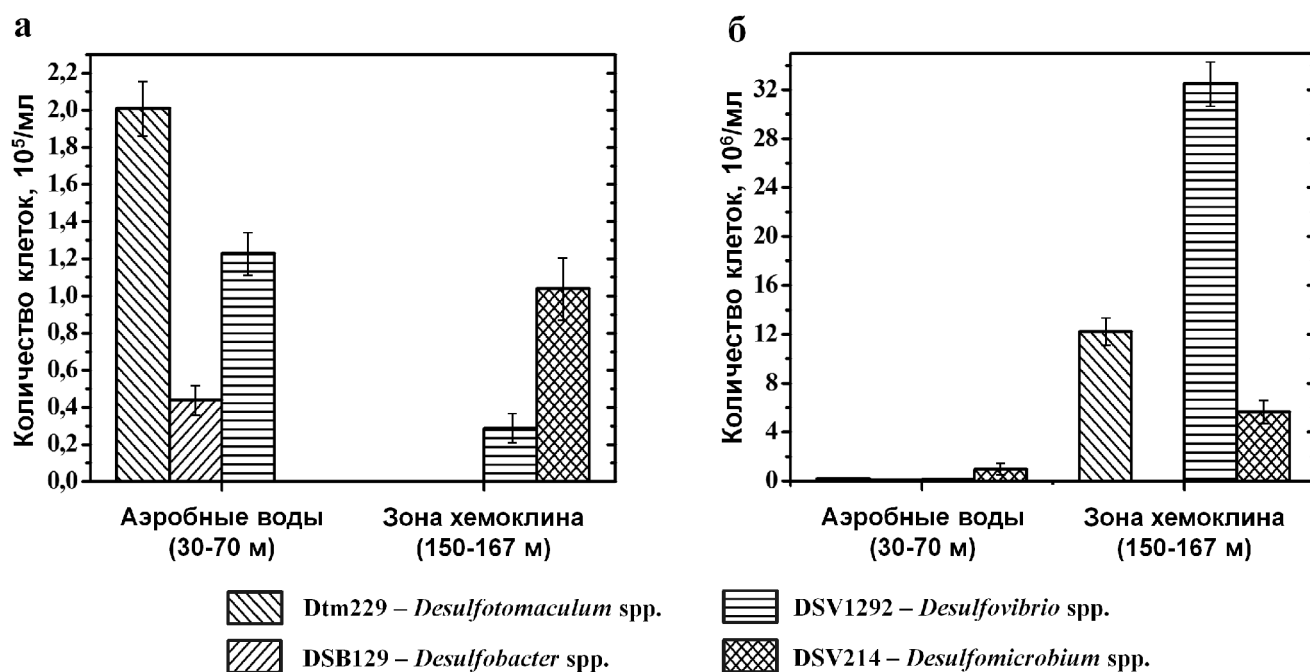


Рис. 1. Определенные методом FISH численность и филогенетический состав сообществ сульфатредуцирующих бактерий в кислородсодержащей водной толще континентального склона Черного моря (а) и в накопительных культурах, выделенных из водных проб с соответствующих глубин (б)

Более надежным методом определения по сравнению с FISH является вложенная ПЦР с предварительно амплифицированными участками гена 16S рРНК Bacteria и праймерами, специфичными к шести основным филогенетическим подгруппам СРБ. Применение вложенной ПЦР подтвердило результаты FISH-анализа, показав наличие в Черном море и в Гданьской впадине Балтийского моря на глубине 30 м помимо *Desulfotomaculum* (1-я подгруппа СРБ), *Desulfobacter* (4-я подгруппа СРБ) и *Desulfovibrio-Desulfomicrobium* (6-я подгруппа СРБ) также ДНК представителей 5-й подгруппы СРБ (*Desulfococcus-Desulfonema-Desulfosarcina*). Методом вложенной ПЦР представители 1-й, 5-й и 6-й подгрупп были также обнаружены и в зоне хемоклина. Участков гена 16S рРНК, специфичных для СРБ 2-й (*Desulfobulbus*) и 3-й (*Desulfobacterium*) подгрупп, в кислородсодержащих водных горизонтах обоих меромиктических бассейнов обнаружено не было. Полученные результаты позволяют предположить, что представители *Desulfococcus-Desulfonema-Desulfosarcina* и *Desulfovibrio-Desulfomicrobium* являются доминантными СРБ в верхних водных горизонтах Черного и Балтийского морей до нижней границы хемоклина, поскольку считается, что микроорганизмы, ген 16S рРНК которых можно детектировать исключительно посредством вложенной ПЦР, представлены в природных образцах в меньшем количестве, чем обнаруживаемые также и менее чувствительной прямой ПЦР [7].

В подповерхностных водах и в зоне хемоклина ПЦР с использованием тотальной ДНК, выделенной из проб воды, профильтрованных только через фильтры GF/C (для оценки наличия не только

свободноживущих СРБ, но и ассоциированных с органической взвесью), детектировала присутствие участков гена 16S рРНК, специфичных для 1-й, 4-й и 6-й подгрупп в Черном море, а также 1-й, 5-й и 6-й подгрупп в Балтийском море. Интересно, что участков гена 16S рРНК черноморских представителей рода *Desulfobacter* в биомассе из нижних зон хемоклина, сконцентрированной на мелкопористых фильтрах, найдено не было. Это может свидетельствовать о том, что клетки *Desulfobacter* spp. обитают в зоне хемоклина исключительно в составе взвешенных частиц.

Из кислородсодержащих вод Черного моря (глубины 30, 70 и 157 м) и Гданьской впадины Балтийского моря (глубина 30 м) были получены активные накопительные культуры СРБ. Структура сообщества СРБ в накопительных культурах существенно отличалась от таковой в нативных водных пробах. Так, черноморские накопительные культуры из аэробной зоны содержали в основном клетки *Desulfomicrobium* spp., а в культурах, полученных из зоны хемоклина, преобладали представители родов *Desulfovibrio* и *Desulfotomaculum* (рис. 1, б).

Наиболее активный рост наблюдался в накопительной культуре из Черного моря с глубины 70 м, полученной при добавлении в основную среду Видделя $K_2Cr_2O_7$ (10 мкМ). По результатам рестрикционного анализа клонированных участков гена 16S рРНК этой культуры из 57 образцов библиотеки были отобраны две группы (рис. 2): с одним сайтом рестрикции для *Hae*III (12 клонов) и без него (45 клонов). Результаты секвенирования трех случайных образцов из обеих групп показали, что накопительная культура состоит из СРБ, наиболее

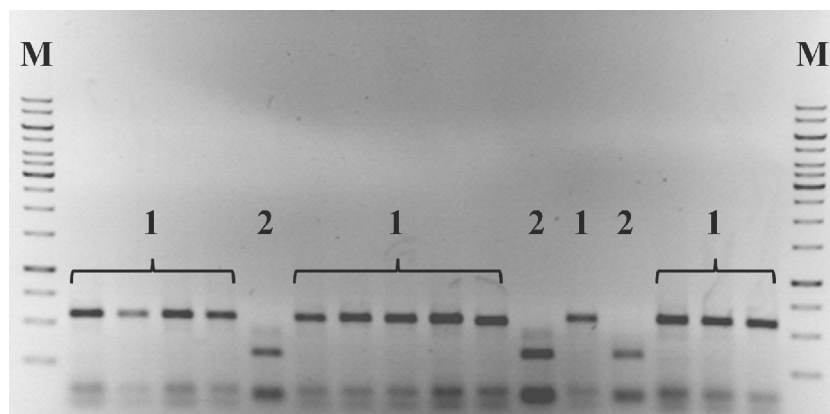


Рис. 2. Рестрикционный анализ участков гена 16S рНК из накопительной культуры черноморских СРБ, полученной из водной пробы с глубины 70 м. Дорожки: 1 — участки, не содержащие сайт рестрикции для *HaeIII* (*Desulfosporosinus* sp.); 2 — участки с одним сайтом рестрикции для *HaeIII* (*Vibrio* sp.); М — ДНК-маркер GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Fermentas, Литва)

близких по нуклеотидной гомологии (97%) к *Desulfosporosinus* sp. 159 (AF295659), а также из гетеротрофных бактерий *Vibrio* sp. B234 (FN295777). Обнаружение в Черном море клеток *Desulfosporosinus* spp. является интересным фактом в исследовании сообществ морских СРБ, поскольку к этому роду относят спорообразующие клетки, выделенные из пресноводных осадков, осадков кислых сточных водоемов горнодобывающей промышленности и различных почв.

Полученные данные по определению сульфат-редуцирующих бактерий с помощью FISH и ПЦР в сочетании с выделением из кислородсодержащих водных горизонтов активных накопительных культур свидетельствуют о том, что распространение СРБ в Черном и Балтийском морях не ограничивается глубинными анаэробными водами и донными осадками, как полагали ранее. Филогенетический состав сообществ СРБ кислородсодержащих вод континентального склона Черного моря и Гданьской впадины Балтийского моря в целом достаточно схож. В верхних аэробных водах обнаружены СРБ родов *Desulfotomaculum* и *Desulfo-*

vibrio. В зоне хемоклина были определены в основном *Desulfomicrobium* spp. и *Desulfovibrio* spp. Неоднородное распределение по глубине кислородсодержащей водной толщи Черного и Балтийского морей различных филогенетических подгрупп СРБ, вероятно, обусловлено наличием на соответствующих горизонтах взвешенных органических частиц (панцирей диатомовых водорослей, пеллетного материала и т.д.), внутри которых возможно формирование анаэробных микрозон, оптимальных для развития СРБ.

Авторы благодарят к.г.н. В.К. Часовникова и к.г.-м.н. В.В. Сивкова из ЮО и АО Института океанологии им. П.П. Ширшова РАН за организацию морских экспедиций.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты № 10-04-00220-а, 10-04-10005-к, 11-04-10005-к) и программы Carl Zeiss для молодых ученых ведущих вузов России.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Murray J.W., Jannash H.W., Honjo S., Anderson R.F., Reeburgh W.S., Top Z., Friederich G.E., Codispoti L.A., Izdar E. Unexpected changes in the oxic/anoxic interface in the Black Sea // *Nature*. 1989. Vol. 338. N 6214. P. 411–413.
2. Bryukhanov A.L., Korneeva V.A., Kanapatskii T.A., Zakharova E.E., Men'ko E.V., Rusanov I.I., Pimenov N.V. Investigation of the sulfate-reducing bacterial community in the aerobic water and chemocline zone of the Black Sea by the FISH technique // *Microbiology*. 2011. Vol. 80. N 1. P. 108–116.
3. Kot-Wasik A., Zukowska B., Dąbrowska D., Dębska J., Pacyna J., Namieśnik J. Physical, chemical, and biological changes in the Gulf of Gdańsk ecosystem (southern Baltic Sea) // *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 2003. Vol. 179. N 1. P. 1–36.
4. Pimenov N.V., Rusanov I.I., Yusupov S.K., Fridrich J., Lein A.Yu., Wehrli B., Ivanov M.V. Microbial processes at the aerobic-anaerobic interface in the deep-water zone of the Black Sea // *Microbiology*. 2000. Vol. 69. N 4. P. 527–540.
5. Brioukhanov A., Pieulle L., Dolla A. Antioxidative defense systems of anaerobic sulfate-reducing microorganisms // *Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology*. Vol. 1. Microbiology book series / Ed. by A. Méndez-Vilas. Badajoz: Formatex Research Center, 2010. P. 148–159.
6. de Rezende J.R., Kjeldsen K.U., Hubert C.R., Finster K., Loy A., Jørgensen B.B. Dispersal of thermophilic *Desulfotomaculum* endospores into Baltic Sea sediments over thousands of years // *ISME J.* 2013. Vol. 7. N 1. P. 72–84.
7. Daly K., Sharp R.J., McCarthy A.J. Development of oligonucleotide probes and PCR primers for detecting phylogenetic subgroups of sulfate-reducing bacteria // *Microbiology-SGM*. 2000. Vol. 146. N 7. P. 1693–1705.
8. Amann R.I., Zarda B., Stahl D.A., Schleifer K.H. Identification of individual prokaryotic cells by using enzyme-labeled, rRNA-targeted oligonucleotide probes // *Appl. Environ. Microbiol.* 1992. Vol. 58. N 9. P. 3007–3011.

9. Devereux R., Kane M.D., Winfrey J., Stahl D.A. Genus- and group-specific hybridization probes for determinative and environmental studies of sulfate-reducing bacteria // Syst. Appl. Microbiol. 1992. Vol. 15. N 4. P. 601–609.
10. Hristova K.R., Mau M., Zheng D., Aminov R.I., Mackie R.I., Gaskins H.R., Raskin L. *Desulfotomaculum* genus- and subgenus-specific 16S rRNA hybridization probes for environmental studies // Environ. Microbiol. 2000. Vol. 2. N 2. P. 143–159.
11. Lückner S., Steger D., Kjeldsen K.U., MacGregor B.J., Wagner M., Loy A. Improved 16S rRNA-targeted probe set for analysis of sulfate-reducing bacteria by fluorescence *in situ* hybridization // J. Microbiol. Meth. 2007. Vol. 69. N 3. P. 523–528.
12. Edwards U., Rogall T., Blöcker H., Emde M., Böttger E.C. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA // Nucleic Acids Res. 1989. Vol. 17. N 19. P. 7843–7853.
13. Geets J., Borremans B., Diels L., Springael D., Vangronsveld J., van der Lelie D., Vanbroekhoven K. *DsrB* gene-based DGGE for community and diversity surveys of sulfate-reducing bacteria // J. Microbiol. Meth. 2006. Vol. 66. N 2. P. 194–205.
14. Widdel F., Back F. The genus *Desulfotomaculum* // The Prokaryotes. 3rd ed. Vol. 4 / Ed. by M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.H. Schleifer, E. Stackebrandt. N.Y.: Springer, 1992. P. 787–794.
15. Trüper H.G., Schlegel H.G. Sulfur metabolism in Thiorhodaceae. I. Quantitative measurements on growing cells of *Chromatium okenii* // Antonie van Leeuwenhoek. 1964. Vol. 30. N 1. P. 225–238.
16. Muyzer G., Brinkhoff T., Nübel U., Santegoeds C., Schäfer H., Wawer C. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology // Molecular microbial ecology manual / Ed. by A.D.L. Akkermans, J.D. van Elsas, F.J. de Bruijn. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1997. P. 1–23.
17. Vetriani C., Tran H.V., Kerkhof L.J. Fingerprinting microbial assemblages from the oxic/anoxic chemocline of the Black Sea // Appl. Environ. Microbiol. 2003. Vol. 69. N 11. P. 6481–6488.
18. Neretin L.N., Abed R.M., Schippers A., Schubert C.J., Kohls K., Kuypers M.M. Inorganic carbon fixation by sulfate-reducing bacteria in the Black Sea water column // Environ. Microbiol. 2007. Vol. 9. N 12. P. 3019–3024.

Поступила в редакцию
28.10.14

DETECTION OF ANAEROBIC SULFATE-REDUCING BACTERIA IN OXYGEN-CONTAINING UPPER WATER LAYERS OF THE BLACK AND BALTIC SEAS

A.L. Bryukhanov, V.A. Korneeva, N.V. Pimenov

Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) and PCR were used for analysis of the phylogenetic structure of anaerobic sulfate-reducing bacterial communities in oxygen-containing upper water layers of meromictic basins — the Black Sea and the Gdańsk Deep of the Baltic Sea. In the Black Sea (continental slope at depths 30–70 m), cells of sulfate-reducing bacteria (SRB) hybridizing with 16S rRNA-specific FISH-probes for *Desulfotomaculum*, *Desulfobacter* and *Desulfovibrio* genera were revealed, whereas *Desulfomicrobium*-related bacteria were prevalent in the chemocline zone at 150-m depth. Besides of *Desulfotomaculum* (SRB subgroup 1), *Desulfobacter* (SRB subgroup 4) and *Desulfovibrio-Desulfomicrobium* (SRB subgroup 6), nested PCR with the use of 16S rRNA gene-specific primers detected the presence of *Desulfococcus-Desulfonema-Desulfosarcina* (SRB subgroup 5) in oxygen-containing water column of the Black and Baltic seas. Active enrichment SRB culture which contained bacterium *Desulfosporosinus* sp. as a major component was obtained from the Black Sea water sample collected at 70-m depth.

Key words: sulfate-reducing bacteria, *Desulfosporosinus*, fluorescent *in situ* hybridization, nested PCR, meromictic basin, Black Sea, Gdańsk Deep of the Baltic Sea.

Сведения об авторах

Брюханов Андрей Леонидович — канд. биол. наук, доц., ст. науч. сотр. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-42-23; e-mail: brjuchanov@mail.ru

Корнеева Валерия Алексеевна — науч. сотр., аспирант кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-42-23; e-mail: busenica@yandex.ru

Пименов Николай Викторович — докт. биол. наук, зам. дир. института микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН, проф. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-499-135-31-75; e-mail: npimenov@mail.ru